

Abstract

Bone morphogenetic proteins (BMPs) belong to the TGF- β superfamily of pluripotent growth factors that exert several critical cellular functions such as proliferation, differentiation, and apoptosis during development and tissue homeostasis. Although originally discovered as extractable cytokines from bone matrix, it has not been investigated how the extracellular matrix controls their bioavailability. Gaining a better understanding about the molecular requirements controlling BMP activity within extracellular tissue microenvironments is crucial for new therapeutic advances in connective tissue disease and tissue regeneration. BMPs are synthesized as single chain precursors consisting of a prodomain (PD) and a growth factor (GF) moiety that are processed by proprotein convertases (PPCs) to form a non-covalently associated PD-GF complex (CPLX). By employing transmission electron microscopy (TEM) with single particle averaging, molecular docking and bioactivity assays, it was discovered that PPC processing induces a conformational change that renders BMP-10 CPLX signaling-competent. Since BMP-10 predominantly circulates in human plasma as an unprocessed variant, its bioactivity can thus be regulated by the availability of PPCs within the extracellular space.

In addition, the ECM can regulate BMP bioactivity by specific PD mediated targeting of BMP CPLXs to the microfibril component fibrillin-1. It was shown previously that the bioactive V-shape of BMP-7 CPLX assumes a latent, closed-ring conformation when targeted to fibrillin-1. In contrast, by employing negative staining EM and bioactivity assays on solid phase, it could be demonstrated that BMP-7 and BMP-9 CPLX targeting to heparin/ HS maintains their bioactive state. Molecular modeling, docking and heparin binding studies pointed towards conserved heparin/ HS binding epitopes residing within the PD arm regions.

In order to shed light into activation mechanisms of the fibrillin-bound BMPs, a cleavage screen using several matrix metalloproteinases (MMPs), combined with Edman sequencing and mutagenesis were employed that pointed towards a conserved PD cleavage consensus. By employing bioactivity assays, EM with single particle averaging and native PAGE it was found that MMP-13 releases bioactive GF leading to CPLX unfolding.

In summary, this thesis provides a comprehensive analysis of different mechanisms utilized by the ECM to control BMP bioactivity in distinct extracellular microenvironments.

Zusammenfassung

Knochenmorphogenetische Proteine (bone morphogenetic proteins: BMPs) gehören zur TGF- β -Superfamilie pluripotenter Wachstumsfaktoren, die während der Embryonalentwicklung und der Gewebshomöostase wichtige zelluläre Funktionen wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose ausüben. Obwohl sie ursprünglich als extrahierbare Zytokine aus der Knochenmatrix entdeckt wurden, wurde bisher nicht untersucht, wie die extrazelluläre Matrix ihre Bioverfügbarkeit kontrolliert. Ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen, welche die BMP-Aktivität in der extrazellulären Mikroumgebung steuern, ist für neue therapeutische Fortschritte bei Bindegewbserkrankungen und Geweberegenerationsprozessen von entscheidender Bedeutung. BMPs werden als einkettige Vorläufer synthetisiert, die aus einer Prodomäne (PD) und einem Wachstumsfaktor (GF) bestehen und durch Proprotein-Konvertasen (PPCs) prozessiert werden. Dabei entsteht ein nicht-kovalent assoziierter PD-GF-Komplex (CPLX). Durch den Einsatz von Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM), molekularem Docking und Bioaktivitätstests wurde entdeckt, dass die PPC-Prozessierung eine Konformationsänderung hervorruft, die BMP-10 CPLX in den aktiven Zustand versetzt. Da BMP-10 überwiegend als unverarbeitete Variante im menschlichen Plasma zirkuliert, kann seine Bioaktivität durch die Verfügbarkeit von PPCs im Extrazellulärraum reguliert werden.

Darüber hinaus kann die ECM die Bioaktivität von BMP durch spezifische PD-vermittelte Interaktion von BMP-CPLXs an die Mikrofibrillen-Komponente Fibrillin-1 regulieren. Die bioaktive V-Form von BMP-7 CPLX nimmt dabei eine latente, geschlossene Ringkonformation an. Im Gegensatz dazu konnte durch den Einsatz von EM mit negativer Färbung und Bioaktivitätstests gezeigt werden, dass an Heparin/ HS gebundenes BMP-7 und BMP-9 CPLX, seinen bioaktiven Zustand beibehält. Molekulare Modellierung, Docking und Heparin-Bindungsstudien wiesen auf konservierte Heparin/ HS-Bindungsepitope in den jeweiligen PD-Arm-Regionen hin.

Um die Aktivierungsmechanismen der Fibrillin-gebundenen BMPs zu untersuchen, wurde ein Spaltungsscreening von BMP PDen mit verschiedenen Matrix-Metalloproteasen (MMPs) durchgeführt. Durch den Einsatz von Bioaktivitätstests, und EM wurde festgestellt, dass MMP-13 bioaktives GF freisetzt, das zur Entfaltung von CPLX führt.

Diese Arbeit zeigt verschiedene neue Mechanismen auf, die von der ECM zur Kontrolle der BMP Bioverfügbarkeit in der extrazellulären Mikroumgebungen genutzt werden.