

STRUKTURELLE UND FUNKTIONELLE
CHARAKTERISIERUNG DES
KNOCHENWACHSTUMS-MODULATORS
SCLEROSTIN

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES NATURWISSENSCHAFTLICHEN DOKTORGRADES DER
JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG

VORGELEGT VON
STELLA ELISABETH WEIDAUER
AUS DARMSTADT

WÜRZBURG 2009

Eingereicht am:

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:

2. Gutachter:

der Dissertation

1. Prüfer:

2. Prüfer:

3. Prüfer:

des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des Öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

„In der Wissenschaft gleichen wir allen nur den Kindern, die am Rande des Wissens hier und da einen Kiesel aufheben, während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.“

Isaac Newton

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	5
1.1	DER METABOLISMUS DES KNOCHENGEWEBES	5
1.2	KNOCHENKRANKHEITEN UND THERAPIEANSÄTZE	11
1.3	SCLEROSTIN, MODULATOR DES KNOCHENWACHSTUMS	18
1.4	DER KANONISCHE WNT- β -CATENIN-SIGNALWEG	23
1.5	PROTEIN/PROTEIN-INTERAKTIONEN ZWISCHEN LRP5/6 UND PROTEINEN DES WNT- β -CATENIN SIGNALWEGS.....	28
1.6	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	32
2	MATERIAL UND METHODEN.....	35
2.1	MATERIALIEN.....	35
2.1.1	<i>Chemikalien und Enzyme</i>	35
2.1.2	<i>Vektoren</i>	35
2.1.3	<i>Kulturmedien</i>	36
2.1.4	<i>Bakterienstämme</i>	37
2.1.5	<i>Oligonukleotide</i>	37
2.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	38
2.2.1	<i>Polymerasekettenreaktion</i>	38
2.2.2	<i>Agarosegel-Elektrophorese</i>	39
2.2.3	<i>Restriktionsreaktion</i>	39
2.2.4	<i>Ligation</i>	40
2.2.5	<i>Transformation</i>	40
2.2.6	<i>Kolonie-PCR</i>	41
2.2.7	<i>Plasmid-DNA Isolierung</i>	42
2.2.8	<i>Konstrukte</i>	42
2.3	EXPRESSION REKOMBINANTER PROTEINE IN E.COLI.....	43
2.3.1	<i>Präparative Proteinexpression in TB-Medium</i>	43
2.3.2	<i>Präparative Proteinexpression in M9-Minimalmedium</i>	43
2.4	EXPRESSION REKOMBINANTER PROTEINE IN INSEKTENZELLEN.....	44
2.4.1	<i>Kultivierung von Sf9- und TriExTM-Insektenzellen</i>	45
2.4.2	<i>Vitalitätsfärbung und Zellzahlbestimmung</i>	46
2.4.3	<i>Co-Transfektion von Sf9-Zellen mit dem BaculoGoldTM-System</i>	46
2.4.4	<i>Co-Transfektion von Sf9-Zellen mit dem BacVectorTM-System</i>	47
2.4.5	<i>Plaque Assay</i>	47
2.4.6	<i>Virusamplifikation</i>	48
2.4.7	<i>Expression rekombinanter Proteine in Suspensionskultur</i>	49
2.5	PROTEINCHEMISCHE METHODEN	50
2.5.1	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i>	50
2.5.2	<i>Färbung von Proteingelen</i>	51

Inhaltsverzeichnis

2.5.3	Western Blot.....	52
2.5.4	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen	53
2.5.5	Biotinylierung von Proteinen.....	54
2.5.6	Dynamische Lichtstreuung	54
2.6	PRÄPARATION VON SCLEROSTIN UND VARIANTEN AUS SF9-ZELLKULTURÜBERSTAND	55
2.6.1	Metallchelate-Affinitätschromatographie.....	55
2.6.2	Ionenaustausch-Chromatographie	56
2.7	PRÄPARATION VON SCLEROSTIN UND VARIANTEN AUS E.COLI-ZELLEN	57
2.7.1	Zellaufschluss und Isolierung der Einschlusskörper	57
2.7.2	Metallchelate-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen	58
2.7.3	Rückfaltung.....	58
2.7.4	Ionenaustauschchromatographie.....	59
2.7.5	Reversed-Phase-Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie.....	59
2.7.6	Entfernung der Hexahistidinsequenz durch Thrombin	60
2.8	GRÖßENAUSSCHLUSS-CHROMATOGRAPHIE.....	61
2.8.1	Kalibrierung der Gelfiltrationssäule	61
2.9	MASSENSPEKTROMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN.....	62
2.9.1	Messung.....	62
2.9.2	Proteolyse mit Trypsin und Endoproteinase GluC in Lösung.....	62
2.10	ANALYSE DES GLYKOSYLIERUNGSMUSTERS VON SCLEROSTIN.....	63
2.10.1	Detektion von Glykokonjugaten mit der Periodsäure Schiff-Färbung.....	63
2.10.2	In-Gel Proteolyse mit Trypsin nach Deglykosylierung mit PNGaseF	63
2.11	ZELLBASIERENDE NACHWEISVERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DER PROTEINAKTIVITÄT	64
2.11.1	Kultivierung von HEK293T-Zellen	64
2.11.2	Kultivierung von L-mWnt3a und L-Zellen	64
2.11.3	Gewinnung von mWnt3a Konditioniertem- oder Kontrollmedium	65
2.11.4	Kultivierung von C3H10T1/2-BRE-Luc Zellen.....	65
2.11.5	Kultivierung von MC3T3E1-Zellen.....	65
2.11.6	Wnt-Reportergen-Nachweisverfahren	66
2.11.7	Smad1/5/8 Luciferase-Reportergen-Nachweisverfahren	67
2.11.8	ALP-Nachweisverfahren.....	68
2.12	ANALYSE VON PROTEIN-PROTEIN-INTERAKTIONEN DURCH DIE OBERFLÄCHENPLASMONRESONANZ-SPEKTROSKOPIE	68
2.13	NMR-SPEKTROSKOPIE	70
2.13.1	Probenvorbereitung.....	70
2.13.2	NMR-Messungen.....	70
2.13.3	Prozessieren der Spektren.....	70
2.13.4	Zuordnung der chemischen Verschiebungen	71
2.13.5	Ermittlung der Sekundärstruktur aus NOESY-Spektren	71
2.13.6	Sekundärstrukturermittlung nach Wishart.....	72
2.13.7	Distanzermittlung durch NOEs.....	72

2.13.8	<i>Berechnung der ϕ-Ψ-Winkel mit TALOS</i>	73
2.13.9	<i>Strukturberechnung</i>	73
2.13.10	<i>Auswertung des ^{15}N $\{^1\text{H}\}$ Hetero-NOE-Experiments</i>	73
2.13.11	<i>Identifizierung des Bindeepitops von murinem Sclerostin an das Fab-Fragment AbD09097 mittels NMR-Spektroskopie</i>	74
3	ERGEBNISSE	75
3.1	GEWINNUNG VON WILDTYPISCHEM SCLEROSTIN AUS INSEKTENZELLKULTURÜBERSTAND	75
3.2	BIOCHEMISCHE UND BIOPHYSIKALISCHE CHARAKTERISIERUNG VON WILDTYPISCHEM SCLEROSTIN	80
3.2.1	<i>Analyse des Glykosylierungsmusters von Sclerostin aus Insektenzellen</i>	81
3.2.2	<i>Analyse des Disulfidverbrückungsmusters von Sclerostin</i>	83
3.2.3	<i>Analyse der Domänenstruktur von Sclerostin</i>	86
3.3	GEWINNUNG VERKÜRZTER SCLEROSTIN VARIANTEN	88
3.4	CHARAKTERISIERUNG DER BIOLOGISCHEN WIRKUNG VON SCLEROSTIN UND VARIANTEN	92
3.4.1	<i>Einfluss von Sclerostin auf den kanonischen Wnt-β-Catenin-Signalweg</i>	92
3.4.2	<i>Einfluss von Sclerostin auf den BMP-Smad1/5/8- Signalweg</i>	94
3.4.3	<i>Analyse der direkten Protein-Protein-Interaktion zwischen Sclerostin und LRP6 bzw. Sclerostin und BMP7</i>	96
3.5	AUFREINIGUNG VON SCLEROSTIN UND VARIANTEN AUS E.COLI	100
3.6	ANALYSE DER DREIDIMENSIONALEN STRUKTUR VON SCLEROSTIN MITTELS NMR-SPEKTROSKOPIE	109
3.6.1	<i>NMR-spektroskopische Analyse von Sclerostin</i>	109
3.6.2	<i>Zuordnung der chemischen Verschiebungen</i>	111
3.6.3	<i>Sekundärstrukturanalyse von murinem Sclerostin-ΔNC</i>	114
3.6.4	<i>Strukturanalyse</i>	118
3.6.5	<i>NMR-Struktur von murinem Sclerostin-ΔNC (Asn^{36}-Arg^{144})</i>	123
3.6.6	<i>^{15}N $\{^1\text{H}\}$ Hetero-NOE-Experiment</i>	129
3.7	ANTI-SCLEROSTIN FAB-FRAGMENTE	131
3.7.1	<i>Charakterisierung der Fab-Fragmente mittels Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie</i>	131
3.7.2	<i>Charakterisierung der Fab-Fragmente mittels Wnt-Reportergen-Nachweisverfahren</i>	134
3.7.3	<i>Bestimmung des Bindeepitops von Sclerostin an AbD09097 mittels NMR-Spektroskopie</i>	135
4	DISKUSSION	139
4.1	METHODISCHE STRATEGIEN	139
4.1.1	<i>Expression von Sclerostin in Sf9-Insektenzellen</i>	139
4.1.2	<i>Expression von Sclerostin in E.coli-Bakterien</i>	141
4.1.3	<i>Strukturaufklärung</i>	142
4.2	VERGLEICH DER NMR-STRUKTUREN VON MURINEM UND HUMANEM SCLEROSTIN	143
4.3	VERGLEICH DER SCLEROSTIN-STRUKTUR MIT STRUKTUREN ANDERER CYSTINKNOTENPROTEINE	151
4.4	VERGLEICH VON SCLEROSTIN MIT BEKANNTEN BMP-ANTAGONISTEN	156
4.5	SCLEROSTIN, MITGLIED DER DAN-FAMILIE?	167
4.6	INHIBITIONSMECHANISMEN VON WNT-SIGNALWEG-ANTAGONISTEN	172

Inhaltsverzeichnis

4.7	PUTATIVER INTERAKTIONSMECHANISMUS VON SCLEROSTIN UND LRP5/6	177
4.8	AUSBLICK	182
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	185
6	SUMMARY	186
7	LITERATURVERZEICHNIS	187
8	ANHANG	199
8.1	AMINOSÄURESEQUENZEN	199
8.2	HUMANES SCLEROSTIN	199
8.3	MURINES SCLEROSTIN	199
8.4	SEQUENZEN DER EXPRESSIONSKONSTRUKTE	199
8.4.1	<i>mSOST_pACGP67b</i>	200
8.4.2	<i>hSOST_pACGP67b</i>	201
8.4.3	<i>mSOST_pMK1</i>	202
8.4.4	<i>hSOST_opt_pMK1</i>	203
8.4.5	<i>mSOSTΔC_pMK1</i>	204
8.4.6	<i>mSOST_pET28b</i>	205
8.4.7	<i>mSOSTΔC_pET28b</i>	206
8.4.8	<i>mSOSTΔNC_pET28b</i>	207
8.5	NMR-EXPERIMENTE	208
8.6	CHEMISCHE VERSCHIEBUNGEN VON MURINEM SCLEROSTIN- Δ NC	209
8.7	EINTRÄGE VON STRUKTUREN IN DIE RCSB-DATENBANK.....	211
8.8	PUBLIKATIONEN	211
8.9	ABKÜRZUNGEN	212
8.10	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	215
8.11	TABELLENVERZEICHNIS	218
9	DANKSAGUNG.....	219

1 Einleitung

1.1 Der Metabolismus des Knochengewebes

Das menschliche Skelett besteht aus 206 Knochen, die ein hochkomplexes Gewebe mit vielfältigen Funktionen darstellen. Die Knochen dienen dem Körper als Stütze, schützen die inneren Organe wie z.B. das Gehirn oder Herz und Lunge und fungieren zugleich als Calcium- und Phosphatspeicher. Außerdem werden im Knochenmark wichtige Zellen des Blutes wie die Erythrozyten, die Thrombozyten und die Zellen des Immunsystems gebildet.

Das Knochengewebe stellt eine spezielle Form des Bindegewebes dar, das sich von anderen Bindegewebsarten durch die Mineralisierung der extrazellulären Matrix unterscheidet, die zu 70% aus anorganischem Hydroxylapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$), zu 20% aus Matrixproteinen wie Kollagen Typ 1, Osteonectin, Osteocalcin, Osteopontin, Sialoproteine und Proteoglykanen und zu 10% aus Wasser besteht (Mundlos, *et al.*, 1997, Robey, *et al.*, 1993, Young, *et al.*, 1992). Wie in anderen Geweben repräsentieren die Kollagene den größten Proteinanteil der extrazellulären Knochenmatrix und geben dem Knochen durch ihren superhelikalen Aufbau eine enorme Festigkeit.

Der Knochen bildet kein starres Gebilde, sondern unterliegt ständiger Veränderung. Einerseits durch das Wachstum, andererseits durchläuft er aber auch nach Beendigung der Wachstumsphase (etwa im 20. Lebensjahr) eine fortwährende Erneuerung. Durch Beanspruchung entstandene Mikrorisse im Knochengewebe werden erkannt und defektes Knochengewebe wird regeneriert. Außerdem reagiert Knochengewebe auf Veränderungen des Hormonhaushalts und des Calcium- und Phosphatspiegels im Blutserum. So ist das erhöhte Osteoporose-Risiko für Frauen nach der Menopause auf einen erniedrigten Östrogenspiegel zurückzuführen (Riggs, *et al.*, 2002). Für all diese Reaktionen ist ein komplex reguliertes System zuständig, welches aus unterschiedlichen Zelltypen mit verschiedenen Aufgaben besteht. Hierzu gehören einerseits die Osteoblasten, die durch Sekretion der Bestandteile der extrazellulären Matrix den Osteoid (Knochengrundsubstanz) aufbauen (Ducy, *et al.*, 2000). Aus ihnen differenzieren nach Abschluss der Mineralisierung Osteozyten, die „Wächter“ des Systems oder Knochenwandzellen, die den entstandenen Knochen umgeben (Bonewald, 2007). Den Zellen der Knochenbildung stehen die Osteoklasten gegenüber, welche Knochengewebe abbauen (Teitelbaum, 2000).

Einleitung

Das menschliche Skelett besteht aus zwei unterschiedlichen Knochenarten. Dazu gehören einerseits die Röhrenknochen (*Ossa longa*: Elle, Speiche, Oberschenkelknochen, etc.), die aus einem Knochenschaft (*Diaphyse*) und zwei Knochenenden (*Epiphyse*) bestehen und andererseits die platten Knochen (*Ossa plana* z.B. Schädelknochen). Während der Embryogenese werden beide Knochenarten auf unterschiedliche Weise gebildet. Die platten Knochen entstehen direkt aus Bindegewebe durch den Vorgang der desmalen Ossifikation (Hall, *et al.*, 1992). Hierbei kondensieren zunächst mesenchymale Stammzellen inselartig zu Vorläuferzellen, welche dann direkt zu Osteoblasten differenzieren. Diese sekretieren die Knochensubstanz, den Osteoid. Der Osteoid kalzifiziert nach einiger Zeit durch die Sekretion von kleinsten Hydroxylapatitkristallen durch reife Osteoblasten. Nachdem die Osteoblasten vollständig mit kalzifizierter Matrix umgeben sind, durchlaufen sie entweder Apoptose oder differenzieren zu Osteozyten.

Die Röhrenknochen entstehen hingegen durch chondrale Ossifikation (Erlebacher, *et al.*, 1995). Hier kondensieren ebenfalls mesenchymale Stammzellen, diese differenzieren aber zunächst zu Chondrozyten (Knorpelzellen). Chondrozyten sekretieren hier die extrazelluläre Matrix des Knorpelgewebes und bilden so zunächst ein Knorpelgerüst. Anschließend wachsen Blutgefäße in das Knorpelgewebe ein, durch die erneut mesenchymale Stammzellen einwandern und ihrerseits entweder zu Chondroklasten differenzieren, die den Knorpel abbauen oder aber zu Osteoblasten, die durch Sekretion von Osteoid den Knochen aufbauen.

Nach Abschluss der Knochenbildung unterliegen die Knochen bis in das adulte Stadium einer ständigen Wachstumsphase. Platte Knochen wachsen hierbei durch äußere Anlagerung von Knochenmasse. Röhrenknochen zeigen Längenwachstum im Bereich der Wachstumsfuge zwischen *Diaphyse* und *Epiphyse* und Breitenwachstum im Bereich der *Diaphyse*. Das Breitenwachstum erfolgt wie bei den platten Knochen durch äußere Anlagerung also desmale Ossifikation, das Längenwachstum hingegen durch chondrale Ossifikation. Hier wird zunächst in der Wachstumsfuge Knorpel gebildet, der dann in Richtung *Diaphyse* in Knochen umgewandelt wird.

Für den Knochenaufbau verantwortliche Osteoblasten differenzieren aus pluripotenten Vorläuferzellen, den mesenchymalen Stammzellen, die zu spezifischen Zellen für viele verschiedene Gewebe differenzieren können, zu denen unter anderem Osteoblasten, Myoblasten, Chondrozyten und Adipozyten gehören (Grigoriadis, *et al.*, 1988, Grigoriadis, *et al.*, 1990).

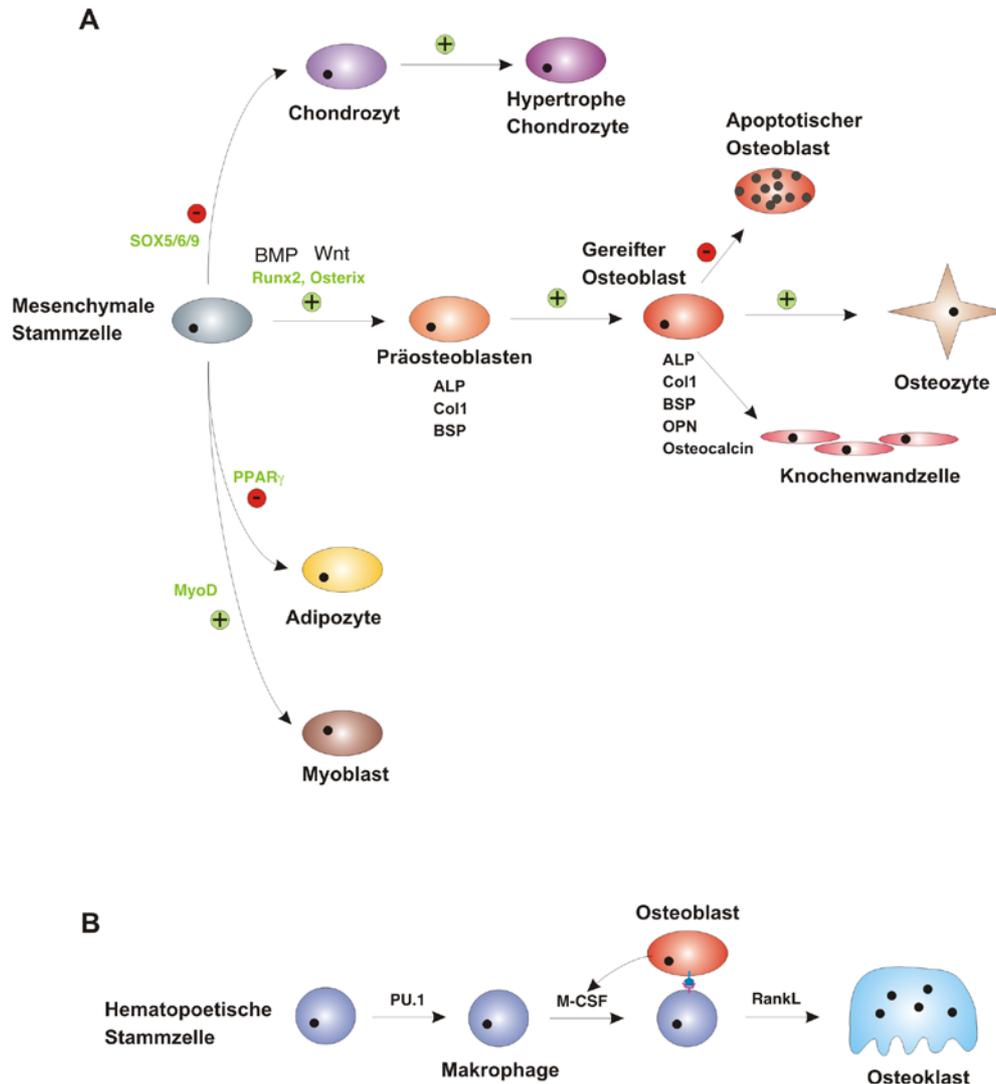


Abbildung 1: Differenzierungsprozess der verschiedenen Knochenzellen. A) Einfluss des Wnt- β -Catenin-Signalwegs auf die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Gewebespezifischen Zellen. Die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Adipozyten und Chondrozyten benötigt ein schwaches Wnt-Signal. Hier sind spezielle Transkriptionsfaktoren wie SOX5/6/9 (Chondrozyten) oder PPAR γ (Adipozyten) aktiv. Die Differenzierung zu Myoblasten und den Zellen der Osteoblasten-Zelllinie benötigt ein robustes Wnt-Signal. Hier spielen die Transkriptionsfaktoren MyoD (Myoblasten) und Runx2 bzw. Osterix (Osteoblasten) eine besondere Rolle. Außerdem sind die verschiedenen Markerproteine für die Differenzierung zu Osteoblasten dargestellt. ALP, Col1, BSP sind frühe Markerproteine für Osteoblastogenese, OPN und Osteocalcin sind späte Marker, da sie erst von reifen Osteoblasten sekretiert werden. B) Differenzierung von hematopoietischen Stammzellen aus dem Knochenmark zu Osteoklasten. PU.1 wird für die Differenzierung zu Makrophagen benötigt. M-CSF ist nötig für das Überleben und die Proliferation von Makrophagen. Die Interaktion von RANKL (in Osteoblasten exprimiert) und RANK (auf Makrophagen) initiiert die Differenzierung von Makrophagen zu Osteoklasten. Abbildung A nach Baron *et al.*, 2007, 148, *Endocrinology* (Baron, *et al.*, 2007), Abbildung B nach Steven Teitelbaum, 2000, 289, *Science* (Teitelbaum, 2000).

Zu welchem Zelltyp sich die mesenchymalen Stammzellen entwickeln, wird durch viele untereinander vernetzte Signalwege bestimmt. Für die Differenzierung zu Osteoblasten spielt unter anderem der BMP-Signalweg eine besondere Rolle (Katagiri, *et al.*, 2002). BMPs (Bone

Einleitung

morphogenetic Proteins) wurden 1965 von Urist entdeckt und sind die einzigen Wachstumsfaktoren, die in Vertebraten alleine die Bildung von ektopelem Knochengewebe induzieren können (Urist, 1965, Wozney, *et al.*, 1988). Außer dem BMP-Signalweg spielt auch der kanonische Wnt- β -Catenin-Signalweg eine wichtige Rolle (Wnt = „Wingless“ und Int-1). So ist beispielsweise die Stärke des Wnt-Signals ausschlaggebend, ob kondensierte mesenchymale Stammzellen zu Chondrozyten oder direkt zu Osteoblasten differenzieren (Day, *et al.*, 2008) (siehe Abbildung 1A). Ein schwaches Wnt-Signal führt zu Chondrozyten, ein starkes Wnt-Signal jedoch zu Osteoblasten. Somit entscheidet die Stärke des Wnt-Signals über chondrale oder desmale Ossifikation.

Osteoblasten unterscheiden sich morphologisch kaum von Fibroblasten (Bindegewebszellen). Der Hauptunterschied liegt in der Mineralisierung der extrazellulären Matrix, die von den Osteoblasten sekretiert wird (Ducy, *et al.*, 2000). Als frühester Marker für Osteogenese wird der Transkriptionsfaktor Runx2 (Cbfa1) angesehen. Er wird ausschließlich in mesenchymalen Zellen exprimiert, die entweder zu Chondrozyten oder Osteoblasten differenzieren (Ducy, *et al.*, 1997). Ein weiterer osteoblastenspezifischer Transkriptionsfaktor ist Osterix, der nachgeschaltet von Runx2 agiert (Nakashima, *et al.*, 2002).

Die Osteoblastogenese kann in drei Stadien unterteilt werden: Die Wachstumsphase, die Reifung der Matrix und die Mineralisierung der Matrix. Alle drei Stadien sind durch die Expression unterschiedlicher Markerproteine charakterisiert, zu denen ALP (Alkalische Phosphatase), Kollagen 1, OPN (Osteopontin), „bone sialoprotein“ (BSP) und Osteocalcin gehören (Huang, *et al.*, 2007) (siehe Abbildung 1A). ALP, BSP und Kollagen 1 sind frühe Markerproteine für die Differenzierung zu Osteoblasten, während Osteocalcin hingegen ein später Marker ist, da es erst von ausgereiften Osteoblasten sekretiert wird. Osteocalcin spielt eine wichtige Rolle in der Calciumbindung und inhibiert darüber hinaus die Funktion der Osteoblasten.

Sind die Osteoblasten nach Sekretion des Osteoids vollständig von mineralisierter Matrix umgeben, durchlaufen sie entweder Apoptose oder differenzieren zu Osteozyten (Franz-Oudendaal, *et al.*, 2006). Sie bilden Zellfortsätze (Dendriten) aus, durch die sie sich mit anderen Osteozyten, Osteoblasten, Knochenwandzellen und Osteoklasten mittels „Gap Junctions“ vernetzen. Die Dendrite bilden ein verzweigtes Tunnelsystem (Canaliculli) in der mineralisierten Matrix, welches Aussparungen (Lacunen) enthält, in denen die Osteozyten

eingebettet sind (Bonewald, 2007). Durch dieses System sind die Osteozyten nicht nur mit andern Zellen des Knochens vernetzt, sondern sie haben auch Kontakt zum Knochenmark, wo sie Osteoklastenvorläuferzellen rekrutieren oder die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten steuern können (Kamioka, *et al.*, 2001).

Die Aufgabe der Osteozyten liegt in der Kontrolle der Knochenhomöostase. Defekter Knochen (durch Bruch oder mechanische Belastung) muss erkannt und erneuert werden. Die Knochenerneuerung kann entweder durch die bei einem Knochenbruch ausgelöste Apoptose von Osteozyten induziert werden (Verborgt, *et al.*, 2002) oder durch die Reaktion der Osteozyten auf mechanische Beanspruchung des Knochens (Bonewald, *et al.*, 2008). Wird der Knochen nicht beansprucht (z.B. unter Bedingungen der Schwerelosigkeit), so wird von den Osteozyten der Abbau des Knochens veranlasst. Im Gegenzug dazu führt die mechanische Belastung durch regelmäßige Beanspruchung zur Induktion des Knochenwachstums. Wie die Osteozyten hierbei eine mechanische Belastung detektieren ist noch unklar. Es wird allerdings vermutet, dass durch die Belastung der Matrixfluss im Canalicullisystem verändert wird, was zu Scherkräften führt. Diese Scherkräfte werden möglicherweise von den Osteozyten detektiert und in ein Signal umgewandelt (Bonewald, *et al.*, 2008). Es wird angenommen, dass unter anderem der kanonische Wnt- β -Catenin-Signalweg aktiviert wird, was dann zu einer Verstärkung des Knochenwachstums führt (Robling, *et al.*, 2008). Wurde ein Defekt im Knochengewebe von Osteozyten erkannt, so wird der Abbau des Knochens durch Osteoklasten induziert. Das Signal wird zunächst an Knochenwandzellen weitergeleitet, welche die Knochenmatrix für die Resorption durch Osteoklasten vorbereiten und die Rekrutierung von differenzierten Osteoklasten einleiten (Hauge, *et al.*, 2001). Der Knochenumbau ist immer auf eine kleine lokale Einheit, das Osteon, beschränkt. Ein Osteon hat einen Durchmesser von etwa 300 μ m und verläuft parallel zur Längsachse des Knochens.

Die Vorläuferzellen der Osteoklasten sind hämatopoetische Stammzellen aus dem Knochenmark und gehören zu den zirkulierenden Monozyten und Makrophagen (Udagawa, *et al.*, 1990) (siehe Abbildung 1B). Für die Differenzierung der Makrophagen zu Osteoklasten ist der direkte Kontakt zwischen Makrophagen und Osteoblasten oder Osteoblastenvorläufern von entscheidender Bedeutung (Udagawa, *et al.*, 1990) (siehe Abbildung 2). Sie exprimieren und sekretieren das für die Differenzierung wichtigste Zytokin RANKL („receptor activator of nuclear factor κ B ligand“), ein membranständiges Protein, welches zur TNF („tumor

Einleitung

necrosis factor“-Familie gehört. RANKL bindet an den auf den Makrophagen lokalisierten Rezeptor RANK („receptor activator of nuclear factor κ B) und induziert die Differenzierung der Makrophagen zu Osteoklasten (Lacey, *et al.*, 1998, Yasuda, *et al.*, 1998). Außerdem sekretieren die Osteoblasten ein für das Überleben und die Proliferation der Makrophagen wichtiges Protein, das M-CSF („macrophage colony stimulating factor“). Darüber hinaus exprimieren Osteoblasten Osteoprotegerin (OPG), einen löslichen dominant negativen Rezeptor für RANKL. OPG konkurriert mit dem auf Makrophagen membranständigen Rezeptor RANK um die Bindung von RANKL (Simonet, *et al.*, 1997). Durch diese drei Mechanismen können die Osteoblasten die Resorptionsrate des Knochens durch die Osteoklasten regulieren.

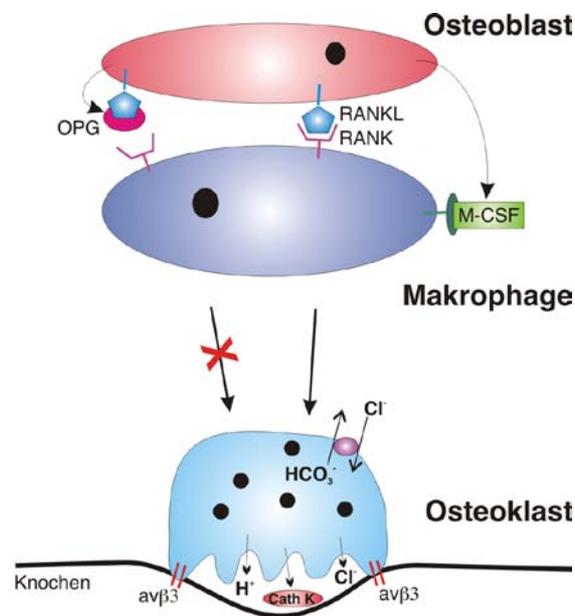


Abbildung 2: Die Differenzierung zu Osteoklasten und deren Funktionsprinzip. Zellen der Osteoblastenlinie exprimieren die für die Osteoklastogenese wichtigen Faktoren RANKL und M-CSF, die an ihre entsprechenden Rezeptoren auf Makrophagen binden und für die Differenzierung von Makrophagen zu Osteoklasten unerlässlich sind. OPG wird ebenfalls von Osteoblasten sekretiert und verhindert die Interaktion von RANKL mit RANK und somit die Differenzierung zu Osteoklasten. Der differenzierte Osteoklast bindet durch die Integrine α ν β 3 an die Matrixproteine Osteopontin und Sialoproteine und fixiert so den Osteoklasten auf der Knochenoberfläche. Der Osteoklast sekretiert Protonen und Chloridionen (HCl) in den Spalt zwischen sich und der Knochenoberfläche und löst somit das Calcium aus dem abzubauenen Knochen. Die Proteine der Matrix werden durch vom Osteoklasten sekretierte Proteasen wie Cathepsin K abgebaut. Abbildung nach Steven Teitelbaum, 2000, 289, Science (Teitelbaum, 2000).

Ist die Differenzierung zu Osteoklasten abgeschlossen, so müssen diese zunächst auf der Knochenoberfläche anhaften. Dies geschieht durch die Integrine der α ν -Familie α ν β 3 und α ν β 5 (Teitelbaum, 2007). Sie binden an ihre Erkennungssequenz RGD (Arg-Gly-Asp) der

Matrixproteine Osteopontin und Sialoprotein. Das dadurch entstehende „Outside-in“ Signal führt zur Reorganisation des Zytoskeletts und der für Osteoklasten typischen Verformung und Polarisierung (Takagi, *et al.*, 2002). Saure Vesikel, deren Membran unter anderem H^+ -ATPasen enthalten, wandern nun zur knochenzugewandten Membranseite der Osteoklasten. Durch die Fusion der Vesikel mit der Zellwand entsteht der charakteristische Bürstensaum dieser Membran. Zwischen Knochen und Osteoklast bildet sich ein Spalt, in den die H^+ -ATPasen Protonen sekretieren (Blair, *et al.*, 1989). Um die Basifizierung des Zytoplasmas zu verhindern, werden Hydrogencarbonat-Ionen aus dem Zytoplasma gegen Chloridionen von energieunabhängigen Cl^-/HCO_3^- -Tauschern ausgetauscht. Diese Chloridionen werden anschließend durch Chloridkanäle in den Spalt zwischen Osteoklast und Knochen transportiert. Das Resultat der Ionentransporte ist die Sekretion von Salzsäure, wodurch der pH-Wert im Spalt auf 4.5 absinkt, was dazu führt, dass Calcium und Phosphat aus der mineralisierten Matrix herausgelöst werden (Schlesinger, *et al.*, 1997). Die Matrixproteine werden durch Osteoklasten sekretierte Proteasen, wie Cathepsin K („collagenic lysosomal protease“) proteolysiert (Blair, *et al.*, 1986, Gelb, *et al.*, 1996). Ist die Resorption des Knochens an dieser Stelle abgeschlossen, so wandern die Osteoklasten an eine andere Stelle oder sterben durch Apoptose ab.

1.2 Knochenkrankheiten und Therapieansätze

Der Knochenaufbau sowie der fortwährende Knochenumbau werden durch ein hochkomplexes stark vernetztes System reguliert, welches durch alle beteiligten Komponenten im Gleichgewicht gehalten wird. Ist das Gleichgewicht zwischen Knochenaufbau durch die Osteoblasten und Knochenabbau durch die Osteoklasten gestört, so resultieren daraus diverse teilweise schwere Erkrankungen. Überwiegt der Knochenaufbau durch einen Defekt im Knochenabbau, so entsteht Osteopetrose (Teitelbaum, *et al.*, 2003). Osteopetrosepatienten zeigen ungerichtete Anhäufung von Knochengewebe mit gestörter Mikroarchitektur. Die Krankheit basiert auf einer Osteoklastenfehlfunktion. Entweder liegt der Defekt in Zellen vor, die für die Rekrutierung oder die Differenzierung von Osteoklasten benötigt werden (z.B. die Osteoblasten), oder der Defekt betrifft direkt die Osteoklasten durch Mutationen in osteoklastenspezifischen Genen (z.B. Cathepsin K, H^+ -ATPase). Diese Form der Osteopetrose wird als osteoklastenautonom beschrieben und ist durch eine Knochenmarkstransplantation heilbar (Coccia, *et al.*, 1980, Frattini, *et al.*, 2000, Gelb, *et al.*, 1996).

Einleitung

Ist das Gleichgewicht durch eine Überfunktion der Osteoklasten gestört, resultiert daraus die Osteoporose (Lerner, 2006). Phänotypisch für Osteoporose sind eine verringerte Knochendichte, schlechte Mikroarchitektur des Knochens, erhöhte Anfälligkeit für Frakturen besonders der Wirbelkörper, Hüftgelenke und Oberschenkelhalsknochen (siehe Abbildung 3). Die Krankheit betrifft etwa 30% aller Frauen nach der Menopause, aber auch Männer können mit zunehmendem Alter von dieser Krankheit betroffen sein. In einer immer älter werdenden Weltbevölkerung hat diese Krankheit mit einem jährlichen Kostenaufwand von etwa 3Mrd. € zudem ein großes volkswirtschaftliches Gewicht. Der Knochenschwund ist hier auf einen übermäßigen Knochenabbau zurückzuführen und hat unterschiedliche Ursachen.

Grundsätzlich überwiegt ab dem dreißigsten Lebensjahr die Abnahme der Knochenmasse. Ist diese Abnahme jedoch überdurchschnittlich groß, so spricht man von Osteoporose. Der Grad einer Osteoporose ist durch den BMD-Wert (bone mineral density, Knochendichte (normal -2 bis +2)) charakterisiert. BMD-Werte kleiner -2 indizieren eine Osteoporose (Piters, *et al.*, 2008).

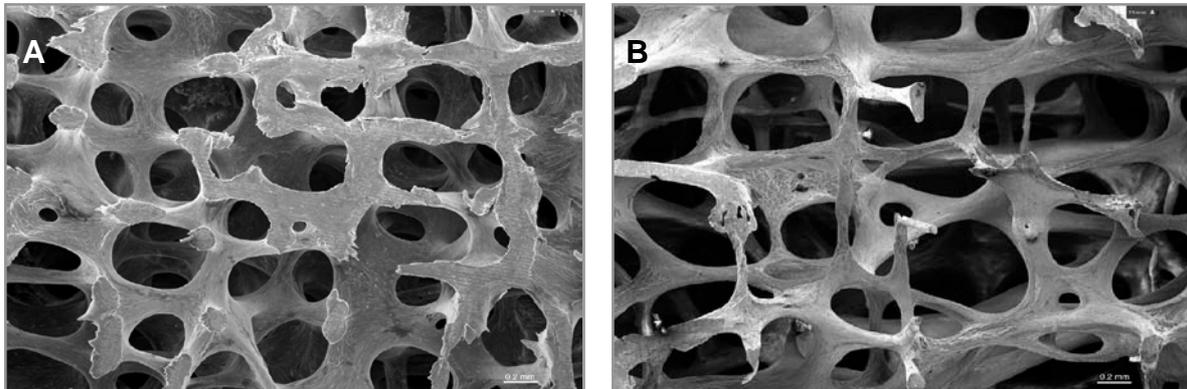


Abbildung 3: A) Elektronen-mikroskopische Aufnahme des 3. Rückenwirbels einer 30 Jahre alten Frau mit gesunder Knochenarchitektur. B) Elektronenmikroskopische Aufnahme des 3. Rückenwirbels einer 71 Jahre alten Frau mit osteoporotischer Knochenarchitektur. Für die Aufnahmen wurden das Knochenmark und vorhandene Knochenzellen entfernt. Abbildungen unverändert von der Homepage der „Bone Research Society“, „United Kingdom“ (www.brsoc.org.uk/gallery/index.htm) übernommen.

Gründe für die Abnahme der Knochenmasse sind einerseits der Verlust des Sexualhormons Östrogen, wodurch die Expression von Faktoren wie z.B. $\text{TNF}\alpha$, IL-1 (Interleukin 1), M-CSF und RANKL erhöht wird, welche die Osteoklastogenese begünstigen (Kimble, *et al.*, 1996, Teitelbaum, 2000). Andererseits kann Osteoporose auch eine Folge anderer Erkrankungen

wie Magersucht, chronischen Entzündungen oder einer Langzeit-Glukokortikoidtherapie sein (Lerner, 2006). Auch der persönliche Lebensstil mit Bewegungsmangel, Vitamin D- und Calciumunterversorgung trägt zur Entwicklung einer Osteoporose bei. Die medikamentöse Behandlung der Osteoporose wird in erster Linie mit anti-katabolen Präparaten wie den Bisphosphonaten, die in Osteoklasten Apoptose auslösen, Calcitonin und selektiven Östrogenrezeptormodulatoren (SERMs) durchgeführt, welche die weitere Resorption des Knochens verhindern (Martino, *et al.*, 2004, Miller, *et al.*, 2005). Somit kann aber nur der Zustand des Knochens bei Diagnose der Osteoporose erhalten und ein Fortschreiten des Knochenabbaus verhindert werden. Ein Aufbau der Knochensubstanz ist durch diese Therapieform nicht möglich. Zudem führt die Therapie mit Bisphosphonaten oft zu einer Verschlechterung der Mikrostruktur des Knochens, da auch die Reparaturmechanismen des Knochens hierbei unterdrückt werden (Odvina, *et al.*, 2005). Vor einer Reparatur muss zunächst das defekte Knochengewebe durch Osteoklasten resorbiert werden. Erst anschließend kann der Knochen von Osteoblasten wieder aufgebaut werden.

Das derzeit einzig verfügbare Medikament, welches den Aufbau neuer Knochensubstanz vermittelt, ist das Parathyroid Hormon (PTH), ein α -helicales Peptidhormon bestehend aus 84 Aminosäuren und eines der drei Schlüsselhormone der Calciumhomöostase (Calcitriol, PTH, Calcitonin) (Poole, *et al.*, 2005a). Eine Studie an postmenopausalen Frauen mit Osteoporose, denen täglich 100 μ g PTH subkutan injiziert wurde, zeigte, dass der BMD-Wert der Lendenwirbelsäule in zwölf Monaten um 7.8% gesteigert werden konnte (Hodsman, *et al.*, 2003) (siehe Abbildung 4). Der osteoanabole PTH-Effekt beruht auf der Steigerung der Osteoblastenzahl, welcher durch eine verbesserte Proliferation, verstärkte Differenzierung zu Osteoblasten und eine verringerte Apoptose der Osteoblasten bedingt ist (Jilka, *et al.*, 1999, MacDonald, *et al.*, 1986). Der osteoanabolen Wirkung des Parathyroid Hormons bei periodischer Anwendung steht jedoch bei chronischer Erhöhung der PTH-Konzentration eine osteokatabole Wirkung gegenüber. PTH wird normalerweise bei absinkender Calciumkonzentration im Blutserum von den calciumsensitiven Nebenschilddrüsenzellen sekretiert (Brown, *et al.*, 1993). Es spielt eine Rolle im Metabolismus von Vitamin D zu Calcitriol (aktive Form) in der Niere und ist damit indirekt für die Aufnahme von Calcium im Darm verantwortlich (Poole, *et al.*, 2005a). Außerdem wirkt es auch im Knochen, wo es durch Bindung an den PTH-Rezeptor PTH1R auf Zellen der Osteoblastenlinie die Expression von RANKL induziert und die Expression von OPG inhibiert. Dies begünstigt die

Einleitung

Differenzierung von Makrophagen zu Osteoklasten, wodurch Calcium aus dem Knochen freigesetzt wird (Shiotani, *et al.*, 2002).

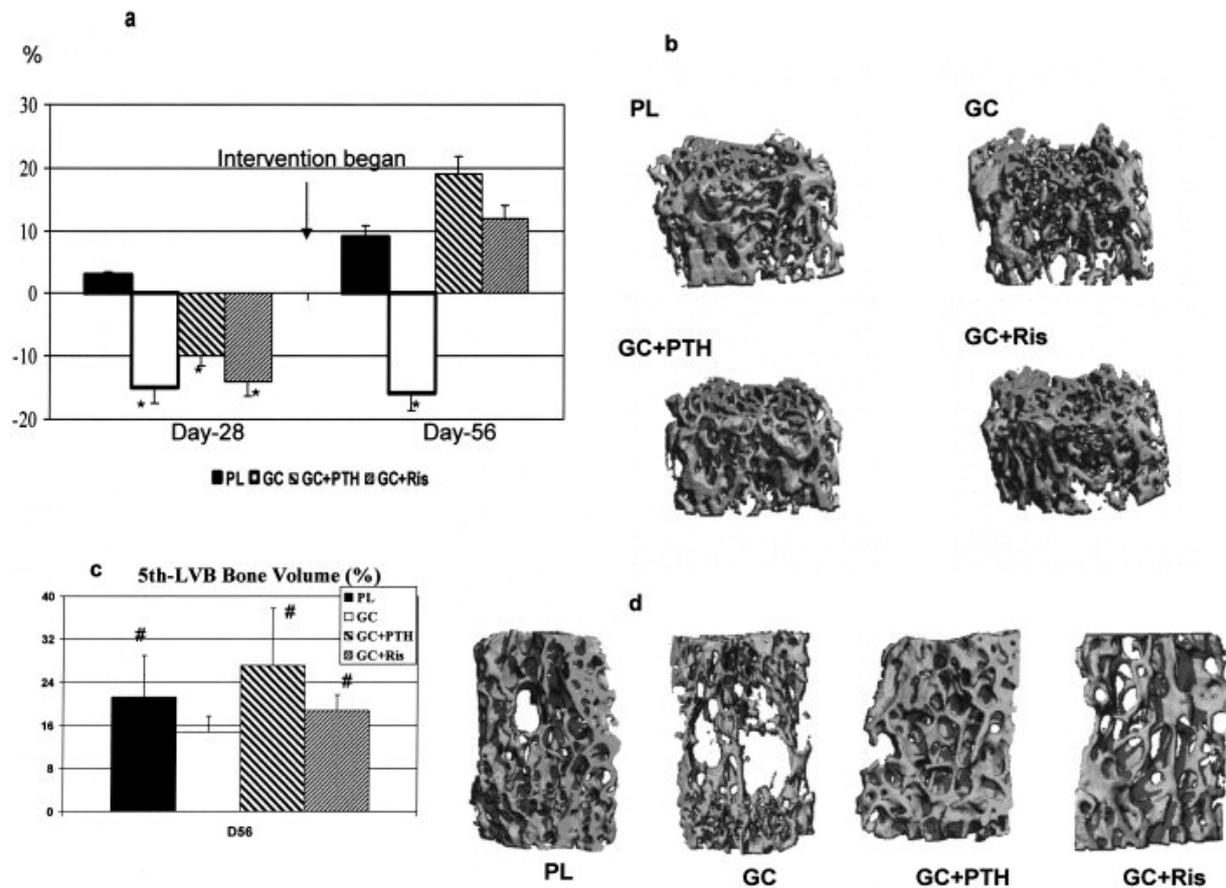


Abbildung 4: Zeitliche Veränderung des trabekulären Knochenvolumens der distalen Metaphyse des Oberschenkelknochens und des fünften Lendenwirbels von Mäusen nach 28 oder 56 Tagen einer Behandlung mit Placebo (PL), nach 28 bzw. 56 Tagen Glukokortikoidgabe (GC) und nach 28 Tagen Glukokortikoidgabe mit anschließender Gabe von Glukokortikoid und Parathyroid Hormon für 28 Tage (GC+PTH = Aminosäure 1-34) oder Glukokortikoid plus Risedronate für 28 Tage (GC+Ris = Bisphosphonat). A) und C) Änderung des Knochenvolumens in % in der distalen Metaphyse des Oberschenkelknochens (A) und des fünften Lendenwirbels (L5) (C). Glukokortikoidgabe führt zu Knochenverlust im Oberschenkelknochen und im Lendenwirbel. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. (* = $P < 0.05$ bezogen auf den Placebowert; # = $P < 0.05$ bezogen auf Glukokortikoidgabe alleine; D56 = Tag 56.) B) und D) repräsentative 3-dimensionale mikrofokal Computertomographie Bilder der distalen Metaphyse des Oberschenkelknochens (B) und des fünften Lendenwirbels (D) nach 56 Tagen für jede Gruppe der Studie. Glukokortikoide verringern die Knochenmasse des trabekulären Knochengewebes und die Zahl der trabekulären Verstrebungen und deren Dicke. PTH(1-34) verstärkt die Knochenmasse und Dicke der Verstrebungen im Vergleich mit Placebo oder Glukokortikoid behandelten Knochen. Mäuse, die mit Risedronate behandelt wurden, hatten vergleichbare Knochenmasse und -dicke wie Placebo behandelte Mäuse. Abbildung unverändert übernommen aus Yao *et al.*, 2008, *Arthritis & Rheumatism*, (Yao, *et al.*, 2008) mit Genehmigung der John Wiley & Sons Inc.

Eine chronische Erhöhung des PTH-Spiegels im Blut führt zu Hyperparathyreoidismus mit erhöhtem Blut-Calciumspiegel und Knochenabbau. Hier ist die calciumsensitive Regulation der PTH-Sekretion durch einen Tumor oder genetische Defekte gestört, d.h. trotz erhöhter

Calciumkonzentration wird vermehrt PTH sekretiert, was zu einer verstärkten Osteoklastogenese und somit zum Abbau des Knochens führt.

Die osteoanabole wie auch die osteokatabole Wirkweise von PTH wird durch die Bindung von PTH an den PTH-Rezeptor (PTH1R) auf Osteoblasten vermittelt und führt zunächst zu einer Vermehrung dieser Zellen. Der Unterschied zwischen chronischer Erhöhung, die zu Knochenabbau führt (Hyperparathyreoidismus) und periodischer Erhöhung, die einen Knochenaufbau zur Folge hat, besteht darin, dass PTH zwar einerseits die Expression von Runx2 induziert, was die Apoptose von Osteoblasten verhindert, bei chronischer Erhöhung aber auch die Proteolyse von Runx2 durch das Proteasom stimuliert (Bellido, *et al.*, 2003, Krishnan, *et al.*, 2003). Erhöhung der PTH-Konzentration führt also zunächst immer zu einer transienten Vermehrung von Osteoblasten, die durch Expression von RANKL auch die Osteoklastogenese begünstigen. Bei chronisch erhöhtem PTH-Spiegel sterben die Osteoblasten dann aber durch Apoptose, welche durch die selbstlimitierte Regulation von Runx2 durch PTH induziert wird. Fällt die PTH-Konzentration jedoch nach kurzfristiger Wirkung wieder auf den Normalwert ab, so überwiegt der osteoanabole Effekt, da die Osteoblastenzahl erhöht bleibt.

Eine Therapie mit PTH kann in ungünstigen Fällen Nebenwirkungen wie Hypercalcämie hervorrufen (Hodsman, *et al.*, 2003). Außerdem ergab eine Studie an Ratten, die für 2 Jahre täglich mit PTH behandelt wurden, dass abhängig von der PTH-Dosis bis zu 40% der Tiere Osteosarkome entwickelten (Fox, 2002). Das Auftreten von Osteosarkomen wurde allerdings in der Studie an postmenopausalen Frauen mit Osteoporose nicht beobachtet.

Um Osteoporose effektiver zu behandeln, ist daher die Entwicklung von nebenwirkungsfreien/-ärmeren osteoanabolen Therapeutika unerlässlich. Einen solchen Ansatz liefert möglicherweise die detaillierte Betrachtung des Knochendichtemodulators Sclerostin, dessen Expression ebenfalls durch PTH reguliert wird. Durch die Bindung von PTH an den PTH-Rezeptor (PTH1R) auf Osteozyten wird die Transkription der Sclerostin mRNA direkt über den cAMP/PKA-Signalweg inhibiert (Keller, *et al.*, 2005). Ein Eingriff auf der Ebene von Sclerostin würde den anabolen Effekt einer PTH-Therapie beibehalten, jedoch sollten PTH-typische Nebenwirkungen wie Hypercalcämie nicht auftreten. Warum Sclerostin für die Entwicklung eines osteoanabolen Therapeutikums von großem Interesse ist, soll die folgende Beschreibung der beiden Erkrankungen Sclerosteose und der Van Buchem Krankheit verdeutlichen. In beiden Fällen führt die Abwesenheit des Proteins Sclerostin zu

Einleitung

einer in der Osteoporosetherapie gewünschten Zunahme des Knochengewebes von ausgesprochen guter Qualität.

Sclerosteose (OMIM 269500) ist eine sehr schwere, aber seltene craniotubuläre Hyperosteose (Beighton, *et al.*, 1976b) (siehe Abbildung 5A). Sie zeichnet sich durch eine signifikante Sklerose des Knochengewebes, wobei sowohl Knochendichte als auch Knochenvolumen erhöht sind (Beighton, 1976, Beighton, *et al.*, 1976a, Beighton, *et al.*, 1976b). Typisch für diese Erkrankung sind die extreme Größe der Patienten (Gigantismus), Missbildungen des Kiefers und Verwachsungen der Fingerglieder (Syndactyly), die schon bei Geburt als erstes Anzeichen der Krankheit erkennbar sind (Hamersma, *et al.*, 2003) (siehe Abb. 5A). Die erhöhte Knochenmasse des Schädels beeinträchtigt die Nervenbahnen, was Lähmungen im Gesichtsbereich, Hör- und Geschmacksverlust sowie den Verlust des Sehvermögens zur Folge haben kann. Ein erhöhter Schädelinnendruck verursacht Kopfschmerzen und kann in seltenen unbehandelten Fällen Ursache für den spontanen Tod von Patienten sein (Beighton, *et al.*, 1976b).

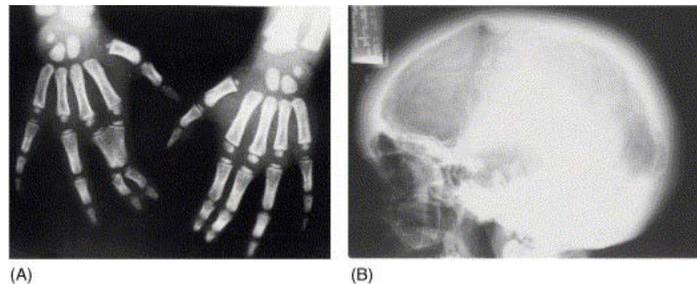


Abbildung 5: Knochenphänotyp von Patienten mit Sclerosteose und Van Buchem Krankheit. A) Röntgenaufnahme der Hände eines drei Jahre alten Mädchens mit Sclerosteose. Die Fingerglieder des zweiten und dritten Fingers sind verwachsen (Syndactyly). B) Röntgenaufnahme des Schädels eines 19 Jahre alten Mannes mit Van Buchem Krankheit mit Verdickung der Kalotte und der Schädelbasis. Abbildung ohne Änderungen übernommen aus Van Bezooijen *et al.*, 2005, 16: 320, mit Genehmigung durch Elsevier (van Bezooijen, *et al.*, 2005).

Erhöhte Knochendichte und -volumen resultieren aus einer verstärkten Knochenbildung bei normaler Resorptionsrate (Stein, *et al.*, 1983). Durch eine übermäßige Aktivierung der Osteoblasten wird vermehrt Osteoid sekretiert. In Patienten konnte eine Erhöhung der Osteoblasten-Markerproteine alkalische Phosphatase und Osteocalcin nachgewiesen werden, während Marker für die Osteoklastogenese hingegen unverändert waren (Wergedal, *et al.*, 2003). Die Zunahme der Knochenmasse erstreckt sich über die gesamte Lebensdauer der

Patienten. Der Knochen hat eine normale lamellenartige Struktur und ist extrem hart. Selbst bei schweren Unfällen sind bisher nie Knochenbrüche beschrieben. Die Defekte bei Sclerostinausfall beschränken sich ausschließlich auf das Skelett. Alle anderen Körperfunktionen sind normal und auch der Hormonhaushalt ist unauffällig (Hamersma, *et al.*, 2003, Vanhoenacker, *et al.*, 2003).

Die Van Buchem Krankheit (OMIM 239100) hat einen ähnlichen Phänotyp wie die Sclerosteose (Van Buchem, *et al.*, 1955), nimmt aber einen milderen Verlauf. Es tritt kein Syndactyly auf und die Patienten sind von normaler Körpergröße (Vanhoenacker, *et al.*, 2003, Wergedal, *et al.*, 2003) (siehe Abbildung 5B). Beide Krankheiten sind sehr selten (100 Fälle Sclerosteose, 40 Fälle Van Buchem Krankheit weltweit) und werden autosomal rezessiv vererbt (Beighton, *et al.*, 1977, Hamersma, *et al.*, 2003). Sclerosteose wurde zuerst in einer kleinen Kommune in Südafrika entdeckt, die Van Buchem Krankheit ist auf eine geschlossene Patientengruppe auf der kleinen Insel Urk im Eiselmeer in den Niederlanden beschränkt (Beighton, 1976). Aufgrund der vielen Gemeinsamkeiten beider Krankheiten und da die afrikanischen Patienten holländische Vorfahren hatten, entstand die Hypothese, dass beide Krankheiten aus der Homozygotität eines defekten Genes resultieren. Diese Annahme wurde bestätigt, da beide Krankheiten einem Abschnitt auf Chromosom 17q12-q21 zugeordnet werden konnten (Balemans, *et al.*, 1999, Van Hul, *et al.*, 1998). Aus diesem Intervall konnte das *SOST*-Gen isoliert werden, welches für das Protein **Sclerostin** kodiert. Die molekulare Ursache beider Krankheiten ist allerdings unterschiedlich. Sclerosteose beruht auf „missense“-Mutationen oder Spleißvarianten des aus zwei Exons und einem Intron bestehenden *SOST*-Gens, die zu einem im Leseraster liegenden Stop-Codon führen. Es wurden bis dato folgende Mutationen gefunden: Trp142X (Brasilien (Balemans, *et al.*, 2001)), Gln23X (Südafrika (Brunkow, *et al.*, 2001)), Arg126X (Amerika (Balemans, *et al.*, 2001)). Außerdem existiert eine Spleißvariante, ein Einbasenaustausch A nach T in Intron 1 (IVS1 +3 A nach T) (Senegal (Balemans, *et al.*, 2001, Brunkow, *et al.*, 2001)).

Die Ursache der Van Buchem Krankheit ist eine 52kb große Deletion 35kb unterhalb des *SOST*-Gens (Balemans, *et al.*, 2002). In dieser Region liegt ein knochenspezifischer Verstärker der Transkription des *SOST*-Gens im Knochengewebe, was dazu führt, dass das Protein im adulten Knochen nicht produziert wird (Loots, *et al.*, 2005). Während der Embryogenese wird das *SOST*-Gen durch andere Mechanismen reguliert. In diesem Entwicklungsstadium kann das Protein Sclerostin in Patienten mit Van Buchem Syndrom im

Gegensatz zu Sclerosteosepatienten noch exprimiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass Sclerostin ab Tag E9.5 im mesenchymalen Gewebe der entstehenden Extremitäten („Limb Bud“) exprimiert wird und dort die Entwicklung der Fingerglieder beeinflusst. Das ist auch der Grund, warum Syndactyly bei Van Buchem Patienten nicht auftritt (Loots, *et al.*, 2005). So wie die Abwesenheit des Proteins Sclerostin zu starker Osteosklerose führt, ist eine Überexpression von Sclerostin durch Osteopenie charakterisiert (Winkler, *et al.*, 2003). Es sind mittlerweile Polymorphismen in Regulationselementen des *SOST* Gens bekannt, die eine Prädisposition für Osteoporose erhöhen (rs123099 T nach C) (Huang, *et al.*, 2009).

1.3 Sclerostin, Modulator des Knochenwachstums

Sclerostin ist ein sekretiertes Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 23000Da und zwei putativen N-Glykosylierungstellen (Kusu, *et al.*, 2003) (siehe Abbildung 6). Die erste N-Glykosylierungsstelle (mit dem Konsensus-Motiv NQT) befindet sich im N-terminalen Bereich des Proteins vor dem ersten Cysteinrest, die zweite Stelle (mit dem Konsensus-Motiv NQS) im C-terminalen Bereich nach dem letzten Cysteinrest. Sclerostin besteht aus 213 Aminosäuren, wovon die ersten 23 Aminosäuren die Signalsequenz für den sekretorischen Transportweg darstellen. Der hohe Anteil an Argininen und Lysinen führt dazu, dass das Protein bei physiologischem pH stark positiv geladen vorliegt. Die Aminosäuresequenz ist außerdem reich an Prolinen und beinhaltet acht Cysteinreste, von denen sechs Cysteinreste ein Sequenzmotiv mit der Konsensus-Sequenz $C^1, C^2 \times G \times C^3, C^4, C^5 \times C^6$ bilden, welches für einen putativen Achtring-Cystinknoten codiert (der Ring besteht aus acht Aminosäuren CxGxC, CxC) (Avsian-Kretchmer, *et al.*, 2004). Die Anzahl der beteiligten Aminosäuren, die den putativen Cystinknoten bilden, unterteilt die Modulatorproteine mit diesem Motiv in drei Klassen: Noggin und Chordin (Zehnring Typ, Ring besteht aus zehn Aminosäuren), Twisted gastrulation (Neunring) und DAN (Achtring) (Avsian-Kretchmer, *et al.*, 2004). Sclerostin wird somit der DAN Familie von Modulatorproteinen zugeordnet („Differential screening-selected gene Aberrant in Neuroblastoma“) (siehe Abbildung 6).

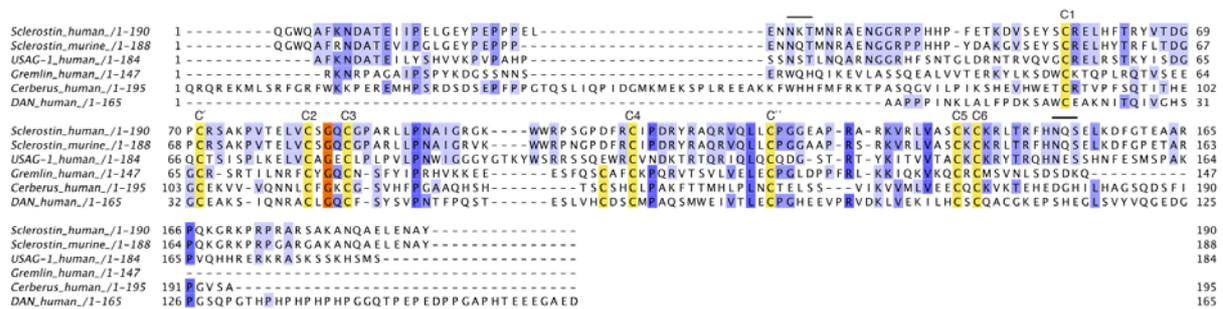


Abbildung 6: Aminosäuresequenzvergleich einiger Vertreter der DAN-Familie. Der Vergleich wurde mit der ClustalW Software des EMBL European Bioinformatik Institute erzeugt. (<http://www.ebci.ac.uk/clustalw/>). Die Sequenzmotive der N-Glykosylierungsstellen (NXT) von Sclerostin sind durch schwarze Balken gekennzeichnet. C1-C6 sind die Cysteinreste, die möglicherweise den putativen Cystinknoten formen, C' und C'' die Cysteinreste, die möglicherweise eine zusätzliche Disulfidbrücke bilden.

Mit den anderen Mitgliedern der DAN Familie (DAN, Cerberus, Coco, Dante, Gremlin und USAG-1) teilt Sclerostin jedoch eine niedrige Homologie auf Aminosäuresequenzebene. Viele Proteine der DAN-Familie wirken als Inhibitoren verschiedener Wachstumsfaktoren wie den BMPs („bone morphogenetic proteins“) oder den Wnt-Proteinen, denen beiden eine Schlüsselfunktion in der Knochenhomöostase zukommt. So fungiert z.B. USAG-1 einerseits als BMP-Antagonist, andererseits aber auch kontextabhängig als Inhibitor oder Aktivator des Wnt-β-Catenin-Signalwegs (Itasaki, *et al.*, 2003). USAG-1 („uterine sensitization-associated gene“, auch Wise oder Ectodin genannt) und Sclerostin verbindet eine Sequenzhomologie von 38%, wodurch sie innerhalb der DAN-Familie die SOST-Unterfamilie bilden. Der Vergleich der Loci-Struktur ihrer beiden Chromosomen führt zu der Annahme, dass die Gene durch Duplikation eines Ursprungsgens entstanden sind (Ellies, *et al.*, 2006). Beiden Proteinen fehlt ein weiterer Cysteinrest, was in einigen Mitgliedern der DAN-Familie (z.B. Cerberus, Gremlin) wahrscheinlich zu einer kovalenten Homodimerisierung führt.

Das Fehlen von extraskeletalen Krankheitsmerkmalen in Sclerosteose- und Van Buchem Patienten indiziert eine auf den Knochen beschränkte Expression von Sclerostin im adulten Organismus. Immunohistochemische Färbung von decalcifiziertem Knochengewebe mit gegen Sclerostin gerichteten Antikörpern begrenzen die Expression von Sclerostin auf die Osteozyten und das Canalicullisystem (van Bezooijen, *et al.*, 2004). Sclerostin konnte weder in Osteoblasten oder Knochenwandzellen noch in Osteoklasten nachgewiesen werden. Auf mRNA Ebene wurde Sclerostin zwar auch in anderen Geweben detektiert (Knorpel, Niere, Leber, Herz etc.), hier fehlt allerdings die Bestätigung der Ergebnisse durch

Einleitung

immunohistochemische Verfahren (Balemans, *et al.*, 2001, Brunkow, *et al.*, 2001). In Zellkultur zu Osteoblasten differenzierender mesenchymaler Stammzellen wird ebenfalls eine Expression von Sclerostin nach Mineralisationsbeginn (Tag14) beobachtet (van Bezooijen, *et al.*, 2004). Hier wird Sclerostin aber vermutlich auch von Osteozyten-ähnlichen Zellen in der bereits mineralisierten Matrix exprimiert.

Die Osteozyten regulieren die Knochenhomöostase auf unterschiedliche Weise, z.B. durch die Reaktion auf mechanische Belastung. Es konnte gezeigt werden, dass als direkte Folge der Belastung die Expression von Sclerostin und anderen Proteinen wie z.B. Dickkopf (Dkk) durch die Osteozyten vermindert wurde und dies zu einer Zunahme der Masse und des Volumens des belasteten Knochens führte (Robling, *et al.*, 2008). Außerdem wird Sclerostin während der Remodellierung eines Osteons erst von Osteozyten produziert, die in einem gewissen Abstand zur Stelle der aktuellen Knochenbildung durch die Osteoblasten lokalisiert sind (Poole, *et al.*, 2005b). Sclerostin fungiert somit als starker negativer Regulator des Knochenwachstums und gibt den Osteozyten die Möglichkeit die Menge an neu gebildetem Knochen zu regulieren. Da Sclerosteosepatienten eine verstärkte Knochenbildung bei normaler Resorptionsrate aufweisen, beeinflusst Sclerostin also nicht die Osteoklasten, sondern inhibiert die Funktion von Osteoblasten. Es wird angenommen, dass Sclerostin von den Osteozyten durch das Canalicullisystem direkt an seinen Wirkort, den Osteoblasten und Knochenwandzellen transportiert wird, wo es diese in einem inaktivierten Zustand hält. Hier greift Sclerostin inhibierend in die verschiedenen Entwicklungsstadien der Osteoblasten ein. Es wirkt antiproliferativ auf mesenchymale Stammzellen, verhindert die Differenzierung dieser mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten und die Mineralisation der Matrix (Kusu, *et al.*, 2003, van Bezooijen, *et al.*, 2004, Winkler, *et al.*, 2003). Außerdem induziert es Apoptose in Osteoblasten (Sutherland, *et al.*, 2004) (siehe Abbildung 7).

Aufgrund der Zugehörigkeit zur DAN-Familie und der inhibierenden Wirkung auf verschiedene Stadien der Osteoblastenlinie wurde Sclerostin zunächst als Inhibitor des BMP-Signalwegs eingestuft (Kusu, *et al.*, 2003, Winkler, *et al.*, 2003). Die Fähigkeit Sclerostins die durch BMPs induzierte ektope Knochenbildung im Muskel von Mäusen zu verhindern und eine durch BMP-induzierte Expression von alkalischer Phosphatase dosisabhängig zu hemmen, scheint diese These zunächst zu bestätigen (Kusu, *et al.*, 2003, van Bezooijen, *et al.*, 2007, Winkler, *et al.*, 2003). Außerdem belegen Ko-Immunopräzipitation und SPR-Bindungsstudien scheinbar die Bindung von Sclerostin an BMPs (Kusu, *et al.*, 2003, Winkler,

et al., 2003). Trotzdem zeigt Sclerostin keinerlei inhibitorischen Effekt auf direkt durch BMP-vermittelte Ereignisse wie die Smad1/5/8 Phosphorylierung oder die Aktivierung eines BMP-responsiven Reportergens, was einer Funktion von Sclerostin als klassischem BMP-Antagonisten widerspricht (van Bezooijen, *et al.*, 2004, van Bezooijen, *et al.*, 2007). Winkler *et al.* hatten zwar die Inhibition der Smad-Phosphorylierung durch Sclerostin in C3H10T1/2 Zellen nachgewiesen, dies konnte aber von R.L. van Bezooijen *et al.* nicht bestätigt werden (Winkler, *et al.*, 2003), (van Bezooijen, *et al.*, 2005).

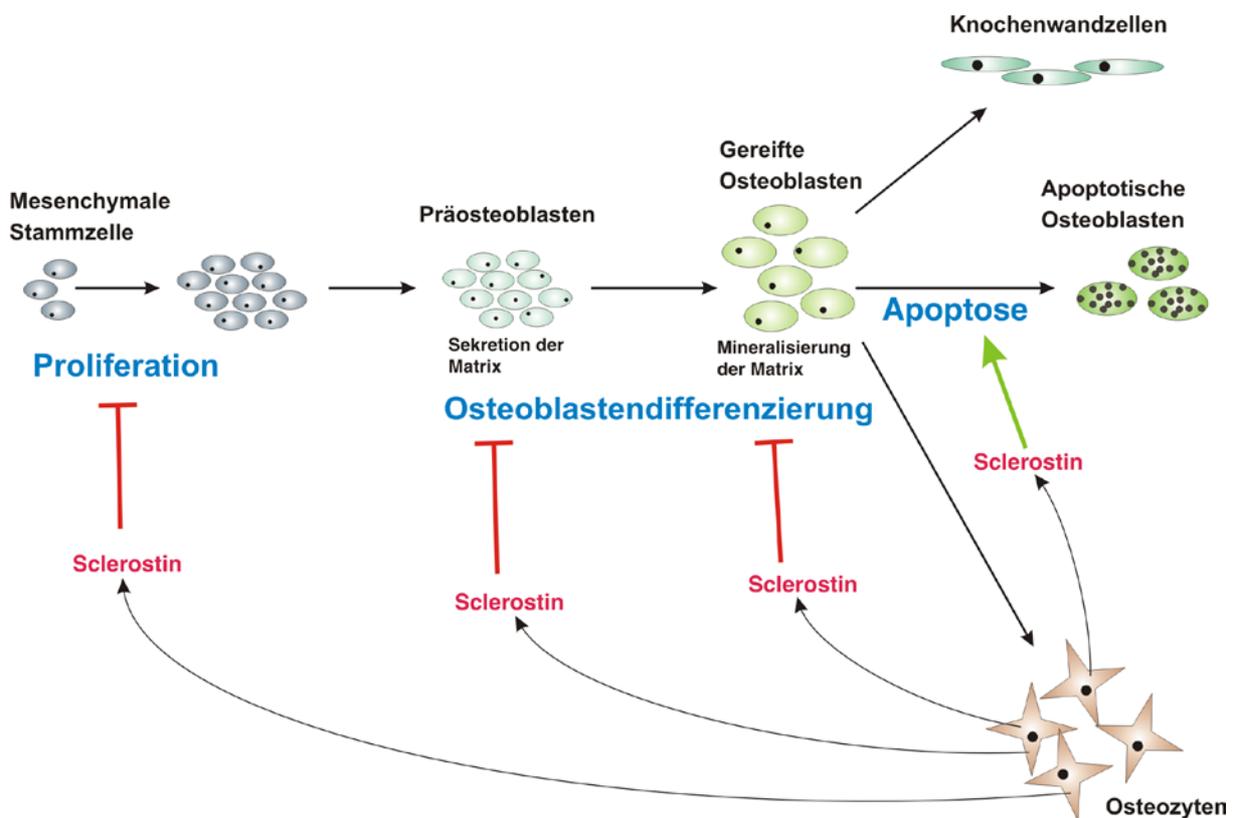


Abbildung 7: Einfluss von Sclerostin auf die verschiedenen Stadien der Osteoblastendifferenzierung. Sclerostin wird von den im Knochen eingebetteten Osteozyten exprimiert und sekretiert. Es wirkt inhibierend auf die Proliferation von mesenchymalen Stammzellen und auf die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblastenvorläuferzellen und dann zu reifen Osteoblasten, die für die Mineralisation der Matrix verantwortlich sind. Darüber hinaus induziert Sclerostin auch die Apoptose von reifen Osteoblasten. Abbildung nach ten Dijke *et al.* 2008, JBJs, 90 (ten Dijke, *et al.*, 2008).

Neuere Studien zeigten, dass Sclerostin die durch Wnt8 induzierte ektope Achsenduplikation in *Xenopus laevis* Embryos verhindert (Ellies, *et al.*, 2006, Semenov, *et al.*, 2005). Darüber hinaus inhibiert Sclerostin dosisabhängig die Aktivierung eines TCF/LEF-responsiven

Einleitung

Reportergens, was Sclerostin somit als direkten Antagonisten des Wnt- β -Catenin-Signalwegs ausweist (Li, *et al.*, 2005, Semenov, *et al.*, 2005).

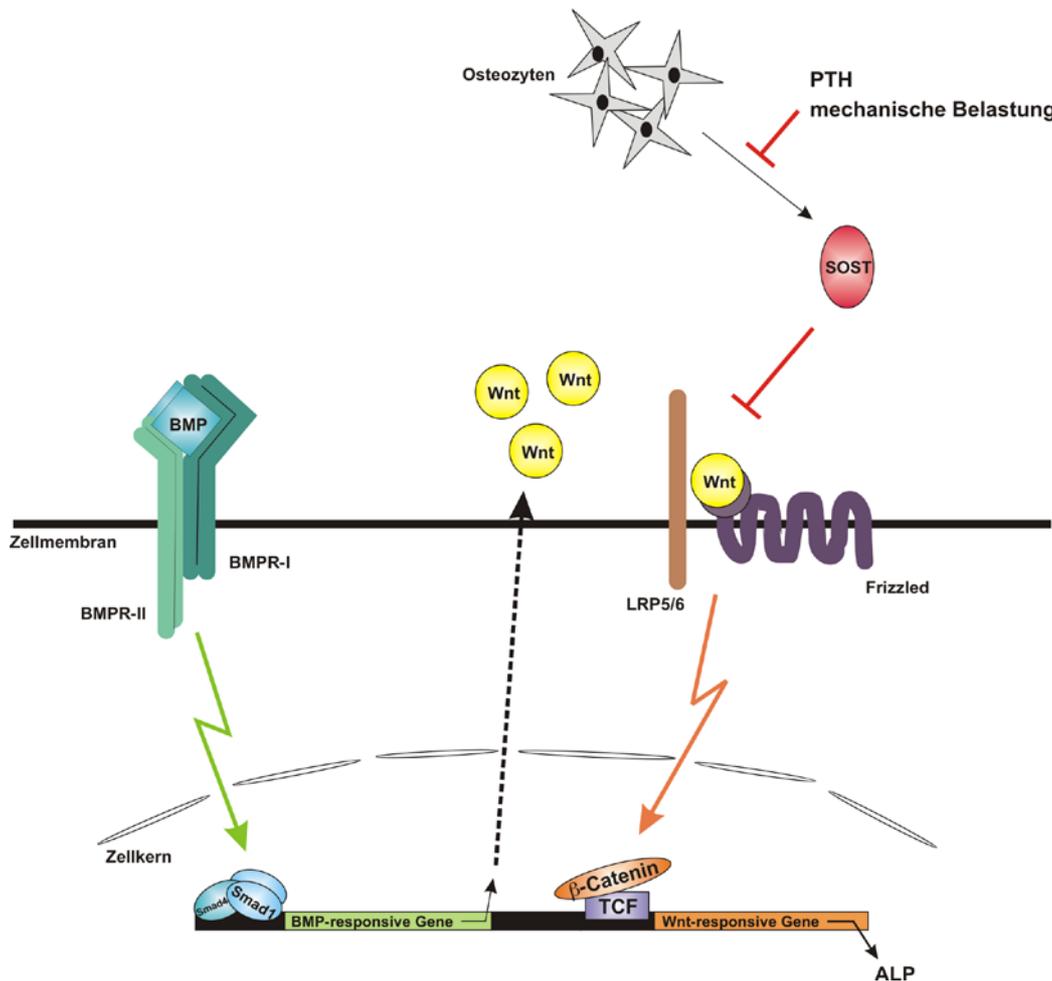


Abbildung 8: Zusammenspiel des BMP- und des Wnt- β -Catenin-Signalwegs zur Bildung von alkalischer Phosphatase (ALP) in Osteoblasten. Die Aktivierung des BMP/Smad1/5/8-Signalwegs führt zur Expression und Sekretion von Wnt-Proteinen. Diese aktivieren den Wnt- β -Catenin-Signalweg, der zur Expression der alkalischen Phosphatase und anderer für die Knochenbildung wichtiger Faktoren führt. Sclerostin wird von Osteozyten sekretiert, was durch mechanische Belastung oder Einwirken von PTH inhibiert werden kann. Sclerostin seinerseits fungiert als Inhibitor des Wnt- β -Catenin-Signalwegs und verhindert so die Bildung von neuem Knochengewebe sowie die Expression von alkalischer Phosphatase. Abbildung nach ten Dijke *et al.* 2008, JBJS, 90 (ten Dijke, *et al.*, 2008).

Einige der BMP antagonistischen Effekte Sclerostins können damit erklärt werden, dass beide Signalwege während der Differenzierung zu Osteoblasten miteinander gekoppelt sind. Eine Aktivierung des BMP-Signalwegs führt zur Expression von Wnt-Proteinen, die den Wnt- β -Catenin-Signalweg aktivieren und unter anderem die Expression der alkalischen Phosphatase induzieren (Rawadi, *et al.*, 2003). So kommt es dazu, dass Sclerostin späte, also Wnt-

vermittelte BMP-Effekte wie die Induktion der alkalischen Phosphatase oder die ektope Knochenbildung hemmt (siehe Abbildung 8).

1.4 Der kanonische Wnt- β -Catenin-Signalweg

Wnt („Wingless“ und Int-1) Proteine bilden eine Proteinfamilie von palmitylierten sekretierten Glykoproteinen mit hoher Aminosäuresequenzhomologie (unter anderem durch über 20 konservierte Cysteinreste in ihrer Aminosäuresequenz). In Säugern sind 19 Wnt-Proteine bekannt, die durch Bindung an einen der zehn Frizzled-Rezeptoren, eine der drei bekannten Wnt-Signalkaskaden auslösen, zu denen der kanonische Wnt- β -Catenin-Signalweg, der Wnt/Ca²⁺-Signalweg und der Wnt/planar-polare-Signalweg zählen (Behrens, *et al.*, 1996, Habas, *et al.*, 2003, Wang, *et al.*, 2003). Der zuerst beschriebene und mittlerweile am besten erforschte Wnt-Signalweg ist der kanonische Wnt- β -Catenin-Signalweg, der durch zytoplasmatische Modifikation von β -Catenin vermittelt wird (Behrens, *et al.*, 1996). Er spielt eine besondere Rolle für den Knochenaufbau und die Knochenhomöostase. Der Signalweg kontrolliert die zytosolische β -Catenin-Konzentration und seine Lokalisation in der Zelle (Aberle, *et al.*, 1997). In Abwesenheit von Wnt-Proteinen oder wenn die Bindung von Wnt an die Rezeptoren Frizzled oder LRP5/6 durch Inhibitoren verhindert wird, wird das zytosolische β -Catenin durch verschiedene Kinasen (Glycogen Synthase Kinase 3 β (GSK-3 β) und Caseinkinase 1 (CK1)) im Komplex mit Axin, APC („adenomatous polyposos coli“) phosphoryliert, wodurch es für die Ubiquitinierung und den Abbau durch das 26S Proteasom markiert wird (Aberle, *et al.*, 1997, Behrens, *et al.*, 1998, Siegfried, *et al.*, 1992) (siehe Abbildung 9A). In Anwesenheit der Wnt-Proteine des kanonischen Wnt- β -Catenin-Signalwegs (Wnt1, Wnt2, Wnt3, Wnt3a, Wnt8 und Wnt8b) kommt es zur Formation des Signalkomplexes aus Wnt, Frizzled und LRP5 bzw. LRP6, was zu einer Phosphorylierung der intrazellulären PPP(S/T)P Motive von LRP5/6 führt, wodurch Axin auf zytoplasmatischer Seite in den Komplex rekrutiert wird (Bhanot, *et al.*, 1996, Tamai, *et al.*, 2000, Tamai, *et al.*, 2004, Wehrli, *et al.*, 2000, Wu, *et al.*, 2002, Yang-Snyder, *et al.*, 1996).

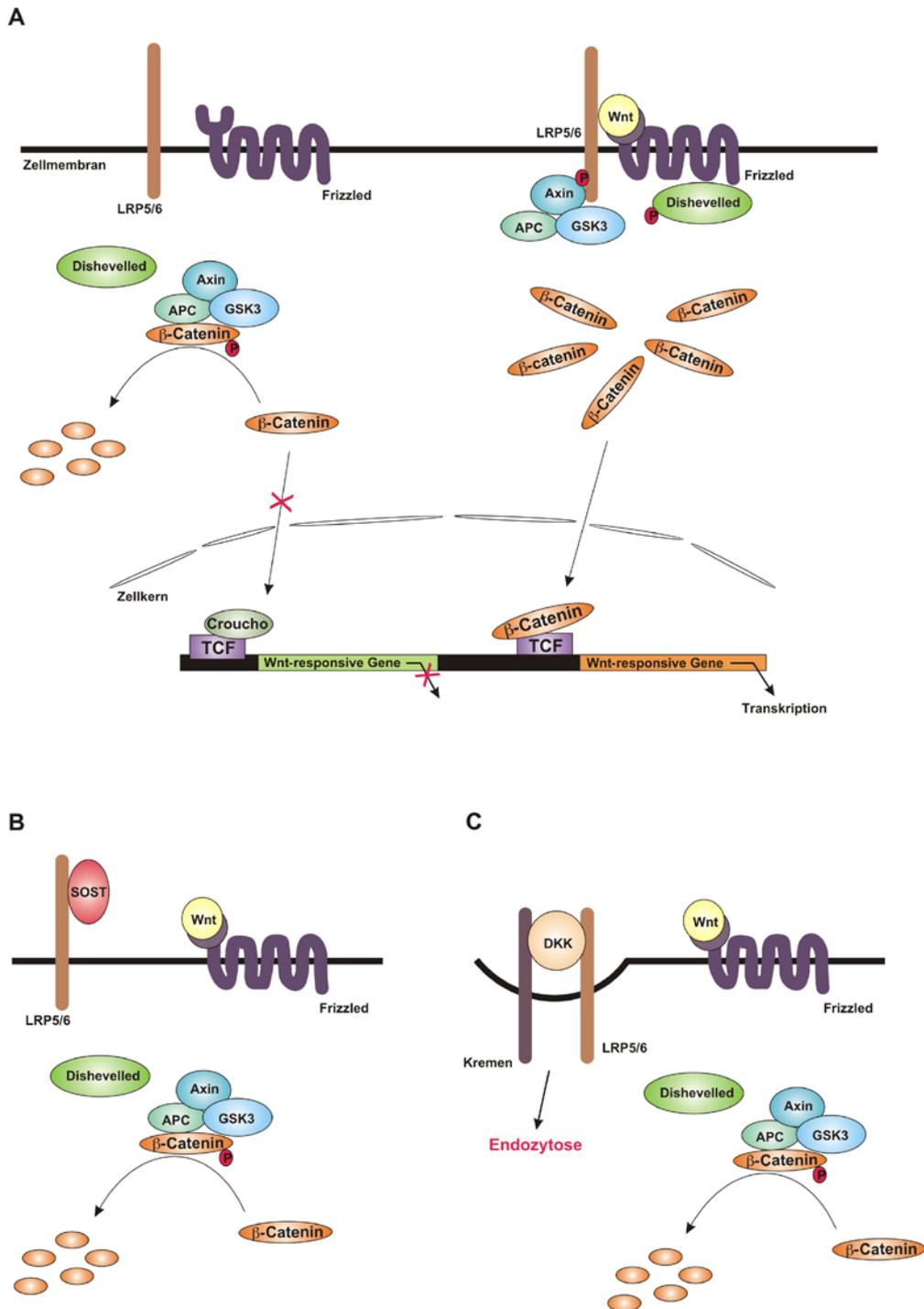


Abbildung 9: Der kanonische Wnt-β-Catenin-Signalweg. A) In Abwesenheit von Wnt-Proteinen wird das im Zytoplasma vorhandene β-Catenin in einen Komplex zwischen APC, Axin, GSK-3 rekrutiert, phosphoryliert, ubiquitiniert und abgebaut. In Anwesenheit von Wnt-Proteinen wird der Signalkomplex zwischen Wnt, Frizzled und LRP5/6 gebildet. Dadurch dissoziiert der Komplex aus APC, Axin, GSK-3 und β-Catenin, welches sich daher im Zytoplasma anhäuft, in den Zellkern wandert und dort nach Bindung an die Transkriptionsfaktoren TCF/LEF die Transkription von Genen, die für das Knochenwachstum nötig sind, einleitet. B) Sclerostin wirkt als Inhibitor des Wnt-β-Catenin-Signalwegs durch die Bindung an LRP5/6, wodurch die Bildung des Signalkomplexes verhindert wird. C) Dkk-Proteine verhindern ebenfalls die Bildung des Signalkomplexes, in dem es an LRP5/6 und Kremen bindet, was zur Endozytose des Signalkomplexes führt.

Durch Bindung von Axin an LRP5/6 und die Bindung von Dishevelled an Frizzled dissoziiert der Komplex bestehend aus β -Catenin/APC/Axin/GSK-3 β . β -Catenin wird nicht mehr phosphoryliert und somit auch nicht mehr abgebaut. Dies führt zu Anhäufung von zytosolischem β -Catenin, welches in den Zellkern wandert, wo es Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie („T cell factor“) bindet, Ko-Repressoren verdrängt und Ko-Aktivatoren rekrutiert. Dadurch wird die Transkription Wnt-responsiver Gene initiiert (Behrens, *et al.*, 1996).

Der kanonische Wnt- β -Catenin-Signalweg wird auf verschiedenen räumlichen Ebenen, extrazellulär, zytosolisch und im Zellkern reguliert. Extrazellulär wird Wnt durch Wif-1 (Wnt inhibitory factor-1), sFRPs (secreted frizzled-related proteins), Dkk-Proteine (Dickkopf), USAG-1 und Sclerostin inhibiert. Wif-1, ein sekretiertes Protein mit konservierter WIF Domäne und sFRPs, lösliche dominant negative Rezeptoren mit einer aminoterminalen Cystein-reichen Domäne (CRD), die hoch homolog und strukturell identisch zu der Liganden-Bindungsdomäne der Frizzled-Rezeptoren ist, regulieren den Wnt-Signalweg durch die direkte Bindung an Wnt, wodurch die Bildung des Signalkomplexes verhindert wird (Hsieh, *et al.*, 1999a, Hsieh, *et al.*, 1999b, Kawano, *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu binden die Dkk-Proteine (Dickkopf-1, -2, -4) an den Ko-Rezeptor LRP5/6 und Kremen1/2. Die Bildung dieses ternären Komplexes führt zur Endozytose des Komplexes, wodurch die Menge von LRP5/6 auf der Zelloberfläche reguliert wird (Mao, *et al.*, 2003, Mao, *et al.*, 2002, Mao, *et al.*, 2001) (siehe Abbildung 9C). Durch Ko-Immunopräzipitationsexperimente und Bindungsstudien von Sclerostin an LRP5 auf ganzen Zellen konnte gezeigt werden, dass Sclerostin ebenfalls an LRP5/6 bindet und durch diese Interaktion den Wnt- β -Catenin-Signalweg inhibiert (Li, *et al.*, 2005, Semenov, *et al.*, 2005) (siehe Abbildung 9B).

Der kanonische Wnt- β -Catenin-Signalweg ist für die Knochenhomöostase von herausragender Bedeutung, was die knochenspezifischen Phänotypen von Deletions- und Überexpressionsstudien Wnt-Signalweg relevanter Proteine in Mausmodellen verdeutlichen. Die Überexpression von Wnt10b in adipösen Mäusen führt zu erhöhter Knochenmasse und macht die Mäuse resistent gegen alters- und hormonell bedingten Knochenverlust (Bennett, *et al.*, 2005). Eine homozygote Deletion von *DKK1* (-/-) resultiert in nicht lebensfähigen Embryonen. Eine reduzierte Dkk1 Expression in haploinsuffizienten Mäusen (*Dkk1* +/-) führt jedoch zu verstärkter Knochenmasse, wohingegen eine Überexpression von Dkk1 in Mäusen Osteopenie verursacht (Li, *et al.*, 2006, Morvan, *et al.*, 2006, Mukhopadhyay, *et al.*, 2001).

Einleitung

Ähnliche Wirkungen werden auch für Sclerostin beobachtet. Eine Überexpression von Sclerostin in transgenen Mäusen unter dem Osteocalcin-Promotor verursacht Osteopenie, die Deletion des *SOST*-Gens (*SOST*^{-/-}) dagegen einen osteosclerotischen Phänotyp mit nahezu identischen Merkmalen wie sie in Sclerosteosepatienten beobachtet werden (Li, *et al.*, 2008, Loots, *et al.*, 2005, Winkler, *et al.*, 2003) (siehe Abbildung 10).

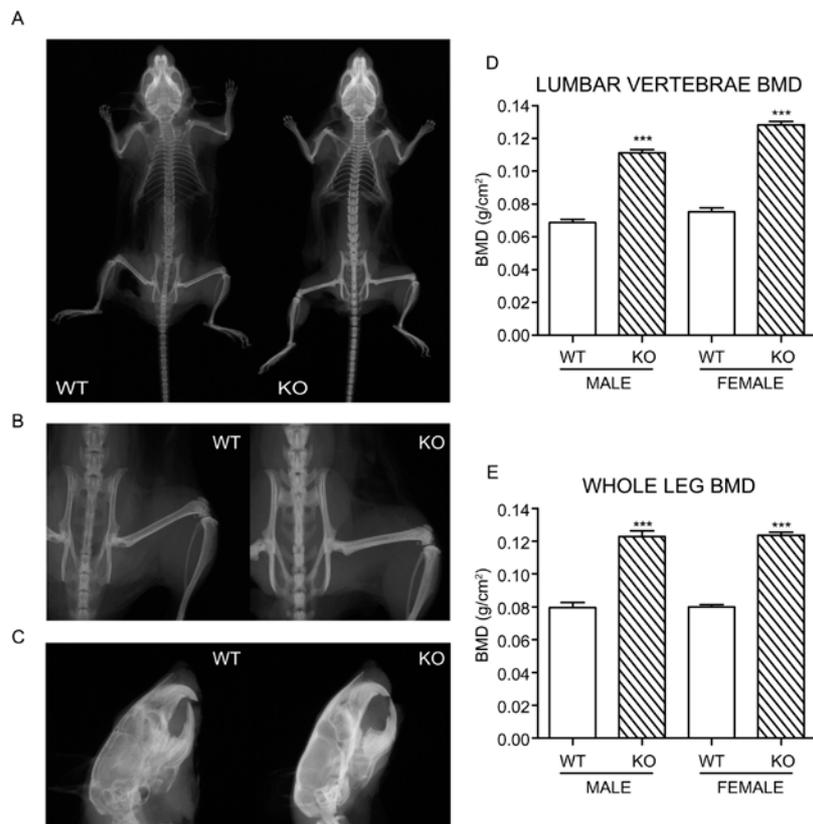


Abbildung 10: Erhöhte Knochendichte in *SOST*^{-/-} Mäusen. A) Ganzkörper-Röntgenaufnahme einer vier Monate alten weiblichen wildtypischen (links) und *SOST*^{-/-} Maus mit deutlich erhöhter Röntgenundurchlässigkeit des Skelettes der *SOST*^{-/-} Maus. B) Vergrößerung der Beckenregion. C) Vergrößerung des Schädels. D) BMD-Wert der Lendenwirbelsäule. E) BMD-Wert des kompletten Beins. BMD-Werte wurden mittels Knochendichtemessung (DXA „dual X-ray absorptiometry“) an fünf bis sechs Monate alten männlichen und weiblichen Mäusen (WT und *SOST*^{-/-}) bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichung für n=11-17 pro Gruppe. ***p < 0.001 bezogen auf den Wildtyp. Abbildung ohne Änderung übernommen aus Li *et al.*, 2008, *JBMR*, 23:862, mit Erlaubnis der American Society for Bone and Mineral Research (Li, *et al.*, 2008).

Für den Wnt Ko-Rezeptor LRP5 sind ebenfalls unterschiedliche Mutationen mit knochenspezifischen Phänotypen bekannt. Mutationen im *LRP5*-Gen, aus denen ein Funktionsverlust des Wnt Ko-Rezeptors LRP5 im Menschen resultiert, führen zu Osteoporosis Pseudoglioma (OPPG), einer seltenen autosomal rezessiven Krankheit, die durch starke Osteoporose und Blindheit charakterisiert ist (Gong, *et al.*, 2001). Andererseits

sind verschiedene HBM-Mutationen („high bone mass“-Mutationen: G171V, D111Y, G171R, A214T, A242T, T253I) des LRP5 Gens bekannt, die eine autosomal dominante Osteosklerose verursachen, mit ähnlichem jedoch etwas abgeschwächtem Phänotyp wie im Fall von Sclerosteose und der Van Buchem Krankheit (Boyden, *et al.*, 2002, Little, *et al.*, 2002, Van Wesenbeeck, *et al.*, 2003). Diese HBM-Mutationen verhindern die Bindung von Sclerostin an LRP5, wodurch es zu einer dauerhaften Wnt-abhängigen Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs kommt (Semenov, *et al.*, 2006).

Interessanterweise modulieren die Funktionsverlust- bzw. Überaktivierungsmutationen der Wnt-Signalweg relevanten Proteine die Knochenbildung und nicht die Resorption. Der kanonische Wnt-Signalweg kontrolliert also in besonderer Weise die Funktion der Osteoblasten. Die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs wirkt proliferativ auf mesenchymale Stammzellen und verhindert die Apoptose von Osteoblasten und deren Vorläuferzellen (Babij, *et al.*, 2003, Baek, *et al.*, 2003, Boland, *et al.*, 2004). Außerdem beeinflusst die Stärke des Wnt-Signals, ob mesenchymale Stammzellen zu Osteoblasten, Myoblasten, Chondrozyten oder Adipozyten differenzieren (Boyden, *et al.*, 2002, Day, *et al.*, 2005, Little, *et al.*, 2002). Die Differenzierung zu Osteoblasten benötigt einen aktivierten Wnt-Signalweg, wodurch die für die Differenzierung zu Adipozyten benötigten Transkriptionsfaktoren C/EBP α und PPAR γ inhibiert werden (Bennett, *et al.*, 2005). Den größten Einfluss hat der kanonische Wnt-Signalweg jedoch während der Differenzierung und Reifung von Osteoblasten. Zu diesen Zeiten werden viele Schlüsselproteine des kanonischen Wnt-Signalwegs exprimiert und reguliert (Kalajzic, *et al.*, 2005). Besonders in der späten Phase der Osteoblastendifferenzierung wird die Expression von Wnt-Antagonisten wie Sfrp2, Wif-1 und Dkk1 induziert. Durch diesen negativen „Feedback Loop“ wird sehr wahrscheinlich der letzte Reifungsschritt und die Mineralisierung der Matrix kontrolliert (Vaes, *et al.*, 2005). Darüber hinaus reguliert der Wnt-Signalweg durch die direkte Transkriptionskontrolle von Osteoprotegerin (OPG) durch TCF/LEF die Differenzierung von Makrophagen zu Osteoklasten (Glass, *et al.*, 2005).

Die Daten der letzten 6 Jahre verdeutlichen den enormen regulatorischen Einfluss des kanonischen Wnt- β -Catenin-Signalwegs auf die Knochenbildung und haben das Interesse der pharmazeutische Industrie geweckt, ein osteoanaboles Therapeutikum zu generieren, welches die Knochenmasse von Osteoporosepatienten regeneriert. Die Aktivierung des Wnt-Signalwegs durch ein putatives osteoanaboles Therapeutikum ist jedoch umstritten, da die

systemische Aktivierung des Signalwegs im Zusammenhang mit der Entstehung von Tumoren steht (Clevers, 2006). Daher besteht die größte Herausforderung in der Beschränkung der Wirkung des Medikaments auf den Knochen. Hierfür eignet sich besonders Sclerostin, da es im adulten Organismus ausschließlich in Osteozyten produziert wird und somit der Wirkort beschränkt ist. Dies bestätigen auch Studien an Ratten, denen im Alter von sechs Monaten die Ovarien entfernt wurden, wodurch sich, durch den Östrogenmangel, nach einem Jahr eine Osteoporose ausgebildet hatte. Durch eine zweiwöchige Behandlung mit Sclerostin neutralisierenden Antikörpern konnte der Knochenverlust wieder ausgeglichen werden und nach drei weiteren Wochen war die Knochendichte sogar größer als in den Kontrollratten (Li, *et al.*, 2009).

1.5 Protein/Protein-Interaktionen zwischen LRP5/6 und Proteinen des Wnt- β -Catenin Signalwegs

LRP5 (low-density lipoprotein-receptor-related Protein 5) bzw. LRP6 gehören zur Unterfamilie der „Low-Density Lipoprotein“ Rezeptoren (LDLR) und sind in Kombination mit Frizzled-Rezeptoren essentiell für den kanonischen Wnt-Signalweg, spielen aber keine Rolle in den β -Catenin unabhängigen Wnt-Signalwegen, in denen das Signal einzig durch definierte Frizzled-Rezeptoren weitergeleitet wird. Sie sind Transmembran-Rezeptoren mit nur einem Transmembransegment, bestehen aus 1615 (LRP5) bzw. 1613 (LRP6) Aminosäuren und weisen 71% Sequenzidentität auf (Tamai, *et al.*, 2000). Die zytoplasmatische Domäne ist reich an Prolinen und Serinen, die fünf, sich wiederholende PPP(S/T)P Motive bilden (siehe Abbildung 11A). Phosphorylierung innerhalb dieser Motive führt zur Bildung der Axin-Bindestellen (Tamai, *et al.*, 2004). Der zytoplasmatische Teil enthält keinerlei bekannte katalytische Motive und zeigt keine Homologie zu den zytoplasmatischen Domänen der LDL-Rezeptoren. Die extrazelluläre Domäne setzt sich aus drei Grundmotiven zusammen, der nach dem Aminosäuresequenzmotiv YWTD (Tyrosin, Tryptophan, Threonin und Asparaginsäure) benannten YWTD-Typ- β -Propeller Domäne, der EGF („epidermal growth factor“-)ähnlichen Domäne und der LDLR-Typ A (LA) Domäne, die alle zu den typischen Modulen der LDLR-Familie gehören. Die YWTD-Typ- β -Propeller Domäne besteht aus sechs YWTD Einheiten von 43-50 Aminosäuren. Die konservierten Reste YWTD (Tyrosin, Tryptophan, Threonin und Asparaginsäure) befinden sich jeweils am Anfang der Einheit. Sechs YWTD Einheiten formen hierbei einen sechsblättrigen β -Propeller,

wie aus den Kristallstrukturen einzelner YWTD-Typ- β -Propeller Domänen bekannt ist (Jeon, *et al.*, 2001, Rudenko, *et al.*, 2002, Takagi, *et al.*, 2003) (siehe Abbildung 11B).

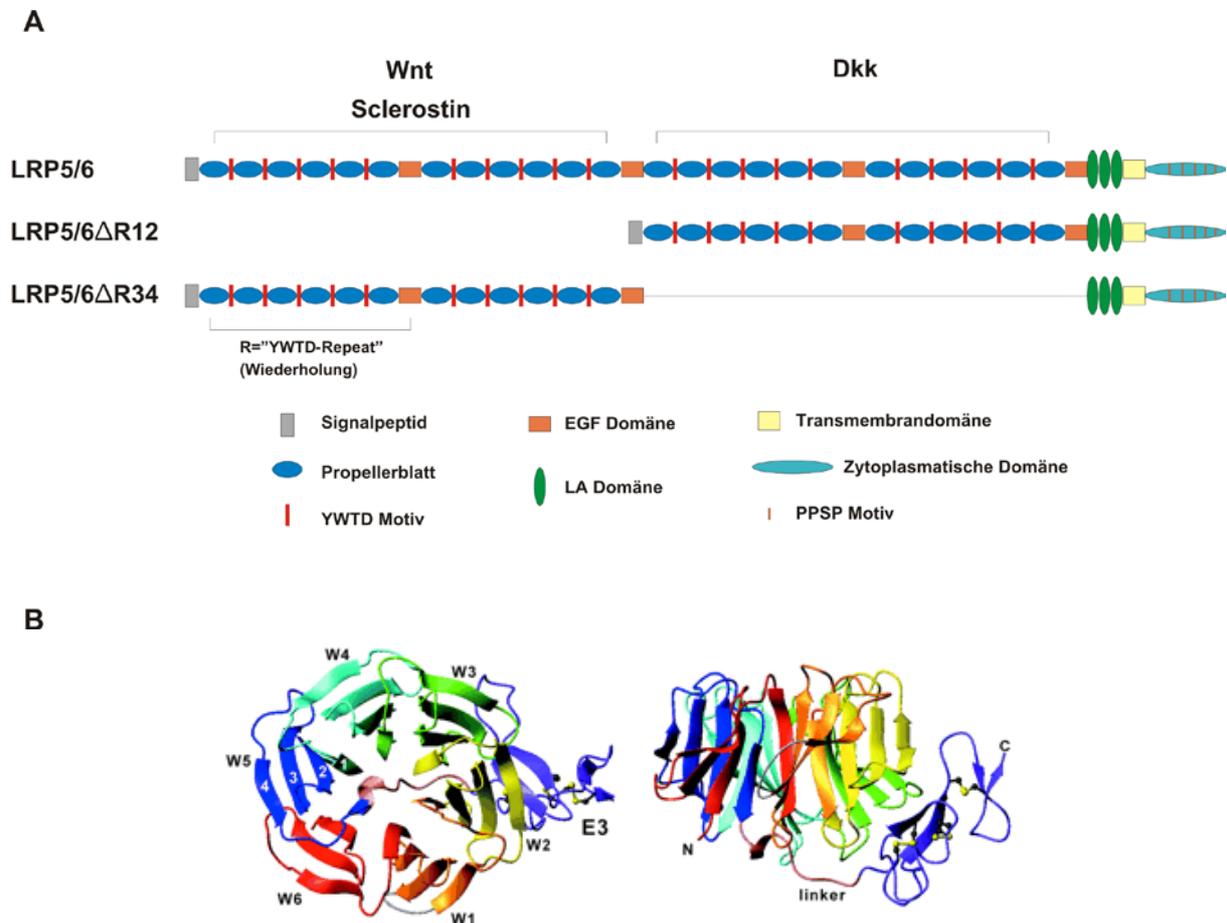


Abbildung 11: A) Domänenstruktur von LRP5/6, sowie verschiedener Deletionskonstrukte. Die für die Bindung von Wnt, Sclerostin und Dkk benötigten Domänen sind eingeklammert. Im Fall von LRP5/6 Δ R12 sind die beiden ersten YWTD-Typ- β -Propeller Domäne und EGF-ähnlichen Domänen deletiert. R bedeutet „YWTD-Repeat“ (Wiederholung) und steht für einen β -Propeller und eine EGF-ähnliche Domäne. Abbildung nach Ai *et al.*, 2005, Mol Cell Biol (Ai, *et al.*, 2005). B) Bänderdarstellung der YWTD-Typ- β -Propeller Domäne und angehängter EGF-ähnlicher Domäne (E3) des LDL-Rezeptors. Links: Blick von oben auf den sechsblättrigen β -Popeller. Rechts: Seitenansicht des β -Propellers. Abbildung wurde aus Joen *et al.*, 2001, Nat Struct Biol, ohne Änderungen übernommen, mit Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: Nature Structure Biology, 2001 (Jeon, *et al.*, 2001).

Der extrazelluläre Teil von LRP5 bzw. LRP6 besteht aus vier YWTD-Typ- β -Propeller Domänen, die jeweils von einer EGF-ähnlichen Domäne unterbrochen werden. Die EGF-ähnliche Domäne besteht aus etwa 40 Aminosäuren mit konservierten Cysteinen, die intramolekulare Disulfidbrücken bilden. N-terminal der Transmembrandomäne befinden sich noch drei LA-Domänen, die den LDL-Rezeptoren als Bindestellen für LDL dienen.

Einleitung

Für den extrazellulären Teil von LRP5/6 sind mehrere Interaktionspartner beschrieben. Ko-Immunoprecipitationsstudien zeigten, dass Wnt-Proteine nicht nur Frizzled-Rezeptoren, sondern auch LRP5/6 direkt binden können, wodurch der aktive Signalkomplex des kanonischen Wnt- β -Catenin-Signalwegs entsteht (Itasaki, *et al.*, 2003, Tamai, *et al.*, 2000). Die Bindungsaffinitäten der Interaktion von Wnt-Proteinen mit der extrazellulären Domäne verschiedener Frizzled-Rezeptoren liegen im nanomolaren Bereich (Rulifson, *et al.*, 2000, Wu, *et al.*, 2002). Für die Interaktion von Wnt-Proteinen mit LRP5/6 wurden bisher allerdings noch keine kinetischen Bindungsparameter bestimmt. Reporter-gen-Nachweisverfahren mit verschiedenen LRP6 Konstrukten zeigten, dass im Fall einer Deletion der ersten beiden YWTD-Typ- β -Propeller und EGF-ähnlichen-Domänen von LRP6 die TCF/LEF-abhängige Luciferase nur noch basal exprimiert wurde. Daraus kann geschlossen werden, dass für die Bindung von Wnt an LRP5/6 die ersten beiden YWTD-Typ- β -Propeller und EGF-ähnliche-Domänen benötigt werden (Mao, *et al.*, 2001).

Für die Wnt- β -Catenin-Signalweg-Antagonisten Dkk-1/-2 ist eine Bindung an LRP5/6 und Kremen1/2 beschrieben, die zu Endozytose des trimeren Komplexes führt (Mao, *et al.*, 2002). Die Bindung von Dkk-1/-2 an LRP5/6 wurde durch unterschiedliche Experimente wie Ko-Immunoprecipitation und direkte Bindungsstudien an mit LRP6 transfizierten HEK293T-Zellen belegt und es konnte gezeigt werden, dass die Affinität der Dkk-Bindung mit etwa 0.5×10^{-9} M im subnanomolaren Bereich liegt (Mao, *et al.*, 2001). Auch die Kremen-Rezeptoren sind hochaffine Rezeptoren für Dkk-Proteine mit vergleichbaren Bindungsaffinitäten an mit Kremen transfizierten HEK293T-Zellen (Mao, *et al.*, 2002). Studien mit verschiedenen LRP6-Deletionskonstrukten zeigten, dass Dkk-1 als Fusionsprotein mit alkalischer Phosphatase (Dkk-1-ALP) sowohl an LRP6 Δ 12 (siehe Abbildung 11A) bindet, in dem die ersten beiden YWTD-Typ- β -Propeller- und EGF-ähnlichen-Domänen deletiert sind, als auch an LRP6 Δ 34, in dem die dritte und vierte YWTD-Typ- β -Propeller- und EGF-ähnlichen-Domänen deletiert sind (Li, *et al.*, 2005). Dkk-1 vermag also alle YWTD-Typ- β -Propeller von LRP5/6 zu binden. Jedoch nur die Deletion der dritten und vierten (LRP6 Δ 34) oder nur der dritten (LRP6 Δ 3) YWTD -Typ- β -Propeller- und EGF-ähnlichen-Domäne von LRP5/6 führt dazu, dass auch der inhibierende Einfluss von Dkk-1 auf das Wnt-Signal im Reporter-gen-Nachweisverfahren verloren geht (Mao, *et al.*, 2001, Zhang, *et al.*, 2004).

Auch für Sclerostin und USAG-1 wurde gezeigt, dass sie an die extrazelluläre Domäne von LRP5/6 binden (Itasaki, *et al.*, 2003, Li, *et al.*, 2005). Durch Ko-Immunopräzipitationsexperimente konnte gezeigt werden, dass für die Bindung von USAG-1 an LRP5/6 die ersten beiden YWTD-Typ- β -Propeller- und EGF-ähnlichen-Domänen benötigt werden (Itasaki, *et al.*, 2003). Das gilt auch für Sclerostin, wie durch Bindungsstudien von Sclerostin als Fusionsprotein mit alkalischer Phosphatase (Sclerostin-ALP) an mit LRP5 Δ R12 - oder LRP5 Δ R34-transfizierte Zellen bewiesen wurde (Li, *et al.*, 2005). Der Vergleich der Sclerostin-ALP-Bindung an mit LRP5 Δ R12 - oder LRP5 Δ R34-transfizierten Zellen mit der Bindung von Dkk-1-ALP an diese ergab, dass die Bindeaffinität der Sclerostin-ALP Bindung an LRP5 Δ R34 vergleichbar mit der Bindeaffinität der Dkk-1-LRP5 Δ R12 Bindung ist und somit ebenfalls im nanomolaren Bereich liegen muss (Li, *et al.*, 2005).

Außerdem wurde die Bindung von Sclerostin-ALP an verschiedene LRP5-Mutanten untersucht. Hierfür wurden HEK293T Zellen mit den Mutanten LRP5-D111A, LRP5-D418A und der Doppelmutante LRP5-D111A-D418A transfiziert und Sclerostin-ALP enthaltendes Medium zugesetzt. Asp¹¹¹ ist im ersten YWTD-Typ- β -Propeller und Asp⁴¹⁸ im zweiten YWTD-Typ- β -Propeller von LRP5 lokalisiert. Die Mutationen D111A gehört zu den HBM-Mutationen („High Bone Mass“) von LRP5, welche eine verringerte Sclerostinbindung aufweisen, was zu einer Überaktivierung des Wnt-Signalwegs und somit zu einer erhöhten Knochendichte führt (Semenov, *et al.*, 2006). Sclerostin-ALP zeigte eine reduzierte Bindung an beide Einzelmutanten (ca. 30%) und eine Reduktion der Bindung um 80% im Fall der Doppelmutante (Li, *et al.*, 2009). Es werden somit wahrscheinlich beide YWTD-Typ- β -Propeller-Domänen und EGF-ähnlichen Domänen von LRP5/6 benötigt, um Sclerostin zu binden. Wnt-Proteine binden LRP5 ebenfalls in diesem Bereich. Ein möglicher Inhibitionsmechanismus für Sclerostin wäre demnach die Konkurrenz mit Wnt-Proteinen um dieselbe Bindestelle. Konkurrenzstudien mit Sclerostin-ALP-Fusion und murinem Wnt3a oder Sclerostin-ALP-Fusion und Dkk-1 an mit LRP5 Δ R34-transfizierten HEK293T-Zellen zeigten jedoch, dass murines Wnt3a keinen Einfluss auf die Bindung von Sclerostin an LRP5 hat. Dkk-1 hingegen verhindert eine Bindung von Sclerostin-ALP an LRP5 Δ R34 (Li, *et al.*, 2009). Diese Beobachtungen sprechen gegen einen Mechanismus bei dem Sclerostin und Wnt um die Bindung an LRP5 konkurrieren und dafür, dass Dkk-Proteine und Sclerostin ähnliche Bindeepitope in LRP5 benutzen.

Sowohl für Sclerostin als auch für Dkk-1 wurde beobachtet, dass bei Überexpression von LRP5, die Fähigkeit verloren geht, die TCF/LEF-kontrollierte Luciferaseexpression in einem Reporter-gen-Nachweisverfahren zu inhibieren (Li, *et al.*, 2005). Für Dkk-1 wird das

Einleitung

Verhalten auf eine limitierte Anzahl von Kremen-Rezeptoren zurückgeführt, wodurch nur ein Teil der LRP5-Rezeptoren durch Endozytose von der Zelloberfläche entfernt wird. Für Sclerostin deuten diese Beobachtungen auf einen Dkk-ähnlichen Mechanismus hin. Es wurde jedoch bisher noch kein Sclerostin-Korezeptor gefunden.

Die genannten Fakten machen deutlich, welches Potential die Sclerostin-LRP5/6 Interaktion für die Entwicklung eines osteoanabolen Therapeutikums bietet. Es wird aber auch deutlich, dass viele Fragen bezüglich des Inhibitionsmechanismus von Sclerostin auf den Wnt- β -Catenin Signalweg noch offen sind. So stellt sich die Frage nach der Beteiligung eines Ko-Rezeptors, wie im Fall von Dkk oder nach der Rolle, die Sclerostins im BMP-Signalweg spielt.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die beide Hyperosteosen Sclerosteose und Van Buchem Krankheit resultieren aus einem Defekt im Bereich des *SOST*-Allels, welches für das Protein Sclerostin, einem Antagonisten des kanonischen Wnt- β -Catenin-Signalwegs, kodiert. Der Verlust des Proteins führt zu einer zeitlebens anhaltenden Vermehrung der Knochenmasse, wobei sich das gebildete Knochengewebe dieser Patienten durch enorme Festigkeit und gute Qualität auszeichnet. Das Fehlen von extraskelettalen Manifestationen dieser Krankheiten spricht dafür, dass Sclerostin im adulten Organismus ausschließlich im Knochengewebe exprimiert wird. Diese lokale Begrenzung macht Sclerostin zu einem hochinteressanten Zielmolekül für ein osteoanaboles Therapeutikum gegen Osteoporose, welches den kanonischen Wnt- β -Catenin-Signalweg der Knochenzellen adressiert, ohne diesen wichtigen Signalweg in anderen Geweben zu beeinflussen.

Der molekulare Inhibitionsmechanismus von Sclerostin ist bisher nicht im Detail charakterisiert. Es wird angenommen, dass Sclerostin durch die Bindung an den Wnt-Ko-Rezeptor LRP5/6 den Signalweg inhibiert. Wie beide Proteine interagieren, und ob noch weitere Proteine an der Inhibition des Wnt-Signalwegs durch Sclerostin beteiligt sind, ist bisher unklar.

Durch die strukturelle und funktionelle Charakterisierung Sclerostins sollte im Rahmen dieser Arbeit dazu beigetragen werden, die molekularen Wirkmechanismen des Proteins als Knochenwachstumsmodulator und Wnt-Signalweg-Antagonist weiter aufzuklären. Hierfür

sollte Sclerostin zunächst rekombinant gewonnen und anschließend biophysikalisch und biochemisch analysiert werden. Außerdem sollte in Kooperation das rekombinante Sclerostin für die Herstellung von Anti-Sclerostin Fab-Fragmenten verwendet werden, die als Hilfsmittel für strukturelle und biologische Fragestellungen, wie z.B. die Charakterisierung der Bindeepitope der Sclerostin-LRP5/6-Interaktion, genutzt werden können.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Alle eingesetzten Chemikalien und Enzyme wurden in der jeweils höchsten Qualität und Reinheit von den folgenden Firmen bezogen: Amersham-Pharmacia, AppliChem, Beckman Coulter, BioWest, Boehringer, Fermentas, Fluka, Gibco, InvivoGen, Merck, NEB Biolabs, Novagen, Pierce, Promega, Qiagen, R&D, Roth, Serva, Sigma.

2.1.2 Vektoren

Vektor	Eigenschaften
pAcGP67B-10xHis (Pharmingen) (modifiziert)	Baculovirus-Transfer- und Expressionsvektor zur Expression in <i>Sf9</i> -Insektenzellen; Amp ^R ; gp67-Signalsequenz zur Sekretion ins Medium; C-terminaler 10xHis-Tag
pET-28b (Novagen)	<i>E.coli</i> -Expressionsvektor; T7/ <i>lac</i> Promotor; Kan ^R ; N- oder C-terminaler 6xHis-Tag; N-terminale Hexahistidinsequenz durch Thrombin abspaltbar
pMK1 modifizierter pBAC-3 (Novagen)	Baculovirus-Transfer- und Expressionsvektor zur Expression in <i>Sf9</i> -Insektenzellen; Amp ^R ; gp64-Signalsequenz zur Sekretion ins Medium; N-terminale Hexahistidinsequenz durch Thrombin abspaltbar; beruht auf pBAC-3 (Novagen); ursprüngliche BamHI-Schnittstelle wurde zerstört, neue BamHI-Schnittstelle wurde in der Thrombin-Spaltstelle geschaffen
pEF6/V5-HisA (Invitrogen)	Expressionsvektor zur Expression in Säugerzellen, Amp ^R und Blasticidinresistenzgen, C-terminales V5-Epitop und Hexahistidinsequenz,
M50 (Veeman, <i>et al.</i> , 2003)	„Firefly“-Luciferase Expressionsplasmid (pTA-Luc Vector (Clontech) mit TCF/LEF-responsiven Promotorelement, Amp ^R
pSV β -Gal (Promega)	β -Galaktosidase Expressionsplasmid, Amp ^R

Tabelle 1: Vektoren

2.1.3 Kulturmedien

LB-Medium	10g/l Bacto-Trypton, 5g/l Bacto-Hefe-Extrakt, 10g/l NaCl; mit 2M NaOH auf pH7,5 eingestellt
TB-Medium	13.3g/l Bacto-Trypton, 26.6g/l Bacto-Hefe-Extrakt, 4.4ml/l Glycerin, 10% (v/v) 10xPhosphatlösung
10xPhosphatlösung	0.17M KH_2PO_4 , 0.72M K_2HPO_4
10x M9-Minimalmedium	42mM Na_2HPO_4 , 22mM KH_2PO_4 , 8.6mM NaCl, pH7.2-7.4 Zusätze siehe Kap.: 2.3.2
LB-Agar-Platten	40g/l LB-Agar-Pulver (AppliChem), 0.2% NaOH
SOC-Medium	20g/l Bacto-Trypton, 5g/l Bacto-Hefe Extrakt, 0.5g/l NaCl; nach dem Autoklavieren werden noch 10mM MgCl_2 , 10mM MgSO_4 und 20mM Glucose in Form von sterilen Stammlösungen zugegeben
IPL41-Medium	27.2g/l IPL41-Pulver (HyClone), 0.35g/l NaHCO_3 , 2.6g/l NaCl, 4g/l Hefe-Extrakt; mit 2M NaOH auf pH6.2 einstellen; Medium steril filtrieren, danach Zugabe von 1% (v/v) 100xLipid-Mix (Sigma); vor Gebrauch werden noch 5% (v/v) FCS und 100U/ml Penicillin-G, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin zugegeben
DMEM	DMEM Medium (Invitrogen)
α MEM	α MEM Medium (Invitrogen)
HEK-Kulturmedium	DMEM Medium, 10% (v/v) FCS und 100U/ml Penicillin-G, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin
L-mWnt3a-Kulturmedium	DMEM Medium, 10% (v/v) FCS und 100U/ml Penicillin-G, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin, 0,4mg/ml G418 Sulfat (BioWest)
C3H10T1/2-BRE-luc-Kulturmedium	DMEM Medium, 10% (v/v) FCS und 100U/ml Penicillin-G, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin, 0,2mg/ml G418 Sulfat (BioWest)
MC3T3E1-Kulturmedium	α MEM Medium, 10% (v/v) FCS und 100U/ml Penicillin-G, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin
Osteogenes Medium	α MEM, 1% (v/v) FCS, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ascorbinsäure, 10mM β -Glycerophosphat, 2mM Glutamin, 100U/ml Penicillin-G, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin, 300ng/ml BMP2

Tabelle 2: Verwendete Kulturmedien

Für die Bakterienkultur werden die Medien autoklaviert und anschließend die entsprechenden Antibiotika in folgenden Konzentrationen zugesetzt: 100µg/ml Ampicillin, 100µg/ml Kanamycin, 36µg/ml Chloramphenicol, 12.5µg/ml Tetrazyklin.

2.1.4 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp
<i>Escherichia coli</i> NovaBlue™ (Novagen)	endA1 hsdR17 (<i>r_{k12}</i> ⁻ <i>m_{k12}</i> ⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F'[proA ⁺ B ⁺ lacI ^q ZΔM15::Tn10] (Tet ^R)
<i>Escherichia coli</i> Rosetta™(DE3) (Novagen)	F <i>ompT</i> hsdS _B (<i>r_B</i> ⁻ <i>m_B</i> ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) pRARE (Cam ^R)

Tabelle 3: Verwendete Bakterienstämme

2.1.5 Oligonukleotide

mSOST_BamHI_s: 5' TTTTGGATCCGAGGGCCAGGGGTGGCAAG
mSOST_NdeI_s: 5' TTTTCATATGGAGGGCCAGGGGTGGCAAG
mSOST_DN_NdeI_s: 5' TTTTCATATGAATGGAGGCAGACCTCCCCACCATC
mSOST_St_XhoI_as: 5' TTTCTCGAGTCAGTAGGCGTTCTCCAGCT
mSOST_DC_St_XhoI_as: 5' TTTCTCGAGTTACTAGCGCTTGCACCTGCACGAGGCCA

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Polymerasekettenreaktion

Für eine Standard-PCR-Reaktion werden folgende Komponenten pipettiert:

Volumen	Komponente
x μ l	DNA-Matrize
2 μ l	Primer sense 10pmol/ μ l
2 μ l	Primer antisense 10pmol/ μ l
5 μ l	dNTP-Mix 2.5mM
10 μ l	Phusion Puffer 5x
30.5-x μ l	ddH ₂ O
0.5 μ l	Phusion Polymerase

Tabelle 4: Pipettierschema für eine PCR-Reaktion

Die PCR-Reaktion wird im Thermocycler (Biometra TGradient) für 3min auf 98°C erhitzt. Dabei denaturiert die enthaltene DNA. Nun wird ein Programm bestehend aus drei Schritten gestartet: 1) 30sec bei 98°C (Denaturierung der DNA), 2) 30sec bei 53°C (Anlagerung der Primer an die komplementären Einzelstränge der DNA), 3) 1min bei 72°C (Synthese der DNA-Fragmente). Diese drei Schritte werden dreißigmal wiederholt und anschließend wird für 10min bei 72°C inkubiert.

Die Temperatur in Schritt 2 ist variabel und richtet sich nach der Sequenz der verwendeten Primer. Die Elongationszeiten in Schritt 3 und am Ende der Reaktion sind ebenfalls variabel und hängen von der Länge des zu synthetisierenden DNA-Fragmentes und der Synthesegeschwindigkeit der verwendeten Polymerase ab.

Die entstandene DNA wird mit Hilfe des QIAquick™ PCR Purification Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.2.2 Agarosegel-Elektrophorese

TBE-Puffer:	90mM Tris pH8, 90mM H ₃ BO ₃ , 1mM EDTA
TAE-Puffer:	40mM Tris pH8, 20mM Natriumacetat, 1mM EDTA
Probenpuffer 6x:	0.25% Bromphenolblau, 0,025% Xylen-CyanolFF, 30% Glycerin
DNA-Marker	MassRuler™ (Fermentas SM0403)

Für die Agarosegel-Elektrophorese wird ein 1% Agarosegel verwendet. Hierfür werden 0.5g Agarose in 50ml TBE-Puffer unter Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach kurzem Abkühlen der Lösung wird Ethidiumbromid (1.6µg/ml) zugegeben und die Lösung in den Gelschlitten gegossen. Anschließend wird der Kamm für die Taschen eingesetzt. Wird die Agarosegel-Elektrophorese als Methode zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten verwendet, so wird TAE-Puffer verwendet und auf Ethidiumbromid verzichtet. Zur Visualisierung der DNA wird dem Probenpuffer SYBRGold™-Farbstoff (Invitrogen) nach Herstellerangaben zugesetzt. Das Gel wird in die Elektrophoreseapparatur gelegt und der Kamm wird entfernt. Als Laufpuffer wird je nach Puffersystem des Gels entweder TBE- oder TAE-Puffer verwendet. DNA-Proben werden mit Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung der DNA erfolgt bei 120V. Anschließend wird die DNA unter UV-Licht oder im Fall von SYBRGold™ auf einem Transilluminator (Dark Reader, Clare Chemical Research) visualisiert.

2.2.3 Restriktionsreaktion

Für eine Restriktionsreaktion werden folgende Komponenten pipettiert:

Volumen	Komponenten
xµl	Vektor oder PCR Produkt (1-5µg)
2µl	Restriktionsendonuklease 1
2µl	Restriktionsendonuklease 2
2	10x Restriktionsendonukleasenpuffer
2	10x BSA-Lösung
20-x µl	ddH ₂ O

Tabelle 5: Pipettierschema für einen Restriktionsreaktion

Material und Methoden

Der Ansatz wird für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die DNA-Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die gewünschten DNA-Fragmente werden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mittels QIAEXTMII Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.2.4 Ligation

Für einen Ligationsreaktion werden folgende Komponenten pipettiert:

Volumen	Komponente
x µl	geschnittener Expressionsvektor (100ng)
y µl	geschnittenes Insert (molares Verhältnis 3:1=Insert:Vektor)
1µl	10x T4 DNA Ligase Puffer
1µl	T4 DNA Ligase
20-x-y µl	ddH ₂ O

Tabelle 6: Pipettierschema für eine Ligationsreaktion.

Der Ansatz wird über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.5 Transformation

2.2.5.1 Herstellung chemisch-kompetenter Zellen

TfbI-Puffer: 30mM Kalium-Acetat, 100mM RbCl, 10mM CaCl₂, 50mM MnCl₂, 15% (v/v) Glycerin; mit 0.1M Essigsäure auf pH 5.8 einstellen.

TfbII-Puffer: 10mM MOPS, 75mM CaCl₂, 10mM RbCl, 15% (v/v) Glycerin; mit 0.1M NaOH-Lösung auf pH 6.5 einstellen.

100ml LB-Medium (wenn nötig mit Antibiotika) werden mit 1ml Übernachtskultur des gewünschten Stammes angeimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert (Multitron II, Infors). Bei einer optischen Dichte OD₆₀₀ von 0.4 wird die Kultur für 15min auf Eis inkubiert. Dann werden die Bakterienzellen vom Medium durch eine fünfminütige Zentrifugation bei

4°C und 4400rpm (Eppendorf Centrifuge 5720) abgetrennt. Der Überstand wird verworfen und die Zellen werden in 40ml TfbI-Puffer aufgenommen und für 5min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (5min, 4400rpm, 4°C) wird das Pellet in 4ml TfbII-Puffer resuspendiert und nochmals für 15min auf Eis inkubiert. Dann wird die Zellsuspension in 100µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

2.2.5.2 Transformation von *E.coli*

Ein 100µl Aliquot chemisch kompetenter Zellen (Nova Blue™ bei Klonierungen) wird auf Eis aufgetaut und mit 10-50ng der zu transformierenden Plasmid-DNA versetzt. Nach Inkubation für 30min auf Eis erfolgt der Hitzeschock bei 42°C für 1min. Nach kurzer Inkubation auf Eis (1-5min) werden 800µl SOC-Medium zugegeben und die Zellsuspension wird für 1 Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend werden die Zellen auf LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausplattiert und die Platten werden über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.6 Kolonie-PCR

Kolonien von *E.coli* nach Transformation eines Ligationsprodukts können mittels Kolonie-PCR auf das Vorhandensein des gewünschten Genes (Insert) getestet werden. Hierzu wird 1ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum versetzt und mit einer Kolonie angeimpft. Nach Inkubation für 4 Stunden bei 37°C unter Schütteln werden die Bakterien aus 0.8ml der Kultur vom Medium durch Zentrifugation (5min, 16000rpm, RT, Eppendorf Tischzentrifuge 5415D) getrennt und das Medium wird verworfen. Die Bakterien werden in 50µl Wasser resuspendiert und 10min bei 95°C inkubiert. Danach wird erneut zentrifugiert. 3µl des erhaltenen Überstands werden als Template-DNA für eine PCR Reaktion mit Primern, die zum 5'- und 3'-Bereich des klonierten Gens komplementär sind, eingesetzt. Die PCR-Produkte werden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Wurde in der PCR das gewünschte Produkt amplifiziert, d.h. das gewünschte Gen wurde erfolgreich in den Vektor kloniert, so werden die verbleibenden 200µl der entsprechenden Kultur zum Animpfen einer 5ml Übernachtskultur (LB-Medium mit Selektionsantibiotikum) verwendet, um daraus die Plasmid-DNA zu isolieren.

2.2.7 Plasmid-DNA Isolierung

Für die DNA-Isolierung im Mini-Prep Maßstab wurde eine 5ml Übernachtskultur verwendet. Für die DNA-Isolierung im Midi-Prep Maßstab wurde eine 100ml Übernachtskultur verwendet. Die DNA wurde entweder mittels eines QIAprep™ Spin Miniprep Kit (Qiagen) oder CompactPrep™ Plasmid Midi Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert. Die Konstrukte wurden von Brigitte Neumann im Hause mit den von den Herstellern angegebenen Sequenzierprimern sequenziert. Die Sequenzen wurden mit dem Programm Codon Aligner auf Richtigkeit überprüft und Plasmide mit korrekter Sequenz wurden bei -80°C aufbewahrt.

2.2.8 Konstrukte

Die in Tabelle 7 enthaltenen Konstrukte wurden kloniert:

Die Aminosäuresequenz und die cDNA-Sequenz der Konstrukte sind im Anhang hinterlegt.

Konstrukt	Vektor	Schnittstelle	Besonderheit
mSOST_pMK1	pMK1	BamHI, XhoI	N-term His ₆ -Tag, Thrombinschnittstelle
hSOST_opt_pMK1	pMK1	BamHI, XhoI	N-term His ₆ -Tag, Thrombinschnittstelle opt: hSOST cDNA wurde für <i>Drosophila melanogaster</i> codonoptimiert
mSOST_ΔC_pMK1	pMK1	BamHI, XhoI	N-term His ₆ -Tag, Thrombinschnittstelle
mSOST_pET28	pET28b	NdeI, XhoI	N-term His ₆ -Tag, Thrombinschnittstelle
mSOST_ΔC_pET28	pET28b	NdeI, XhoI	N-term His ₆ -Tag, Thrombinschnittstelle
mSOST_ΔNC_pET28	pET28b	NdeI, XhoI	N-term His ₆ -Tag, Thrombinschnittstelle

Tabelle 7: Sclerostin-Expressionskonstrukte, cDNA-Sequenz und Aminosäuresequenz sind im Anhang zu finden.

2.3 Expression rekombinanter Proteine in *E.coli*

2.3.1 Präparative Proteinexpression in TB-Medium

TBSE: 10mM Tris pH 8, 150mM NaCl, 1mM EDTA

Für eine Expression in *E.coli* wird das gewünschte Plasmid zunächst in *Rosetta*TM(DE3) transformiert (siehe Kap.:2.2.5.2). Anschließend wird eine Übernachtskultur (LB-Medium, Selektionsantibiotikum) mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert (Multitron II, Infors). Sechs bis zwölf 2.5l Schikaneschüttelkolben mit 800ml TB-Medium werden nun im Verhältnis 1:50 aus der Übernachtskultur angeimpft. Die Kulturen werden bei 37°C unter Schütteln inkubiert, bis eine optische Dichte bei 600nm (OD_{600nm}) von 0.5-0.7 erreicht ist. Dann wird die Expression des rekombinanten Proteins durch Zugabe von 1mM IPTG induziert und die Kultur weiter bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach 3-4 Stunden werden die Bakterien durch Zentrifugation für 20min bei 6000rpm und 4°C (Heareus Suprafuge 22, HFA12.500 Rotor) vom Medium separiert. Das Medium wird verworfen und das Feuchtgewicht der Bakterien bestimmt. Anschließend werden die Bakterien in 70ml TBSE resuspendiert und bei -20°C bis zur Aufarbeitung gelagert.

2.3.2 Präparative Proteinexpression in M9-Minimalmedium

10x M9-Medium: 42mM Na₂HPO₄, 22mM KH₂PO₄ pH 7.2-7.4, 8.6mM NaCl, autoklavieren

200x Spurenelemente-lösung: 5g/l EDTA, 0.8g/l FeCl₃, 0.05g/l ZnCl₂, 0.01g/l CuSO₄, 0.01g/l CoCl₂, 0.01g/l H₃BO₃, 1.6g/l MnCl₂, 0.01g/l Na₂WO₄, pH 7.0 mit 2M NaOH einstellen, steril filtriert

MgSO₄-Lösung: 1M MgSO₄, steril filtriert

CaCl₂-Lösung: 1M CaCl₂, steril filtriert

Glucoselösung: 20% (w/v) Glucose (oder ¹³C₆- Glucose, CK Gas Products)

Thiaminhydrochlorid-Lösung: 50mg/ml Thiamin-HCl, frisch!, steril filtriert

Lösung:

NH₄Cl-Lösung: 20% (w/v) NH₄Cl (oder ¹⁵NH₄Cl, CK Gas Products)

Material und Methoden

Das gewünschte Plasmid wird zunächst in *RosettaTM(DE3)* transformiert. Das Minimalmedium wird wie folgt angesetzt: Es werden für einen Liter Minimalmedium 100ml 10x M9-Medium in der Hälfte des zu erreichenden Volumens vorgelegt. Unter Rühren werden nun pro Liter Minimalmedium in der angegebenen Reihenfolge nacheinander (zwischendrin warten bis die zugegebene Komponente vollständig gelöst ist) 1ml Magnesiumlösung, 100µl CaCl₂-Lösung, 5ml 200x Spurenelementlösung, 37.5ml Glucoselösung, 2ml Thiaminlösung, 2.5ml Ammoniumchloridlösung zugegeben. Anschließend wird mit ddH₂O aufgefüllt und das Selektionsantibiotikum zugegeben.

Dann wird eine 2ml Kultur (Minimalmedium ohne isotope markierte Chemikalien, mit Selektionsantibiotikum) mit einer Kolonie angeimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert, bis das Wachstum von Bakterien deutlich zu erkennen ist (eventuell über Nacht). Diese Vorkultur wird verwendet, um eine Übernachtskultur (Minimalmedium ohne isotope markierte Chemikalien, Selektionsantibiotikum) anzuimpfen. Diese wird über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert, bis eine optische Dichte (OD_{600nm}) von mindestens 1 erreicht ist. Erst dann wird die Expressionskultur (800ml pro 2.5l Schikaneschüttelkolben, Minimalmedium mit isotope markierten Chemikalien, Selektionsantibiotikum) im Verhältnis 1:20 mit der Übernachtskultur angeimpft. Die Kulturen werden bei 37°C unter Schütteln inkubiert, bis eine optische Dichte (OD_{600nm}) von 0.7 erreicht ist. Anschließend wird 1g/l Glucose zusätzlich zugegeben und die Expression des rekombinanten Proteins durch Zugabe von 1mM IPTG induziert. Die Expression erfolgt bei 37°C unter Schütteln über Nacht. Dann werden die Bakterien durch Zentrifugation für 20min bei 6000rpm und 4°C (Heareus Suprafuge 22, HFA12.500 Rotor) vom Medium separiert. Das Medium wird verworfen und das Feuchtgewicht der Bakterien bestimmt. Anschließend werden die Bakterien in 70ml TBSE resuspendiert und bei -20°C bis zur Aufarbeitung gelagert.

2.4 Expression rekombinanter Proteine in Insektenzellen

Alle Zellkulturarbeiten werden unter sterilen Arbeitsbedingungen durchgeführt. Medien und Lösungen werden steril filtriert oder steril vom Hersteller bezogen. Verwendete Geräte (Pipetten oder Zellkulturgefäße) werden ebenfalls autoklaviert oder steril vom Hersteller bezogen.

2.4.1 Kultivierung von *Sf9*- und *TriEx*TM-Insektenzellen

Die *Sf9*-Insektenzelllinie stammt aus Puppenovariengewebe von *Spodoptera frugiperda* (Vaughn, et al., 1977). Diese Zellen können durch *Autographa californica* Baculoviren infiziert werden. Durch Co-Transfektion eines Baculovirusexpressionsvektors können Viren erzeugt werden. Dieses System wird für die Expression rekombinanter Proteine in Insektenzellen verwendet (Smith, et al., 1985).

2.4.1.1 Kultivierung als Monolayer-Kulturen

Sf9-Insektenzellen werden in IPL41-Medium (mit 10% (v/v) FCS, 100U/ml Penicillin-G, 100µg/ml Streptomycin) in 175cm²-Zellkulturflaschen (Greiner) bei 27°C im Brutschrank (Binder) kultiviert. Unter diesen Bedingungen verdoppeln sich die Zellen innerhalb von 24 Stunden. Sind die Zellen konfluent, werden sie passagiert. Hierzu wird zunächst das verbrauchte Medium abgesaugt. Zu den am Flaschenboden anhaftenden Zellen werden 10ml frisches Medium gegeben und die Zellen werden durch Abschlagen vom Flaschenboden gelöst. Die Zellsuspension wird auf zwei bis fünf neue 175cm²-Zellkulturflaschen verteilt und mit frischem Medium (30ml) versetzt.

2.4.1.2 Kultivierung als Suspensions-Kultur

Für die vierte und fünfte Virusamplifikation (VA) und für die Expression von Proteinen werden die Insektenzellen in 2.5l Rollerflaschen (Greiner) in Suspension kultiviert. Dafür werden Zellen von sechs konfluenten 175cm²-Zellkulturflaschen in jeweils 10ml frischem Medium abgeschlagen und in eine Rollerflasche gegeben. Der Inhalt wird mit frischem Medium auf 200ml aufgefüllt und für 4 Tage bei 27°C rotierend inkubiert. Dann wird die Zellzahl bestimmt (vgl. 2.4.2) und durch Verdünnen mit frischem Medium auf eine Zelldichte von 1.5x10⁶ Zellen/ml in der Zellkultur eingestellt. Je nach benötigter Zellmenge können die Zellen nun direkt für die Proteinexpression oder die Virusamplifikation eingesetzt werden, oder sie werden für weitere 4 Tage inkubiert. Nach vier Tagen wird erneut die Zellzahl bestimmt und die Zellkultur wird wieder mit frischem Medium auf eine Zellzahl von 1.5x10⁶ Zellen/ml eingestellt.

2.4.2 Vitalitätsfärbung und Zellzahlbestimmung

Trypanblau-Lösung: 0.5% Trypanblau in PBS

Um die Anzahl lebender Zellen in einer Zellkultur zu bestimmen, werden diese mit Trypanblau versetzt und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Aufgrund ihrer durchlässigen Zellmembran werden abgestorbene Zellen durch den Farbstoff blau angefärbt und können so von den lebenden Zellen unterschieden werden.

2.4.3 Co-Transfektion von Sf9-Zellen mit dem BaculoGold™-System

Mittels des BaculoGold™-Systems (Pharmingen) werden rekombinante *Autographa californica* Viren durch homologe Rekombination viraler DNA (BaculoGold™-DNA) und eines Baculovirus-Transfer-Vektors (pAcGP67B) entsprechend dem „Baculovirus Expression Vector System Manual“ (Pharmingen) hergestellt.

Lösung A: Grace's Medium mit 10% FCS, pH 6.0-6.2

Lösung B: 25mM HEPES pH 7.1, 125mM CaCl₂, 140mM NaCl

Zunächst werden pro Co-Transfektion 1ml einer Sf9-Insektenzellsuspension der Zelldichte 0.8×10^6 Zellen/ml in ein Well einer 6-Well-Platte pipettiert und für eine Stunde bei 27°C im Brutschrank inkubiert, so dass sich die Zellen absetzen und am Boden anheften. Danach wird das Medium über den Zellen abgesaugt und es werden 0.25ml der Lösung A in das Well gegeben. In einem sterilen Eppendorf-Reaktionsgefäß werden nun 0.25g BaculoGold™-DNA mit 1.5µg des rekombinanten Baculovirus-Transfer-Vektors vermischt und für 5min bei RT inkubiert. Das DNA-Gemisch wird nun sorgfältig mit 0.25ml der Lösung B vermischt und dann langsam zu den Zellen und Lösung A gegeben. Nach 4h bei 27°C im Brutschrank wird der Überstand von den Zellen abgesaugt. Nach zweimaligem Waschen mit 1.5ml frischem Medium werden die Zellen mit 1.5ml Medium überschichtet. Die Platte wird nun mit Parafilm versiegelt und auf einem feuchten Tuch in einer Plastikbox für fünf Tage bei 27°C im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit wird der rekombinante Viren enthaltende Überstand abgenommen. Zur Kontrolle der Co-Transfektion und um einzelne rekombinante Viren zu isolieren, wird mit dem Überstand ein Plaque Assay durchgeführt (siehe 2.4.5).

2.4.4 Co-Transfektion von Sf9-Zellen mit dem BacVector™-System

Das BacVector™-System dient zur Gewinnung rekombinanter *Autographa californica* Viren durch homologe Rekombination der viralen „BacVector-3000 Triple Cut Virus DNA“ (Novagen) und des modifizierten pBAC-3-Transfervektors pMK-1.

Für die Co-Transfektion werden 1.25×10^6 Sf9-Zellen in 5ml Medium in einer 25cm²-Zellkulturflasche (Greiner) ausgesät. Diese wird für mindestens 30min bei 27°C im Brutschrank inkubiert, so dass sich die Insektenzellen am Plattenboden anheften können. Dann werden 100ng der „BacVector-3000 Triple Cut Virus DNA“, 500ng der rekombinanten Transfer-Vektor-DNA und 25µl IPL41-Medium (ohne FCS) in einem sterilen Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt. In einem weiteren Eppendorf-Reaktionsgefäß werden 20µl steriles ddH₂O mit 5µl Transfektions-Reagenz („Insect GeneJuice™“) gemischt. Beide Lösungen werden vereinigt. Nach sorgfältigem Mischen folgt eine Inkubationszeit von 15min bei Raumtemperatur. In dieser Zeit werden die ausgesäten Zellen zweimal mit je 2ml Medium ohne FCS gewaschen und dann mit 1ml Medium ohne FCS überschichtet. Das Transfektions-Gemisch wird nun sorgfältig mit 450µl Medium ohne FCS gemischt und die Lösung wird dann zu den Zellen gegeben. Nach einer einstündigen Inkubation bei 27°C im Brutschrank werden 6ml Medium mit FCS zugegeben und bei 27°C für vier bis fünf Tage inkubiert. Nach dieser Zeit wird der Überstand mit den rekombinanten Viren abgenommen und durch einen Plaque Assay (vgl. 2.4.5) analysiert.

2.4.5 Plaque Assay

2.7% Agarose-Lösung: 1.35g SeaPlaque™-Agarose (Biozym) werden durch Aufkochen in der Mikrowelle in 50ml ddH₂O gelöst, autoklaviert und bei 60°C bis zum Gebrauch gelagert.

1.3x Medium: 6.6ml 1.3x Xpress Medium (Invitrogen), 0.7ml FCS

MTT-Lösung: 1mg/ml MTT in ddH₂O gelöst und steril filtriert (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

Der Plaque Assay dient der Isolierung einzelner Viren und zur Bestimmung des Virentiters von Zellüberständen der Virusamplifikationen (vgl. 2.4.6). Zunächst werden 1.2×10^6 Sf9-Zellen pro Well einer 6-Well-Platte (Greiner) in 2ml ausgesät. Die Platte wird für 1h bei 27°C im Brutschrank inkubiert, so dass sich die Zellen absetzen und am Boden anheften können. Danach wird das Medium abgesaugt und durch 1ml der Virusverdünnungen ersetzt. Nach

Material und Methoden

einer Co-Transfektion (vgl. 2.4.4) werden zur Isolation einzelner Viren Verdünnungen von 1:10 bis 1:10⁴, nach einer Virusamplifikation zur Bestimmung des Virentiters Verdünnungen von 1:10⁴ bis 1:10⁸ eingesetzt. Nach Zugabe der Viruslösungen wird die Platte erneut für 1h bei 27°C im Brutschrank inkubiert. Dann wird die Viruslösung abgesaugt und die Zellen werden mit 1.5ml Agarose-Medium überdeckt. Das Agarose-Medium wird kurz vor der Verwendung frisch, durch Zugabe von 3.3ml warmer 2.7% Agarose-Lösung zu 6.6ml 1.3x Medium, hergestellt. Nach dem Abkühlen und Aushärten der Agarose-Lösung wird die Platte mit Parafilm verschlossen und auf einem feuchten Tuch in einer Plastikbox für 5 Tage bei 27°C inkubiert. Anschließend wird der Plaque Assay zur Auswertung durch Zugabe von 1ml MTT-Lösung pro Well angefärbt. Die Färbung beruht auf der enzymatischen Umsetzung des MTTs in ein violett erscheinendes Produkt durch lebende Zellen. Virusinfizierte und damit lysierte Zellen werden nicht angefärbt und erscheinen als helle Punkte (sog. Plaques) auf einer violetten Zellschicht. Der Titer der eingesetzten Viruslösung wird durch Auszählen der Plaques unter Berücksichtigung des jeweiligen Verdünnungsfaktors in pfu/ml („plaque forming unit“) bestimmt. Sollen einzelne Viren für die anschließende Amplifikation isoliert werden, wird der entsprechende Plaque mit einer sterilen 100µl- Pipettenspitze durch die Agarose hindurch von der Platte gepickt und in 1ml frischem Medium resuspendiert. Diese Viruslösung kann nach einstündiger Inkubation bei 27°C und dem Abtrennen von Agaroseresten durch Zentrifugation (5min bei 1000rpm; Eppendorf Centrifuge 5415D) zur ersten Virusamplifikation (siehe 2.4.6.1) verwendet werden.

2.4.6 Virusamplifikation

2.4.6.1 Virusamplifikation in Monolayerkultur

Die erste und zweite Virusamplifikation wird in einer 6-Well-Platte durchgeführt. Dazu werden 1.6x10⁶ Zellen in 1ml Medium pro Well ausgesät und für eine Stunde bei 27°C im Brutschrank inkubiert. Sobald sich die Zellen am Boden angeheftet haben, wird das Medium vorsichtig abgesaugt und durch 1ml des Virusüberstandes ersetzt. Die Platte wird dann mit Parafilm verschlossen und auf einem feuchten Tuch in einer Plastikbox für vier Tage bei 27°C inkubiert. Danach wird der Überstand mit einer sterilen 1ml-Pipette abgenommen und dabei aufgenommene Zellen durch Zentrifugation (5min bei 1000rpm; Eppendorf Centrifuge 5804R) entfernt. Bis zur weiteren Amplifikation wird der Virusüberstand in einem sterilen Eppendorf-Reaktionsgefäß bei 4°C im Dunkeln gelagert. Nach der zweiten Virusamplifikation wird der Überstand durch einen Western Blot (siehe 2.5.3) auf die

Expression des rekombinanten Proteins getestet. Die dritte Virusamplifikation wird in einer 175cm² Zellkulturflasche durchgeführt. Zu einer zu etwa 80% konfluenten Insektenzell-Monolayerkultur wird 1ml des Virusüberstandes aus der zweiten Virusamplifikation gegeben. Nach vier Tagen bei 27°C im Brutschrank wird der Überstand abgenommen, die Insektenzellen werden durch Zentrifugation für 5min mit 2000rpm (Eppendorf Centrifuge 5804R) abgetrennt und der Virusüberstand wird in einem sterilen 50ml-Röhrchen bei 4°C im Dunkeln gelagert.

2.4.6.2 Virusamplifikation in Suspensionskultur

Die vierte und alle weiteren Virusamplifikationen werden in Suspensionskultur in Rollerflaschen durchgeführt. Hierzu werden 200ml einer Insektenzellsuspension der Zelldichte 1.5×10^6 Zellen/ml pro Rollerflasche mit 15ml der 3. VA (für die 4.VA) oder einer MOI (Multiplicity Of Infection: Verhältnis Viren zu Zellen) von 0.1 der vorherigen VA (für alle weiteren VAs) infiziert. Nach viertägiger Inkubation wird die Zellsuspension in 50ml-Röhrchen gefüllt und 5min bei 2000rpm zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5804R). Der Virusüberstand wird nun in sterilen 50ml-Röhrchen bis zu einer weiteren VA oder einer Virusexpression bei 4°C im Dunkeln gelagert. Der Virentiter wird mittels eines Plaque Assays (vgl. 2.4.5) bestimmt.

2.4.7 Expression rekombinanter Proteine in Suspensionskultur

Zur Expression rekombinanter Proteine in *Sf9*-Insektenzellen werden Zellen in Suspensionskultur mit einer Zelldichte von 1.5×10^6 Zellen/ml benötigt (siehe 2.4.1.2). Die Zellen werden mit Virus versetzt, so dass eine MOI von 5 erreicht wird. Die infizierten Zellen werden für vier bis fünf Tage im Brutschrank bei 27°C inkubiert. Nach der Expression werden die Insektenzellen durch Zentrifugation für 20min bei 6000rpm und 4°C (Heareus Suprafuge 22, HFA12.500 Rotor) abgetrennt. Für die weitere Aufreinigung des exprimierten Proteins wird der Überstand sofort nach der Zentrifugation gegen den benötigten Puffer dialysiert (VISKING Typ 36/32, Rot).

2.5 Proteinchemische Methoden

2.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)

Rotiphorese Gel 40 (29:1): 40% Acrylamid/Bisacrylamid im Verhältnis 29:1 (Roth)

4x Upper Tris: 0.5M Tris pH 6.8, 0.4 % SDS

4x Lower Tris: 1.5M Tris pH 8.8, 0.4 % SDS

SDS-Laufpuffer: 25mM Tris pH 8.6, 0.19M Glycin, 0.15% SDS

2x SDS-Probenpuffer: 63mM Tris pH 8.6, 2% SDS, 20% Glycerin (87%), 2% Bromphenolblau, für reduzierende Bedingungen wird 2% β -Mercaptoethanol zugesetzt.

	Sammelgel	Trenngel
Rotiphorese Gel 40 (29:1)	0.5ml	3ml
4X Upper Tris	1.25ml	-
4x Lower Tris	-	2.5ml
ddH ₂ O	3.2ml	2.5ml
Glycerin (87%)	-	2ml
TEMED	20 μ l	20 μ l
APS 40% (w/v)	20 μ l	20 μ l

Tabelle 8: Pipettierschema für zwei Sammelgele und zwei Trenngele für die SDS-PAGE.

Für die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese wird ein Gel bestehend aus einem 12% Trenngel und einem 4% Sammelgel verwendet. Die Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel für zwei Gele, mit einer Dicke von 0.75mm, ist in Tabelle 8 aufgeführt. Die Glasplatten werden gereinigt und im Gelgießstand aufgebaut. Die Komponenten für das Trenngel werden wie angegeben pipettiert und zwischen die Glasplatten gefüllt. Danach wird mit Wasser überschichtet. Das Wasser wird entfernt und die Komponenten für das Sammelgel pipettiert. Das Sammelgel wird eingefüllt und der Kamm mit den Taschen eingesetzt. Nach vollständiger Polymerisation wird das Gel in die Gelkammer (Mini PROTEAN Electrophoresis System, Biorad) eingesetzt und diese mit SDS-Laufpuffer befüllt.

Die Proteinproben werden 1:1 mit 2xSDS-Probenpuffer versetzt und für 5min bei 95°C denaturiert. Dann werden die Proben in die Taschen des Gels pipettiert. Die Auftrennung der Proteine im Gel erfolgt bei 300V. Die Elektrophorese wird beendet, wenn die sichtbare Bromphenolblau-Front das untere Gelende erreicht hat.

Die Abschätzung des Molekulargewichtes der durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine erfolgt durch einen Vergleich mit einem Proteingemisch aus Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht. Als Standard wurde der Proteinmarker LMW Kit, GE-Healthcare verwendet.

2.5.2 Färbung von Proteingelen

2.5.2.1 Coomassie-Färbung

Färber: 10g Coomassie Brilliant Blue R250, 1.6l Methanol, 0.4l Eisessig, 2l H₂O

Entfärber: Eisessig, 2-Propanol, H₂O im Verhältnis 1:1:8

Nach der SDS-PAGE wird das Proteingel für 20min in der Färbelösung unter Schwenken inkubiert. Danach wird das nun vollständig blaue Gel mit Wasser gewaschen und in der Entfärberlösung inkubiert, bis der Hintergrund entfärbt ist und nur noch die blauen Proteinbanden sichtbar sind. Die untere Nachweisgrenze der Coomassie-Färbung liegt bei 0.1µg Protein pro Bande.

2.5.2.2 Silber-Färbung

Lösung 1: 60ml 50% (v/v) Aceton in H₂O, 1.5ml 50% (w/v) Trichloressigsäure (TCA) in H₂O, 25µl 37% Formaldehyd

Lösung 2: 60ml 50% (v/v) Aceton in H₂O

Lösung 3: 0.1ml 10% (w/v) Natriumthiosulfat-pentahydrat (Na₂S₂O₃·5H₂O) in 60ml H₂O

Lösung 4: 0.8ml 20% (w/v) Silbernitrat (AgNO₃), 0.6ml 37% Formaldehyd, in 60ml H₂O

Lösung 5: 1.2g Natriumcarbonat (Na₂CO₃), 25µl 37% Formaldehyd, 25µl 10%(w/v) Na₂S₂O₃·5H₂O, in 60ml H₂O

Nach der SDS-PAGE wird das Proteingel für 5min unter Schwenken in einer Glasschale mit Lösung 1 inkubiert. Das Gel wird dreimal kurz mit Wasser gewaschen und anschließend für 5min in Wasser inkubiert. Nach erneutem Waschen mit Wasser wird das Gel 5min in Lösung 2 inkubiert. Nach 1min in Lösung 3 wird das Gel erneut mit Wasser gewaschen und verbleibt

Material und Methoden

für 8min in Lösung 4. Anschließend erfolgt nach intensivem Spülen mit Wasser der eigentliche Färbeschritt in Lösung 5. Unter leichtem Schütteln der Färbeschale wird die Intensitätszunahme der Proteinbanden beobachtet. Ist die Färbung ausreichend stark, wird die Entwicklung durch Zugabe von 250ml 1%-iger Essigsäure gestoppt. Die Silberfärbung weist im Vergleich zur Coomassie-Färbung eine niedrigere Proteinnachweisgrenze auf (ca. 1ng).

2.5.3 Western Blot

Nitrocellulose-Membran:	Protran, 0.45µm (Whatman)
Blotpuffer:	24mM Tris, 200mM Glycin in 20% (v/v) Methanol
TBS:	10mM Tris, pH 7.9, 150mM NaCl
Blockpuffer:	2% (w/v) Magermilchpulver in TBS
Luminollösung:	22.5mg Luminol in 0.5ml DMSO lösen und mit 100mM Tris pH 8.5 auf 50ml auffüllen; Lösung bei 4°C im Dunkeln lagern
Enhancerlösung:	90mM p-Cumarsäure in DMSO; Lösung bei 4°C lagern
Inkubationslösung A:	5ml Luminollösung, 22µl Enhancerlösung
Inkubationslösung B:	5ml 100mM Tris, pH 8.5, 3µl H ₂ O ₂ (30%)
Primärer Antikörper:	200µg/ml Anti-His-Tag monoclonaler Antikörper (Novagen)
Sekundärer Antikörper:	Anti-Mouse IgG (H&L) HRP-gekoppelter Antikörper (Cell Signaling); Konzentration wie vom Hersteller angegeben

Beim Western Blot werden durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteingemische aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und dort durch die Interaktion mit spezifischen Antikörpern detektiert. Hier wurde als spezifischer, primärer Antikörper ein Antikörper gegen den rekombinant an die Proteine angefügten His-Tag verwendet. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Nitrocellulosemembran erfolgt mit Hilfe einer MiniV 8•10 Blot-Kammer (LifeTechnologies), die mit Blotpuffer gefüllt ist, für 30min bei 170V. Danach werden noch freie Proteinbindungsstellen auf der Membran für 10min in einer Schüttelkammer mit 10ml Blockpuffer abgesättigt. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit jeweils 7ml TBS für 5min auf dem Schüttler erfolgt die Inkubation mit dem primären Antikörper. Der Antikörper wird hierzu nach Herstellerangaben in Blockpuffer verdünnt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgt entweder für 1h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Die Membran wird dann erneut dreimal für je 5min mit 7ml TBS gewaschen, bevor die Inkubation mit dem sekundären Antikörper folgt. Der sekundäre Antikörper wird nach Herstellerangaben in 7ml

Blockpuffer verdünnt. Die Inkubation erfolgt dann für 1h bei RT auf dem Schüttler. Anschließend ist die Membran wie zuvor dreimal mit TBS zu waschen. Zur Detektion von immunreaktiven Proteinbanden werden in der Dunkelkammer 5ml der Inkubationslösung A und 5ml der Inkubationslösung B auf die Membran gegeben und gemischt. Nach 5min lässt man die Membran kurz abtropfen und legt einen Röntgenfilm (Konica A3) in einer Autoradiographiemappe auf die Membran. Durch die Meerrettichperoxidase (HRP)/H₂O₂-katalysierte Oxidation des Luminols kommt es zum Auftreten von Chemilumineszenz, die den Film an den entsprechenden Stellen schwärzt. Die benötigte Belichtungszeit variiert in Abhängigkeit von der Menge an detektiertem Protein, sollte aber in der Regel zwischen drei bis zehn Minuten liegen. Nach der Belichtung wird der Film in der Entwicklermaschine entwickelt.

2.5.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen auf photometrische Weise wird ein UV-Absorptionsspektrum im Wellenlängenbereich von 250nm bis 320nm (Evolution 300 UV-Visible Spectrophotometer, Thermo) aufgenommen. Die Proteinkonzentration c [mol/l] kann nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz näherungsweise wie folgt berechnet werden:

$$c = (A_{280} - A_{320}) / (\epsilon_{280} \cdot d)$$

Dabei gibt A die Absorption bei 280nm bzw. bei 320nm, ϵ_{280} den Extinktionskoeffizienten des Proteins bei 280nm [M⁻¹cm⁻¹] und d die konstante Schichtdicke der verwendeten Küvette von 1cm an. Der Extinktionskoeffizient ϵ_{280} von Proteinen ist abhängig von der Anzahl der Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Cystein (Gill, *et al.*, 1989). Die molaren Extinktionskoeffizienten ϵ_{280} , die Molekulargewichte (MW) und der theoretische isoelektrische Punkt aller in der Arbeit verwendeter Proteine wurden mit Hilfe des ExpASy-ProtParamTools berechnet und sind in Tabelle 9 aufgeführt.

(siehe <http://www.expasy.org/tools/protparam.html>).

Material und Methoden

Protein	Molekulargewicht M [Da]	Extinktionskoeffizient ϵ_{280} [$M^{-1}cm^{-1}$]	pI
murines Sclerostin (pBACGP67)	23466.3 *	25940	9.6*
humanes Sclerostin (pBACGP67)	23856.8*	24450	9.5*
murines Sclerostin (pMK1)	23196.1 *	25940	9.7 *
humanes Sclerostin (pMK1)	24073.1 *	24450	9.8 *
murines Sclerostin- Δ C (pMK1)	18277.7 *	24450	9.4 *
murines Sclerostin (pET28)	23612.5	25940	9.7
murines Sclerostin- Δ C (pET28)	18694.1	24450	9.4
murines Sclerostin- Δ NC (pET28)	14568.7	17460	10.8

Tabelle 9: Molekulargewichte, Extinktionskoeffizienten und isoelektrische Punkte der Sclerostinvarianten. *) Molekulargewicht und isoelektrischer Punkt ohne Berücksichtigung der möglichen Glykosylierung.

2.5.5 Biotinylierung von Proteinen

Biotin-Lösung: 2mg/ml Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce) in H₂O (nur frisch verwenden!)

PBS: 3mM NaH₂PO₄, 7mM Na₂HPO₄, pH 7.4, 2mM KCl, 120mM NaCl

Zur Biotinylierung liegen die aufgereinigten Proteine in einer Konzentration von 0.5-1.0mg/ml in PBS gelöst vor. Zu mindestens 100 μ l dieser Proteinlösung wird Biotin-Lösung in einem molaren Verhältnis von 1:1 (Protein zu Biotin) zugegeben. Der Biotinylierungsansatz wird für 2h auf Eis inkubiert. Freies Biotin wird durch dreimaliges Verdünnen mit PBS auf 4ml und anschließendem Konzentrieren auf μ 50 durch Ultrafiltration (Amicon Ultra -4, 5000MWCO, Millipore) abgetrennt. Abschließend wird die Konzentration des biotinylierten Proteins photometrisch bestimmt und die Lösung in Aliquots zu 10 μ l bei -20°C gelagert.

2.5.6 Dynamische Lichtstreuung

Bei der dynamischen Lichtstreuung wird die Intensitätsveränderung des von den Molekülen einer Probe emittierten Streulichts als eine Funktion der Zeit betrachtet. Dabei wird ein Teil der einfallenden monochromatischen Strahlung eines Lasers vom Partikel gestreut und kann detektiert werden. Durch die Brownsche Molekularbewegung der Teilchen kommt es zu Interferenzen, d.h. die Intensität des emittierten Streulichts wird entweder verstärkt oder

abgeschwächt. Je schneller ein Partikel diffundiert, desto schneller ändert sich auch die Intensität des Streulichtes. Die Geschwindigkeit der Änderung steht damit in direkter Beziehung zur Größe des Partikels. Sind Temperatur und Viskosität des Lösungsmittels konstant, hängt die Änderung der Streulichtintensität direkt vom Diffusionskoeffizienten D und damit von der Molekülgröße ab. Der hydrodynamische Radius R_h eines Moleküls und der Diffusionskoeffizient D stehen in folgendem Verhältnis:

$$D = kT / (6\pi\eta_0 R_h)$$

Wobei k die Boltzmann-Konstante, T die Temperatur, η_0 die Viskosität des Lösungsmittels und R_h der hydrodynamische Radius des Moleküls sind.

Aus den Messwerten wird über eine mathematische Funktion der Diffusionskoeffizient bestimmt, aus dem der hydrodynamische Radius ermittelt werden kann.

Für die Messung werden 20 μ l einer Proteinlösung mit einer Konzentration von 1mg/ml in eine Küvette mit drei Fenstern gegeben. Die Messung erfolgt bei 25°C.

Als Ergebnis werden der hydrodynamische Radius, das Molekulargewicht der enthaltenen Teilchen sowie die Polydispersität der Probe in % erhalten.

2.6 Präparation von Sclerostin und Varianten aus Sf9-Zellkulturüberstand

Die Proteine murines Sclerostin, humanes Sclerostin und murines Sclerostin- ΔC wurden mit Hilfe des BacVectorTM-Systems in Sf9-Zellen exprimiert (vgl. 2.4.7) und aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt. Die Aufreinigung der Proteine kann in zwei Schritte unterteilt werden. Zunächst wird das Protein durch Metallchelate-Affinitätschromatographie aus dem Medium isoliert und konzentriert. Der zweite Aufreinigungsschritt erfolgt über eine Ionenaustausch-Chromatographie.

2.6.1 Metallchelate-Affinitätschromatographie (Batch-Verfahren)

Auftragspuffer: 50mM Na₂PO₄ pH 8.3, 300mM NaCl, 10mM Imidazol

Elutionspuffer 50mM Na₂PO₄ pH 8.3, 300mM NaCl, 250mM Imidazol

Glassäule: □ 2.5cm, l = 10cm, Econo ColumnTM Glassäule (BioRad)

Der das rekombinante Protein enthaltende Zellkulturüberstand (siehe 2.4.7) wird zweimal

Material und Methoden

gegen zehn Volumina Auftragspuffer bei 4°C dialysiert (VISKING Typ 36/32, Roth). Anschließend werden je nach abgeschätzter Proteinmenge 1-3ml zuvor in Auftragspuffer equilibrierter Ni-NTA Agarose (Qiagen) zugegeben und bei 4°C für 1 Stunde gerührt. Hierbei binden die Hexahistidinsequenzen der rekombinanten Proteine spezifisch an die an einer Säulenmatrix immobilisierten Ni²⁺-Ionen. Dann wird der Zellkulturüberstand mit der darin befindlichen Ni-NTA-Agarose nach und nach in eine Glassäule gegeben und der Durchlauf gesammelt. Die Agarose wird fünfmal mit dem jeweils 10-fachen Säulenvolumen Auftragspuffer gespült, um unspezifisch an die Ni-NTA-Agarose-Matrix gebundene Proteine abzutrennen. Abschließend erfolgt die Elution in 5-7ml Fraktionen mit Elutionspuffer. Der Proteingehalt und der Reinheitsgrad des Säulendurchlaufs, der beiden Waschfraktionen und der Elutionsfraktionen werden durch SDS-PAGE (siehe 2.5.1) analysiert. Fraktionen, die das erwünschte Protein enthalten, werden vereinigt und gegen 5l 10mM Hepes pH 7.5, 3.4mM EDTA und 150mM NaCl bei 4°C dialysiert (VISKING Typ 36/32, Roth). Nach der Dialyse werden unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation (5000rpm, 10min, 4°C, Eppendorf Centrifuge 5804R) abgetrennt.

2.6.2 Ionenaustausch-Chromatographie

Die chromatographische Auftrennung von Proteinen mit Hilfe eines Salzgradienten bei der Ionenaustausch-Chromatographie beruht auf der Wechselwirkung der Proteine mit dem Säulenmaterial entsprechend ihrer Oberflächenladung, die vom vorliegenden pH-Wert der Proteinlösung abhängt.

Auftragspuffer:	10mM Hepes pH 7.5, 150mM NaCl
Elutionspuffer:	10mM Hepes pH 7.5, 1mM NaCl
Säule:	1ml HiTrap CM-Sepharose FF (GE Healthcare)
Chromatographiesystem:	BioLogic DuoFlow (Biorad)

Vor dem Auftrag auf die Säule wird die Proteinlösung zunächst mit Hilfe eines RotilabTM Spritzenfilters (0.2µm, Roth) filtriert. Dann wird die Proteinlösung mit einer Flussrate von 2ml/min auf die mit Auftragspuffer equilibrierte Säule aufgetragen. Die beladene Säule wird mit Bindepuffer gewaschen (2ml/min) bis die gemessene Absorption bei 280nm wieder auf ihren Ursprungswert zurückgegangen ist und sich konstant verhält. Das Protein wird durch einen linearen 10ml Gradient von 0-100% Elutionspuffer bei einer Flussrate von 1ml/min eluiert. Während der Elution werden Fraktionen zu 1ml gesammelt. Der Proteingehalt der

Fraktionen wird photometrisch ermittelt und Protein-enhaltende Fraktionen werden mittels SDS-PAGE analysiert (siehe Kap.: 2.5.1). Fraktionen, die reines Protein enthalten werden vereinigt und gegen Wasser dialysiert. Anschließend wird die Proteinlösung aliquotiert, eingefroren (-80°C) und im Vakuum gefriergetrocknet (Christ Alpha1-2). Das gefriergetrocknete Protein wird bei -80°C gelagert.

2.7 Präparation von Sclerostin und Varianten aus E.coli-Zellen

Die Proteine murines Sclerostin, murines Sclerostin- Δ C und murines Sclerostin- Δ NC wurden in RosettaTM-Zellen als Einschlusskörper exprimiert. Die Gewinnung der Proteine gliedert sich in mehrere Schritte bestehend aus Zellaufschluss, Isolierung und Vorreinigung der Einschlusskörper, Rückfaltung der Proteine und einer anschließenden zweistufigen chromatographischen Aufreinigung bestehend aus Kationenaustauschchromatographie und RP-HPLC.

2.7.1 Zellaufschluss und Isolierung der Einschlusskörper

Die in TBSE resuspendierten gefrorenen Zellen (siehe 2.3.1) werden langsam aufgetaut. Anschließend wird die EDTA-Konzentration durch Zugabe von EDTA Lösung auf 10-40mM eingestellt und 6mg Lysozym zugegeben. Die Suspension wird für 1 Stunde bei 4°C unter Rühren inkubiert. Dann werden die Zellen mit Ultraschall aufgeschlossen (5min bei 80% Amplitude, auf Eis) und die Einschlusskörper vom Überstand durch Zentrifugation (30min, 12000rpm, 4°C, Beckmann Coulter JLA16.250 Rotor) abgetrennt. Das Pellet wird in TBSE resuspendiert und erneut beschallt (5min bei 80% Amplitude, auf Eis) und zentrifugiert (30min, 12000rpm, 4°C, Beckmann Coulter JLA16.250 Rotor). Die abgetrennten Einschlusskörper werden in TBSE, 2% Triton X100 resuspendiert und erneut zentrifugiert (30min, 12000rpm, 4°C, Beckmann Coulter JLA16.250 Rotor). Nun werden die Einschlusskörper in 6M GuHCl, 100mM Na-Phosphatpuffer, 10mM Tris pH8 gelöst und durch Zugabe von β -Mercaptoethanol (1/1000 (v/v)) reduziert und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wird für 30min bei 5000rpm (Eppendorf Centrifuge 5804R) zentrifugiert.

2.7.2 Metallchelate-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen

Waschpuffer 1:	6M GuHCl, 100mM Na-Phosphatpuffer, 10mM Tris pH 8
Waschpuffer 2:	6M GuHCl, 100mM Na-Phosphatpuffer, 10mM Tris pH 6
Elutionspuffer:	6M GuHCl, 100mM Na-Phosphatpuffer, 10mM Tris pH 4
Glassäule:	□ 2.5cm, l = 10cm, Econo Column™ Glassäule (BioRad)

Die klare Lösung wird mit 5ml vorher equilibrierter Ni-NTA Agarose (Qiagen) versetzt und für 30min unter Rühren inkubiert. Die Lösung wird in eine Glassäule gegeben und der Durchlauf aufgefangen. Die Agarose wird zuerst fünfmal mit dem jeweils zehnfachen Säulenvolumen Waschpuffer 1 gewaschen, dann fünfmal mit dem jeweils zehnfachen Säulenvolumen Waschpuffer 2. Anschließend werden die gebundenen Proteine durch Zugabe von Elutionspuffer eluiert und 10ml Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen werden photometrisch und mittels SDS-PAGE analysiert und danach vereinigt.

2.7.3 Rückfaltung

Rückfaltungspuffer:	2M LiCl, 30mM Chaps, 50mM Tris pH 8, 500mM Arginin, 2mM GSH, 1mM GSSG (GSH und GSSG kurz vor Proteinzugabe zusetzen)
Dialysepuffer:	20mM Tris pH7.5, 100mM NaCl, 3.4mM EDTA

Der pH der Proteinlösung wird auf 8 eingestellt und es werden 5mM DTT zugegeben. Dann wird die Proteinlösung mittels Ultrafiltration in einer Amicon Rührkammer (Millipore, YM3-Membran 3500Da Ausschlussgröße) auf 20mg/ml aufkonzentriert und anschließend 1/100 in Rückfaltungspuffer verdünnt. Dafür wird die Proteinlösung langsam unter Rühren in den Rückfaltungspuffer eingetropt. Der Rückfaltungsansatz wird anschließend für 5 Tage bei 4°C inkubiert. Anschließend wird der Rückfaltungsansatz viermal gegen das zehnfache Volumen Dialysepuffer dialysiert (4°C).

2.7.4 Ionenaustauschchromatographie

Auftragspuffer:	20mM Tris pH 7.5, 100mM NaCl
Elutionspuffer:	20mM Tris pH 7.5, 2M NaCl
Säule:	5ml HiTrap CM-Sepharose FF (GE Healthcare)
Chromatographiesystem:	BioLogic DuoFlow (Biorad)

Der Rückfaltungsansatz wird filtriert (Bottletop Filter, Nalgene, 0.2µm) und anschließend mit einer Flussrate von 7ml/min auf die zuvor mit Auftragspuffer equilibrierte Säule aufgetragen. Die Säule wird solange mit Auftragspuffer gewaschen, bis die Absorption bei 280nm konstant ist. Das Protein wird durch einen linearen Gradient (30 Säulenvolumen) von 0-100% Elutionspuffer bei einer Flussrate von 5ml/min eluiert. Während der Elution werden Fraktionen zu 5ml gesammelt und mit 20mM Tris pH 8 auf das doppelte Volumen verdünnt. Der Proteingehalt der Fraktionen wird photometrisch ermittelt und Protein-enhaltende Fraktionen werden mittels SDS-PAGE (nicht reduzierende Bedingungen!) analysiert und danach vereinigt.

2.7.5 Reversed-Phase-Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie

Das Prinzip der Auftrennung von Proteingemischen durch „reversed phase“-HPLC (RP-HPLC) beruht auf unterschiedlich starken hydrophoben Wechselwirkungen verschiedener Proteine mit der hydrophoben Matrix der Säule. Proteine mit nur schwacher Bindung an die Säulenmatrix werden schon bei einer geringeren Acetonitril-Konzentration eluiert, als Proteine mit starken hydrophoben Wechselwirkungen.

Auftragspuffer A:	0.1% TFA (Roth) in ddH ₂ O
Elutionspuffer B:	Acetonitril (Roth) “gradient grade”
Säule:	VP 125/10 Nucleosil 120-5 C8 (P _{max} :1200psi) (Macherey Nagel) Porengröße: 5µm Maße: 10mm x 125mm
Chromatographiesystem:	BioLogic DuoFlow (Biorad)

Die Proteinlösung wird 5min bei 5000rpm zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5804R) und filtriert (RotilabTM Spritzenfilter, Roth). Pro Lauf werden maximal 5mg Protein mit einer Flussrate von 6ml/min, auf die vorher mit Auftragspuffer equilibrierte Säule, aufgetragen. Nach einem Waschschrift mit Auftragspuffer werden die Proteine mit Hilfe eines dreistufigen linearen Gradienten eluiert (siehe Tabelle 10.). Dabei werden Fraktionen zu 2ml gesammelt.

Gradient	Volumen	Flussrate
100% A- 80% A	18ml	6ml/min
80% A- 60% A	96ml	6ml/min
60% A-100% A	18ml	6ml/min

Tabelle 10: RP-HPLC, dreistufiger Gradient zur Elution der Sclerostinvarianten.

Die Fraktionen werden photometrisch vermessen, der Proteingehalt bestimmt und mittels SDS-PAGE (reduzierende und nicht reduzierende Bedingungen) analysiert. Fraktionen werden vereinigt, aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Dann wird das Protein gefriergetrocknet (Christ, Alpha 1-2).

2.7.6 Entfernung der Hexahistidinsequenz durch Thrombin

Spaltpuffer: 50mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 2.5mM CaCl₂

Werden die Proteine für die NMR (Kernspinresonanz Spektroskopie) benötigt, so wird die Hexahistidinsequenz zuvor durch Thrombin proteolytisch entfernt. Hierfür wird das Protein in Spaltpuffer gelöst (1mg/ml) und mit biotinyliertem Thrombin (Novagen, 0.1U/mg Protein) versetzt. Der Ansatz wird über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von Streptavidin Agarose (Novagen) wird das Thrombin gebunden und durch Filtration durch einen RotilaboTM-Spritzenfilter (0.2µm, Roth) aus der Lösung entfernt. Anschließend wird das Protein einem zusätzlichen RP-HPLC Reinigungsschritt unterzogen (siehe 2.7.5). Die Fraktionen werden photometrisch und mittels SDS-PAGE analysiert und danach vereinigt, eingefroren und gefriergetrocknet (Christ, Alpha 1-2).

2.8 Größenausschluss-Chromatographie

Säule:	Tricorn Superose TM6 (GE Healthcare)
Chromatographie System:	BioLogic Duoflow (BioRad)
Puffer:	20mM Tris pH 7.5, 500mM NaCl

Durch die Gelfiltrations- oder auch Größenausschluss-Chromatographie werden Proteine nach der Molekülgröße aufgetrennt. Dabei interagieren kleinere Moleküle stärker mit der Säulenmatrix als größere Moleküle und haben deshalb eine längere Retentionszeit.

Die Proben werden mit Hilfe einer 100µl Injektionsschleife auf die zuvor equilibrierte Säule aufgetragen. Anschließend werden die Proteine bei einer Flussgeschwindigkeit von 0.5ml/min nach ihrer Größe aufgetrennt. Es werden 0.5ml-Fractionen gesammelt. Die Elution der Proteine wird durch Messung der UV-Absorption bei 280nm detektiert. Proteinhaltende Fraktionen werden mittels SDS-PAGE analysiert.

2.8.1 Kalibrierung der Gelfiltrationssäule

Für eine Kalibrierung der Gelfiltrationssäule werden nacheinander verschiedene Proteine mit bekanntem Molekulargewicht injiziert und das Elutionsvolumen V_1 bestimmt. Hierfür wurden die Proteine BSA (67000Da, 3mg/ml), Ovalbumin (43000Da, 3mg/ml) und Lysozym (14000Da, 3mg/ml) verwendet. Außerdem werden noch zwei weitere säulenspezifische Parameter benötigt. Das totale Säulenvolumen V_t wird durch die Injektion von 100 µl 10% Acetonlösung bestimmt. Das Ausschlussvolumen V_0 wird durch die Injektion von 100 µl einer Dextranblaulösung (1mg/ml) bestimmt. Die Berechnung der relativen Elutionsvolumina K_{av} erfolgt nach folgender Formel:

$$K_{av} = (V_t - V_0) / (V_1 - V_0)$$

Zwischen dem relativen Elutionsvolumen K_{av} und dem dekadischen Logarithmus der Molekulargewichte der Proteine besteht ein linearer Zusammenhang. Nun wird K_{av} gegen $\log(M_w)$ der Markerproteine aufgetragen und eine Regressionsgerade bestimmt. Mit Hilfe dieser Gleichung kann aus dem relativen Elutionsvolumen V_1 des zu testenden Proteins dessen apparentes Molekulargewicht berechnet werden.

2.9 Massenspektrometrische Untersuchungen

2.9.1 Messung

Die gereinigten und entsalzten Proteine oder Peptide werden durch Elektrospray-Ionisations- (ESI-) Massenspektrometrie (MS) analysiert (Mann, *et al.*, 1995). MS-Spektren werden mit einem Bruker APEX II Fourier-Transform-Ionencyclotronresonanz (FTICR-) Massenspektrometer, ausgestattet mit einem 7.5T Magneten, aufgenommen. Die Proteinproben (1 μ M in 50% Methanol, 1% Essigsäure) werden nach Ionisierung mittels einer Apollo Elektrospray-Elektronenquelle im Positive-Ionen-Modus detektiert.

2.9.2 Proteolyse mit Trypsin und Endoproteinase GluC in Lösung

Die Proteine werden in 50mM NH₄HCO₃ pH 8 gelöst (0.5mg/ml). Dann wird die Endopeptidase GluC (NEB) im Verhältnis 1:20 zugegeben und die Lösung für 7 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Probe für 45min bei 65°C inkubiert. Danach wird Trypsin (Promega) im Verhältnis 1:100 zugegeben und die Lösung wird über Nacht bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wird mittels SDS-PAGE analysiert. Dann werden die Peptide mittels RP-HPLC aufgetrennt.

2.9.2.1 RP-HPLC C18

Auftragspuffer A: 0.1% TFA in ddH₂O (Roth)
Elutionspuffer B: Acetonitril (Roth)
Säule: 218TP54 C18 (P_{max}:1200psi) (VYDAC)
Porengröße: 10 μ m
Maße: 4.6mm x 250mm
Chromatographiesystem: ÄKTA Purifier (GE Healthcare)

Die Peptidlösung wird vollständig auf die vorher in Auftragspuffer equilibrierte Säule aufgetragen. Nach einem Waschschrift mit Auftragspuffer werden die Peptide durch einen linearen Gradienten (55min 95% A- 50% A, Flussrate 0.5ml/min) eluiert. Die Peptide werden bei 214nm detektiert. Es werden Fraktionen zu 0.5ml gesammelt. Die Fraktionen werden gefriergetrocknet und für die massenspektrometrische Analyse in 50% Methanol, 1% Essigsäure gelöst.

2.10 Analyse des Glykosylierungsmusters von Sclerostin

2.10.1 Detektion von Glykokonjugaten mit der Periodsäure Schiff-Färbung (PAS)

Mit Hilfe der PAS-Färbung können Glykokonjugate an Proteinen detektiert werden. Durch die im PAS-Reagenz vorhandene Periodsäure werden die freien Hydroxylgruppen der Saccharide zu Aldehydgruppen oxidiert, die dann mit dem im Schiff-Reagens vorhandenen schwefelsauren Fuchsin rot-violette Komplexe bilden. Hierfür werden die Proteine mittels SDS-PAGE (siehe 2.5.1) aufgetrennt und mit Hilfe des „Glycoprotein Detection Kit“ (Sigma) nach Herstellerangaben gefärbt.

2.10.2 In-Gel Proteolyse mit Trypsin nach Deglykosylierung mit PNGaseF

Kit: ProteoProfile™ In-Gel Enzymatic N-Deglycosylation Kit (Sigma)
Entfärberlösung: 200mM (NH₄)₂CO₃, 40% Acetonitril
Remobilisierungslösung: 25mM Tris, 192mM Glycin
Trypsin Reaktionspuffer: 40mM (NH₄)₂CO₃, 9% Acetonitril

5µg Protein werden pro Geltasche mittels SDS-PAGE (siehe 2.5.1) unter nativen Bedingungen (ohne β-Mercaptoethanol) aufgetrennt. Nach Coomassie-Färbung (siehe 2.5.2.1) wird die gewünschte Gelbande ausgeschnitten und die Proteine werden durch Inkubation in 1% Essigsäure bei 4°C über Nacht immobilisiert. Dann werden die Gelstücke durch Zugabe von 200µl Entfärberlösung für 30min bei 37°C entfärbt. Die Gelstücke werden in der SpeedVac (Bachofer) getrocknet und anschließend in der Remobilisierungslösung inkubiert (30min, 37°C). Dann werden die Gelstücke zweimal für 5 min mit jeweils 100µl Acetonitril versetzt. Zu einem Gelstück werden 10µl PNGase-Lösung (5Units, Kit Sigma)) zugegeben und für 30min bei 37°C inkubiert. Dann werden 20µl ddH₂O zugegeben und über Nacht bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 200µl ddH₂O wird das Gelstück im Vakuum (SpeedVac Bachofer) getrocknet. Anschließend werden 20µl Trypsinlösung (Kit, Sigma) zu beiden Gelstücken zugegeben und 30min bei 37°C inkubiert. Dann wird 50µl Trypsin-Reaktionspuffer zugegeben und über Nach bei 37°C inkubiert. Der Überstand wird in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgäß überführt. Es werden 50µl Peptid-Extraktionslösung zum Gelstück gegeben und für 30min bei 37°C inkubiert. Beide Überstände werden vereinigt

und in der SpeedVac (Bachofer) auf die Hälfte eingengt. Die enthaltenen Peptide werden mit Hilfe eines Zip-Tips C18 (Millipore) nach Herstellerangaben entsalzt. Für die Elution der Peptide wird 50% Methanol, 1% Essigsäure verwendet. Die Peptide werden anschließend massenspektrometrisch analysiert (siehe 2.9.1).

2.11 Zellbasierende Nachweisverfahren zur Bestimmung der Proteinaktivität

2.11.1 Kultivierung von HEK293T-Zellen

2x-Trypsinlösung: 5% Trypsin-EDTA-Lösung (10x, Gibco), fünffach in PBS verdünnen

HEK293T-Zellen (humane embryonale Nieren Zellen, ATCC, LGC-Promochem) werden in DMEM-Medium (Invitrogen, mit 10% (v/v) FCS, 100U/ml Penicillin-G, 100µg/ml Streptomycin) in 175cm²-Zellkulturflaschen (Greiner) bei 37°C, 5% CO₂ im Inkubator (C200, Labotec) kultiviert. Sind die Zellen konfluent, werden sie alle 4-5 Tage passagiert. Das verbrauchte Medium wird abgesaugt und 3ml 2x-Trypsinlösung werden zugesetzt. Wenn sich die Zellen vom Flaschenboden gelöst haben, werden 7ml frisches Medium zugegeben. 0.5ml der Zellsuspension werden in eine neue 175cm²-Zellkulturflaschen überführt und mit 30ml frischem Medium versetzt.

2.11.2 Kultivierung von L-mWnt3a und L-Zellen

L-mWnt3a-Zellen (CRL-2647, ATCC) und L-Zellen (CRL-2648, ATCC) werden in DMEM-Medium (Invitrogen, mit 10% (v/v) FCS, 100U/ml Penicillin-G, 100µg/ml Streptomycin) in 75cm²-Zellkulturflaschen (Greiner) bei 37°C, 5% CO₂ im Inkubator (C200, Labotec) kultiviert. Im Fall von L-mWnt3a Zellen wird dem Medium noch 0.4mg/ml G418 Sulfat (BioWest) zugesetzt. Sind die Zellen konfluent, werden sie alle 4-5 Tage passagiert. Das verbrauchte Medium wird abgesaugt und 2ml Trypsinlösung werden zugesetzt. Wenn sich die Zellen vom Flaschenboden gelöst haben, werden 7ml frisches Medium zugegeben. 0.5ml der Zellsuspension werden in eine neue 75cm²-Zellkulturflaschen überführt und mit 25ml frischem Medium versetzt.

2.11.3 Gewinnung von mWnt3a Konditioniertem- oder Kontrollmedium

Eine konfluente 75cm²-Zellkulturflasche mit L-mWnt3a Zellen oder L-Zellen (für das Kontrollmedium) werden, wie in Kapitel 2.11.2 beschrieben, trypsinisiert und mit frischem Medium (ohne G418) auf ein totales Volumen von 10ml gebracht. Je 1ml der Zellsuspension wird in eine 10cm² Petrischale (Greiner) gegeben und mit 10ml frischem Medium (ohne G418) aufgefüllt. Die Zellen werden 4 Tage bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Dann wird das konditionierte Medium abgenommen und steril filtriert. Zu den verbleibenden Zellen wird erneut 10ml frisches Medium (ohne G418) zugegeben und die Zellen werden für weitere 4 Tage bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Das Medium wird erneut abgenommen und filtriert. Dann wird das Medium mit dem ersten konditionierten Medium vereinigt und als 1ml Aliquots bei -80°C bis zum Gebrauch gelagert (maximal ein Jahr).

2.11.4 Kultivierung von C3H10T1/2-BRE-Luc Zellen

Die mit dem BMP-Reporterkonstrukt p(BRE)₂-Luc stabil transfizierte mesenchymale Mäusezelllinie C3H10T1/2-BRE-Luc (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Peter ten Dijke, Leiden, Niederlande) wird in DMEM-Medium (Invitrogen, mit 10% (v/v) FCS, 100U/ml Penicillin-G, 100µg/ml Streptomycin, 200µg/ml G418 Sulfat (BioWest)) in 75cm²-Zellkulturflaschen (Greiner) bei 37°C, 5% CO₂ im Inkubator (C200, Labotec) kultiviert. Sind die Zellen konfluent, werden sie passagiert (alle 4-5 Tage). Das verbrauchte Medium wird abgesaugt und 3ml Trypsinlösung werden zugesetzt. Wenn sich die Zellen vom Flaschenboden gelöst haben werden 7ml frisches Medium zugegeben. 0.5ml der Zellsuspension werden in eine neue 75cm²-Zellkulturflasche überführt und mit 25ml frischem Medium versetzt.

2.11.5 Kultivierung von MC3T3E1-Zellen

Die Fibroblasten Zelllinie MC3T3E1 aus der Maus wird in αMEM (Invitrogen) mit 10% (v/v) FCS, 100U/ml Penicillin-G, 100µg/ml Streptomycin in 75cm²-Zellkulturflaschen (Greiner) bei 37°C, 5% CO₂ im Inkubator (C200, Labotec) kultiviert. Die Zellen werden zweimal pro Woche passagiert. Hierbei wird, wie oben beschrieben, das Medium abgesaugt und die Zellen werden mit 3ml Trypsin vom Flaschenboden abgelöst. Anschließend werden 7ml frisches Medium zugegeben. 2.5ml der Suspension werden in eine frische Flasche überführt und mit 25ml frischem Medium aufgefüllt.

2.11.6 Wnt-Reportergen-Nachweisverfahren

β -Galaktosidasepuffer: 200mM Natrium-Phosphatpuffer pH 7.3, 2mM MgCl₂, 100mM β -Mercaptoethanol, 1.33mg/ml ONPG

HEK293T-Zellen werden, wie in Kapitel 2.11.1 beschrieben, trypsinisiert und mit frischem Medium auf ein Volumen von 10ml gebracht. Die Zellzahl wird bestimmt (siehe 2.4.2) und die Suspension auf 1×10^5 Zellen/ml eingestellt. Für den Assay werden Poly-L-Lysin beschichtete 24-Well Zellkulturplatten (Greiner) verwendet. Pro Well werden 1×10^5 Zellen in 1ml Medium ausgesät und über Nacht bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Dann werden die Zellen mit 50ng pSV β -Gal (Promega), 200ng M50 Super8xTopFlash (Veeman, *et al.*, 2003) und 150ng pEF6V5HisA (leerer Vektor) pro Well transfiziert. Hierzu werden die drei Plasmide mit 50 μ l/Well DMEM (ohne FCS und Antibiotika) und 1.6 μ l/Well HEKfectin™ (Biorad) gemischt und für 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Das alte Medium wird abgenommen, durch 500 μ l pro Well frisches Medium ersetzt und 50 μ l des DNA/HEKfectin™ Gemisches werden pro Well zugegeben. Die Zellen werden erneut über Nacht bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Nun werden Proteinverdünnungen des zu untersuchenden Proteins hergestellt. Die gewünschten Konzentrationen werden achtfach konzentriert in 50 μ l/Well ddH₂O angesetzt. Pro Well werden 240 μ l altes Medium entnommen und jeweils 50 μ l der Proteinverdünnung zugegeben. Alle Konditionen werden als Doppelbestimmung durchgeführt. Nach 30min Inkubation bei Raumtemperatur werden 40 μ l/Well mWnt3a-konditioniertes oder Kontroll-Medium zugegeben (entspricht 40% konditioniertem Medium/Well) und die Zellen werden für 24h bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Dann wird das Medium von den Zellen rückstandslos abgenommen. Zum Lysieren der Zellen werden 100 μ l „Reporter Lysis Buffer“ (Promega) zugegeben. Die 24-Well Platte wird für 15min bei -80°C eingefroren und anschließend zur Lyse bei 37°C aufgetaut. Für die Bestimmung der Luciferaseaktivität werden 20 μ l/Well der Zellsuspension in ein Well einer weißen 96-Well Zellkulturplatte mit durchsichtigem Boden (Greiner) pipettiert. Dann werden 50 μ l/Well Luciferase Reagenz (Promega) zugegeben. Bei dieser Reaktion setzt die „Firefly“-Luciferase das eingesetzte Substrat „Beetle Luciferin“ unter ATP- und Sauerstoffverbrauch zu Oxyluciferin und AMP unter Entstehung von Licht um. Die Lumineszenz wird im Luminometer (Luminoskan Ascent, Labsystems) detektiert. Für die Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität werden 50 μ l/Well der Zellsuspension in eine durchsichtige 96-Well Zellkulturplatte pipettiert und mit 50 μ l/Well β -Galaktosidasepuffer versetzt. Die β -Galaktosidase hydrolysiert das Substrat ONPG zu

Galaktose und dem gelben o-Nitrophenol. Die Entstehung des gelben Chromophors wird bei 405nm detektiert (Multiskan Ascent, Thermo). Die gemessenen Lumineszenzwerte werden durch die entsprechenden Werte der β -Galaktosidaseaktivität dividiert (Normierung).

2.11.7 Smad1/5/8 Luciferase-Reporter-gen-Nachweisverfahren

Die mit einem BMP-Reporter-gen (BRE=BMP Responsive Element) p(BRE)₂-Luc stabil transfizierte Zelllinie C3H10T1/2-BRE-luc wird, wie in Kapitel 2.11.4 beschrieben, trypsinisiert und mit frischem Medium auf ein Volumen von 10ml gebracht. Dann wird die Zellzahl bestimmt (siehe 2.4.2) und diese anschließend auf 3×10^4 Zellen/ml eingestellt. Pro Well einer 24-Well-Platte (Greiner) werden 3×10^4 Zellen in 1ml Medium ausgesät und über Nacht bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Das alte Medium wird abgesaugt und 350 μ l/Well Hungermedium (DMEM mit **0.1% FCS** (v/v) und 100U/ml Penicillin-G, 100 μ g/ml Streptomycin) zugegeben. Es werden Proteinverdünnungen (Endkonzentrationen/Well: 120nM, 250nM, 900nM) des zu untersuchenden Proteins hergestellt. Die gewünschten Konzentrationen werden achtfach konzentriert in 50 μ l/Well ddH₂O angesetzt. Außer dem zu untersuchenden Protein enthält die Proteinverdünnung noch 80ng BMP-2 in 50 μ l, so dass die Endkonzentration an BMP-2 im Assay pro Well 200ng/ml beträgt. Die 50 μ l Proteinverdünnung wird nun in das vorgesehene Well pipettiert. Der Negativkontrolle werden nur 50 μ l Wasser zugegeben, der Positivkontrolle 80ng BMP-2 in 50 μ l Wasser. Alle Konditionen werden als Doppelbestimmung durchgeführt. die Zellen werden für 24h bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Dann wird das Medium von den Zellen rückstandslos abgenommen. Zum Lysieren der Zellen werden 100 μ l Reporter Lysis Buffer (Promega) zugeben. Die 24-Well Platte wird für 15min bei -80°C eingefroren und dann bei 37°C aufgetaut. Für die Bestimmung der Luciferaseaktivität werden 20 μ l/Well der Zellsuspension in ein Well einer weißen 96-Well Zellkulturplatte mit durchsichtigen Böden (Greiner) pipettiert. Dann werden 50 μ l/Well Luciferase Reagenz (Promega) zugegeben. Die Lumineszenz wird im Luminometer (Luminoskan Ascent, Labsystems) detektiert.

2.11.8 ALP-Nachweisverfahren

ALP1-Puffer: 0.1M Glycin pH 9.6, 1% NP-40, 1mM MgCl₂, 1mM ZnCl₂

ALP2-Puffer: 9ml (0.1M Glycin pH 9.6, 1mM MgCl₂, 1mM ZnCl₂)
+ 1ml para-Nitrophenylphosphat (PNPP) (20mg/ml)

MC3T3E1-Zellen werden, wie in Kapitel 2.11.5 beschrieben, trypsinisiert und mit frischem Medium auf ein Volumen von 10ml gebracht. Dann wird die Zellzahl bestimmt (siehe 2.4.2) und die Zellzahl der Suspension auf 1×10^5 Zellen/ml eingestellt. Pro Well einer 24-Well Platte von Greiner werden 1×10^5 Zellen in 1ml Medium ausgesät und über Nacht bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Zellen sollten konfluent sein. Dann wird das alte Medium von den Zellen abgesaugt und durch 400µl/Well osteogenes Medium (α MEM mit 1% (v/v) FCS, 100U/ml Penicillin-G, 100µg/ml Streptomycin, 50µg/ml Ascorbinsäure, 10mM β -Glycerophosphat, 2mM Glutamin, 300ng/ml BMP2), welches das zu testende Protein in der gewünschten Konzentration enthält, ersetzt. Alle Konditionen werden als Doppelbestimmung durchgeführt. Die Zellen werden anschließend für 4 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Das Medium wird abgesaugt und die Zellen mit 1ml PBS gewaschen. Das PBS wird verworfen und es werden 300µl/Well ALP 1-Puffer zugegeben und für 2h bei RT inkubiert. Zu den lysierten Zellen wird 300µl/Well ALP 2-Puffer zugegeben und bis zur Gelbfärbung bei 37°C inkubiert. Die Entstehung des gelben Chromophors wird bei 405nm detektiert (Multiskan Ascent, Thermo).

2.12 Analyse von Protein-Protein-Interaktionen durch die Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie

System: Biosensor BIAcore2000™ (Pharmacia Biosensor)

Chip: Sensor Chip CM5 (research grade) (BIAcore)

HBS150-Puffer: 10mM Hepes, pH 7.5, 150mM NaCl, 0.005% (v/v) Surfactant P20

HBS300-Puffer: 10mM Hepes, pH 7.5, 300mM NaCl, 0.005% (v/v) Surfactant P20

Durch die Oberflächenplasmonresonanz Spektroskopie (SPR, „surface plasmon resonance“) lassen sich Protein-Protein-Interaktionen an einer Chipoberfläche in Echtzeit beobachten und die Bindungskinetik analysieren. Ein an den Sensorchip gekoppeltes Protein wird mit einer Lösung eines interagierenden Proteins perfundiert. Kommt es zu einer Bindung zwischen den beiden Proteinen, so detektiert das BIAcore-Gerät die Massenzunahme an der Chipoberfläche

pro Zeiteinheit durch die Änderung des Brechungsindex. Die Änderung des Brechungsindex und damit die Massenänderung an der Chipoberfläche im Zeitverlauf wird in einem Sensorgramm dargestellt. Als Einheit für die Massenänderung werden hierbei sog. „resonance units“ (RU) verwendet. Die Änderung um 1 RU entspricht dabei etwa einer Massenänderung von $1\text{pg}/\text{mm}^2$. Ein Messzyklus am BIAcore-Gerät ist in drei typische Phasen unterteilt: Die Assoziationsphase, die Plateauphase, in der sich Assoziation und Dissoziation im Gleichgewicht befinden (sog. Equilibrium-Bindung) und die Dissoziationsphase. Aus der Assoziations- und Dissoziationsphase lassen sich (mit Hilfe des Computerprogramms BIAevaluation 2.0 (BIAcore)) die kinetische Assoziationsrate k_a und die kinetische Dissoziationsrate k_d bestimmen. Aus diesen beiden kinetischen Konstanten lässt sich die apparente Dissoziationskonstante K_D der Interaktion berechnen ($K_D = k_d/k_a$). Ist es aufgrund eines sehr hohen k_d ($>10^{-2}\text{s}^{-1}$) oder k_a -Wertes ($>5 \times 10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) nicht möglich, diese aus den Rohdaten zu bestimmen, so kann die K_D durch die konzentrationsabhängige Gleichgewichtsbindung (R_{eq}) des Analyten bestimmt werden. Unter der Annahme eines Langmuir'schen Modells einer 1:1 Interaktion kann der K_D -Wert nach der Gleichung $R_{eq} = R_{max} \cdot C / (K_D + C)$ berechnet werden, wobei R_{max} den Messwert bei Erreichen der maximalen Bindekapazität der Chipoberfläche und C die Konzentration des Analyten angibt. Zum Koppeln von Proteinen an den Sensorchip werden diese zunächst biotinyliert (siehe 2.5.5). Durch die Interaktion zwischen Biotin und dem mit Streptavidin gesättigten CM5-Sensorchip können die biotinylierten Proteine kontrolliert und in gewünschter Dichte auf der Chipoberfläche immobilisiert werden. Zwischen zwei Messzyklen wird der Chip jeweils durch zweiminütiges Spülen mit einer Lösung aus 0.1mM Essigsäure, 1M NaCl, 6M Harnstoff regeneriert. Alle Messungen werden durch die Subtraktion eines Kontrollsensorgramms, das im beschriebenen Fall mit Streptavidin und IL4R α beschichteten Flusszelle 1 parallel aufgezeichnet wurde, korrigiert, um den Einfluss von unspezifischen Wechselwirkungen zwischen dem Analyten und der Chipmatrix zu minimieren. Zur Untersuchung der Interaktion zwischen Sclerostin und LRP6, BMP2 und BMP7 werden jeweils 100-500RU der biotinylierten Proteine auf dem Chip immobilisiert (IL4R α 500RU, LRP6 500RU, AbD09095 500RU, BMP7 200RU). Für die Analyse der Bindungskinetiken der Fab-Fragment Sclerostin Bindung wurden 500RU der biotinylierten Fab-Fragmente auf dem Chip immobilisiert. Die Messungen werden mit einer Fließgeschwindigkeit von $10\mu\text{l}/\text{min}$ in HBS300-Puffer (für Sclerostin LRP6, BMP7 Interaktion) oder HBS150-Puffer (für Sclerostin Fab-Fragment Interaktion) bei 25°C durchgeführt.

2.13 NMR-Spektroskopie

2.13.1 Probenvorbereitung

NMR-Puffer: 20mM K-Phosphatpuffer pH 6, 50mM NaCl, 5% D₂O, 0.2% NaN₃
steril filtriert und entgast

Die Proteine werden in 250µl NMR-Puffer gelöst und in Shigemi-Röhrchen (Shigemi Corp., Japan) überführt. Die Konzentration der Proteinproben betrug zwischen 0.25 und 1mM.

2.13.2 NMR-Messungen

Die NMR-Messungen wurden von Dr. Peter Schmieder oder Monika Beerbaum (Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie, Berlin, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Hartmut Oschkinat) durchgeführt. Alle NMR-Spektren wurden bei 27°C gemessen. Zur Datenaquisition wurden verschiedene Bruker Advance Spektrometer mit ¹H-Resonanzfrequenzen von 600, 750 und 900MHz verwendet. Es wurden Tripleresonanz, Tripleachsen Cryoprobeköpfe verwendet. Die gemessenen Spektren sind in Tabelle 23 im Anhang aufgelistet.

2.13.3 Prozessieren der Spektren

Die Spektren wurden mit den Softwarepaketen XwinNMR und TopSpin prozessiert. In den indirekten Dimensionen wurde in der Regel auf die doppelte Anzahl der experimentell gemessenen Punkte aufgefüllt („Zero-filling“). In der direkten Dimension wurden die Daten mit einer GM-Funktion („gaussian-to-lorentzian“ Multiplikation) und in den indirekten Dimensionen mit einer Q-Sinus-Funktion (cos²-Funktion) adipodisiert und anschließend fouriertransformiert. In den indirekten Dimensionen wurden für die 3D-Experimente Datenpunkte durch lineare Vorhersage hinzugefügt (in der Regel 50% zusätzliche Datenpunkte). Alle Experimente wurden phasensensitiv aufgenommen. Die Basislinie wurde nach Phasenkorrektur durch SPLINE-Funktionen geglättet. Die Daten wurden mit Aurelia (Bruker) analysiert.

2.13.4 Zuordnung der chemischen Verschiebungen

Die sequenzielle Zuordnung der Proteinhauptkette erfolgt aus einem Satz von „Triple-Resonanz-Experimenten“ (Cavanagh, *et al.*, 1996). Zunächst wird das Spektrenpaar CBCA(CO)NH und CBCA(N)NH für die Zuordnung verwendet. Anschließend wird die so erhaltene sequenzielle Zuordnung anhand des Spektrenpaars HN(CA)CO und HNCO überprüft. Die Zuordnung der chemischen Verschiebungen der Seitenkettenprotonen erfolgte aus den Spektren HBHA(CO)NH, H(C)(CO)NH-TOCSY, HCCH-COSY, HCCH-TOCSY und HCCH-COSY. Die Zuordnung der chemischen Verschiebungen der Aromatenprotonen erfolgte im 2D-NOESY und im 2D-TOCSY Spektrum.

2.13.5 Ermittlung der Sekundärstruktur aus NOESY-Spektren

Für die Ermittlung der Sekundärstruktur wird das 3D-¹⁵N-HSQC-NOESY auf das Vorhandensein spezieller NOE-Kreuzsignale analysiert, die für die gängigen Sekundärstrukturelemente (β -Faltblatt, α -Helix) charakteristisch sind (siehe Tabelle 11). Die Volumina (stark, mittel, schwach) der NOE-Kreuzsignale werden gegen die Aminosäuresequenz aufgetragen.

NOE	Sekundärstrukturelement
$H\alpha_i - NH_{i+1}$	β -Faltblatt
$NH_i - NH_{i+1}$	α -Helix
$H\alpha_i - H\beta_{i+3}$	α -Helix
$H\alpha_i - NH_{i+3}$	α -Helix
$NH_i - NH_{i+2}$	Schleife

Tabelle 11: Charakteristische NOE-Kreuzsignale in den Sekundärstrukturelementen β -Faltblatt und α -Helix.

2.13.6 Sekundärstrukturermittlung nach Wishart

Die chemischen Verschiebungen der H α -Protonen werden mit Hilfe des von Wishart *et al.* entwickelten Algorithmus interpretiert (Wishart, *et al.*, 1992). Für jede Aminosäure wird aus der Differenz zwischen tatsächlich beobachteter H α -Protonen-Verschiebung und dem entsprechenden Wert in ungeordneten Strukturen „random coil“ ein chemischer Verschiebungsindex (CSI) abgeleitet. Eine negative Abweichung von mehr als -0.1ppm entspricht dabei einem Index von -1 , eine positive Abweichung von mehr als 0.1ppm einem Index von $+1$. Werte dazwischen ergeben einen Index von 0 . Der chemische Verschiebungsindex wird gegen die Aminosäuresequenz aufgetragen. Ist der chemische Verschiebungsindex für einen Abschnitt von drei oder mehr Aminosäuren -1 , so weist dieser Bereich eine helikale Sekundärstruktur auf, ein Verschiebungsindex von $+1$ deutet auf β -Faltblattelemente hin.

Auch die chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffatome (C α , CO) hängen von ihrer Umgebung im Protein ab. Die Kerne erfahren in einer α -Helix oder einem β -Faltblatt eine charakteristische Hoch- bzw. Tieffeldverschiebung gegenüber den Frequenzen, die bei ungeordneten Peptiden beobachtet werden (Wishart, *et al.*, 1995). Für die Analyse wird die Differenz von „random coil“-Wert und Messwert gebildet und das Ergebnis wird gegen die Aminosäuresequenz aufgetragen. Werte mit negativem Vorzeichen deuten auf α -helikale Bereiche, Werte mit positivem Vorzeichen deuten auf Bereiche mit β -Faltblatt-Struktur hin.

2.13.7 Distanzermittlung durch NOEs

Die Abstandsinformationen werden aus verschiedenen 2D- und 3D-NOESY-Experimenten gewonnen (2D-NOESY Spektren (in H $_2$ O und D $_2$ O), ^{13}C -HSQC-NOESY (3D), ^{15}N -HSQC-NOESY (3D)). Die Distanzinformation wird aus den Volumina der NOE-Kreuzsignale ermittelt und in 3 Klassen unterteilt: Stark ($2.5\text{-}1.8\text{ \AA}$), Mittel ($3.5\text{-}1.8\text{ \AA}$), Schwach ($5\text{-}1.8\text{ \AA}$). Für nicht stereospezifisch zugeordnete Protonen von Methylgruppen und aromatischen Ringen werden so genannte Pseudoatome (geometrisches Zentrum) eingeführt. Es wurden so genannte Pseudoatomkorrekturen für den oberen Grenzabstand eingeführt, diese betragen für Methyl- und Methylengruppen 1.5 \AA und für Aromatenprotonen um 2.5 \AA .

2.13.8 Berechnung der ϕ - Ψ -Winkel mit TALOS

Die Torsionswinkel ϕ und Ψ der Proteinhauptkette wurden mit Hilfe des Programms TALOS („Torsion Angle likelihood obtained from shift and sequence similarity“) basierend auf den chemischen Verschiebungen von $H\alpha$, $C\alpha$, $C\beta$, CO und N ermittelt (Cornilescu, *et al.*, 1999). Das Verfahren beruht auf einem Vergleich der chemischen Verschiebungen der genannten Kerne von drei aufeinander folgenden Aminosäuren mit chemischen Verschiebungen analoger Triplets aus bekannten Strukturen, die in einer Datenbank zusammengefasst sind. Wird ein Aminosäuretriplet mit analoger Sequenz und analogen chemischen Verschiebungen in der Datenbank identifiziert, so ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass die Torsionswinkel ϕ und Ψ der mittleren Aminosäure des Triplets in der unbekannt Struktur den Torsionswinkeln der mittleren Aminosäure des Referenztriplets in der Datenbank ähnlich sind.

2.13.9 Strukturberechnung

Die Strukturberechnung erfolgte mit dem Programm XPLOR (NIH Version 2.21 (Schwieters, *et al.*, 2003) unter Anwendung des Protokolls des „simulated annealing“. Der Strukturberechnung werden die ermittelten NOE-Distanzeinschränkungen, die berechneten Torsionswinkel und die chemischen Verschiebungen für die $C\alpha$ - und die $C\beta$ -Atome der Aminosäuren zugrunde gelegt. Für das finale Modell wurden 100 Strukturen berechnet. Aus diesen 100 Strukturen wurden 15 Strukturen auf der Basis der niedrigsten Gesamtenergie und der geringsten Zahl an Abstands- und Winkelverletzungen ausgewählt. Aus diesen wurde eine gemittelte Struktur berechnet, welche die Strukturschar repräsentiert. Die Strukturen wurden mit den Programmen PROCHECK validiert (Laskowski, *et al.*, 1996).

2.13.10 Auswertung des $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ Hetero-NOE-Experiments

Das Hetero-NOE-Experiment gibt Auskunft über die Dynamik des H-N-Bindungsvektors im Raum bezogen auf die Gesamtstruktur. Es werden zwei Experimente durchgeführt, wobei für das erste Experiment der Hetero-NOE-Effekt durch die gewählten In-Resonanzbedingungen erfolgte, wohin gegen das andere Experiment unter Off-Resonanzbedingungen durchgeführt wird. In beiden Spektren werden die $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ Hetero-NOE-Kreuzsignale integriert und die Volumina korrespondierender Signale dividiert, so dass Werte kleiner 1 erhalten werden, die gegebenenfalls auch negativ werden können. Der so erhaltene $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -Hetero-NOE-Wert wird gegen die Aminosäuresequenz aufgetragen. Aminosäuren in strukturierten Bereichen

weisen einen $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -Hetero-NOE-Wert von ungefähr 1 auf, da sich die Volumina der Signale hier kaum unterscheiden. Liegt eine Aminosäure in einem flexiblen Bereich des Proteins, so ist der $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -Hetero-NOE-Wert deutlich kleiner als 1.

2.13.11 Identifizierung des Bindeepitops von murinem Sclerostin an das Fab-Fragment AbD09097 mittels NMR-Spektroskopie

NMR-Puffer: 20mM K-Phosphatpuffer pH 6.0, 50mM NaCl, 5% D₂O, 0.2% NaN₃

Für die Bestimmung des Bindeepitops von murinem Sclerostin an das Fab-Fragment AbD09097 wurden zwei Proben vorbereitet. Für die eine Probe wurde ^{15}N -markiertes murines Sclerostin_ΔNC in NMR-Puffer gelöst (Konzentration 100μM, 25nmol in 250μl), für die andere Probe wurde ^{15}N -markiertes murines Sclerostin_ΔNC und AbD09097 im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 gemischt (je 25nmol). Beide Proben wurden zweimal gegen 500ml NMR-Puffer dialysiert und die Probe, die den Fab-Fragment/Sclerostin-Komplex enthielt wurde auf ein Volumen von 250μl aufkonzentriert (Centricon). Beide Proben wurden in ein Shigemi-Röhrchen (Shigemi Corp., Japan) überführt. Für jede Probe wurden ein $^1\text{H}^{15}\text{N}$ 2D-HSQC Spektrum gemessen (siehe 2.13.2).

3 Ergebnisse

3.1 Gewinnung von wildtypischem Sclerostin aus Insektenzellkulturüberstand

Sclerostin ist ein sekretiertes Protein mit einem theoretischen Molekulargewicht von etwa 23000Da und besitzt zwei putative N-Glykosylierungsstellen (Kusu, *et al.*, 2003). Die Aminosäuresequenz des reifen Proteins beinhaltet acht Cysteine. Für eine strukturelle und funktionelle Charakterisierung sollte Sclerostin zunächst in biologisch aktiver Form exprimiert und isoliert werden. Für die Expression wurde das dem Säugerzellensystem ähnliche, heterologe Insektenzellen-Expressionssystem gewählt, wodurch der Transport durch das sekretorische System mit möglichen posttranslationalen Modifikationen sichergestellt wurde. Für die Expression wurden zwei Expressionskonstrukte mSOST_pACGP67b (für murines Sclerostin) und hSOST_pACGP67b (für humanes Sclerostin) mit BaculoGoldTM linearisierter Baculovirus DNA in *Sf9*-Zellen kotransfiziert (siehe 2.4.3) (Beide Expressionskonstrukte wurden freundlicherweise von Christian Söder zur Verfügung gestellt). Beide Konstrukte enthalten N-terminal eine gp67-Signalsequenz (Signalsequenz des „major envelope glycoprotein“ gp67 des *Autographa californica* Virus) für die Sekretion und C-terminal eine Thrombinschnittstelle, gefolgt von einer Hexahistidinsequenz. Die Sequenzen sind im Anhang aufgelistet. Der rekombinante Virus wurde in *Sf9*-Zellen amplifiziert und die Expression und Sekretion beider Proteine durch Western Blot mit einem α -His-Tag-Antikörper bestätigt. Die Expression beider Proteine erfolgte wie in Kapitel 2.4.7 beschrieben. Die Insektenzellen wurden mit einer Virenlösung mit einer MOI von 5 aus der vierten oder fünften Virusamplifikation infiziert. Nach viertägiger Inkubation bei 27°C, wurden die Zellen durch Zentrifugation vom Medium separiert und der Überstand für die Metallchelate-Affinitätschromatographie gegen Natriumphosphatpuffer dialysiert. Sclerostin konnte wie in Kapitel 2.6.1 beschrieben aufgereinigt werden. Die Analyse der Proteinlösungen nach der Metallchelate-Affinitätschromatographie mittels SDS-PAGE ergab, dass humanes als auch murines Sclerostin in den Proteinlösungen angereichert werden konnten, diese aber noch Verunreinigungen enthielten. Die Proteinlösungen wurden anschließend für die Reinigung mittels Kationenaustauschchromatographie dialysiert und wie in Kapitel 2.6.2 beschrieben über eine CM-Sepharose-Säule gereinigt. Die Analyse der Proteinlösungen nach der Kationenaustauschchromatographie durch SDS-PAGE zeigte, dass

Ergebnisse

die Proteine mit einer Reinheit von >95% erhalten werden konnten. In Tabelle 12 sind die Ausbeuten an Proteinmenge nach den angegebenen Reinigungsschritten dargestellt.

Reinigungsschritt:	Sclerostin (pACGP67b)	
	murin	human
Ni-Säule *	1.2mg/l	0.9mg/l
Ionenaustauscher	0.6mg/l	0.2mg/l

Tabelle 12: Ausbeuten von murinem und humanem Sclerostin aus *Sf9*-Insektenzellkultur. (* Gesamtproteinmenge, enthält Verunreinigungen.)

Die Ausbeute an humanem Sclerostin beträgt lediglich ein Drittel der Menge an murinem Sclerostin. Mögliche Gründe hierfür könnten eine geringere Translation aufgrund von mRNA-Sekundärstrukturen sein, eine schlechtere Sekretion oder eventuell auch ein stärkerer proteolytischer Abbau durch sekretierte Proteasen. Um Probleme bei der Translation auszuschließen und um Proteolyse zu minimieren, wurden die kodierenden Sequenzen für murines Sclerostin (mSOST) und humanes Sclerostin (hSOST) ohne Signalsequenz zwischen die Restriktionsschnittstellen BamHI und XhoI des Expressionsvektors pMK1 kloniert (Abbildung 12). Im Fall von humanem Sclerostin wurde ein synthetisches, für die Expression in *Drosophila melanogaster* optimiertes Gen verwendet. Der Vektor pMK1 (modifizierter pBac-3 von Novagen) ist kompatibel mit der BacVectorTM-3000-Triple Cut Virus DNA (Novagen), bei der nach homologer Rekombination ein V-cath-Proteinase defizienter Virus entsteht. Die Konstrukte mSOST_pMK1 und hSOST_opt_pMK1 enthalten N-terminal eine gp64-Signalsequenz (Signalsequenz des „major envelope glycoprotein“ gp64 des *Orgyia pseudotsugata multicapsid polyhedrosis* Virus) für die Sekretion des Proteins, gefolgt von einer Hexahistidinsequenz und einer Thrombinschnittstelle. Hexahistidinsequenz und Thrombinschnittstelle sind in diesem Fall N-terminal angehängt. Die Sequenzen der Konstrukte sind im Anhang zu finden. Die Plasmide mSOST_pMK1 und hSOST_opt_pMK1 wurden mit BacVectorTM-3000-Triple Cut Virus DNA in *Sf9*-Zellen kotransfiziert (vgl. 2.4.4). Die Expression und Sekretion von murinem Sclerostin und humanem Sclerostin wurde nach der zweiten Virusamplifikation durch Western Blot mit einem α -His-Tag-Antikörper überprüft (Abb. 12 C, D) und konnte für beide Konstrukte bestätigt werden. Die Expression und Aufreinigung beider Proteine erfolgte wie für die beiden Expressionskonstrukte

mSOST_pACGP67b und hSOST_pACGP67b beschrieben durch eine Metallchelataffinitätschromatographie gefolgt von einer Kationenaustauschchromatographie (Abb. 13, Abb. 14).

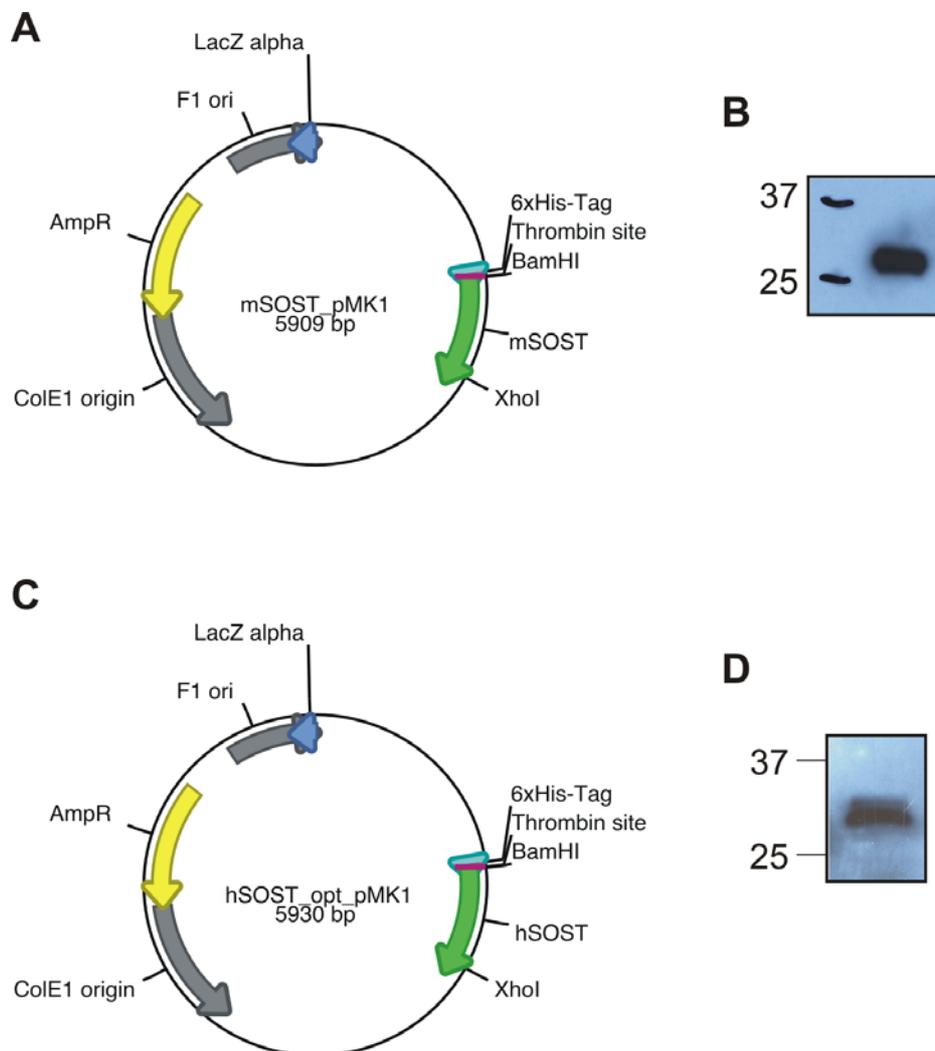


Abbildung 12: A) Vektorkarte von mSOST_pMK1, B) Western-Blot der zweiten Virusamplifikation von murinem Sclerostin, C) Vektorkarte von hSOST_opt_pMK1, D) Western-Blot der zweiten Virusamplifikation von humanem Sclerostin.

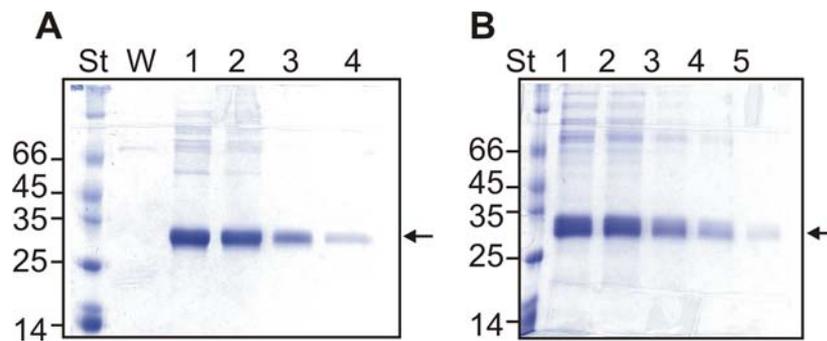


Abbildung 13: SDS-PAGE der Protein-enthaltenden Fraktionen der Metallchelate-Affinitätschromatographie. A) murines Sclerostin: St) Standard W) Waschfraktion, 1-4) murines Sclerostin-enthaltende Fraktionen. B) humanes Sclerostin: 1-5) humanes Sclerostin-enthaltende Fraktionen. Die Pfeile markieren die Proteinbande des murinen Sclerostins (links) und humanen Sclerostins (rechts).

Reinigungsschritt:	Sclerostin (pACGP67b)		Sclerostin (pMK1)	
	murin	human	murin	human
Ni-Säule*	1.2mg/l	0.9mg/l	1.8mg/l	0.84mg/l
Ionenaustauscher	0.6mg/l	0.2mg/l	0.8mg/l	0.4mg/l

Tabelle 13: Ausbeute von murinem Sclerostin und humanem Sclerostin aus *Sf9*-Insektenzellkultur. (* Gesamtproteinmenge, enthält Verunreinigungen.)

In Tabelle 13 sind die Ausbeuten an Protein für die verschiedenen Expressionskonstrukte nach den angegebenen Reinigungsschritten dargestellt. Für murines Sclerostin konnte durch die Verwendung des Expressionsvektors (pMK1) eine Ausbeutesteigerung von etwa 30% erzielt werden. Im Fall von humanem Sclerostin führten das codonoptimierte Gen und die Verwendung des BacVectorTM-3000-Systems zu einer Verdoppelung der Ausbeute. Trotz Ausbeutesteigerung ist die erhaltene Proteinmenge verhältnismäßig gering, weshalb bei identischer biologischer Aktivität (siehe Kapitel 3.4) die biochemischen und biophysikalischen Charakterisierungen mit dem leichter zugänglichen murinen Protein durchgeführt wurden.

In Abbildung 14 ist die SDS-PAGE-Analyse sowohl des murinen Sclerostins als auch des humanen Sclerostins unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen dargestellt. Das theoretische Molekulargewicht von murinem Sclerostin beträgt etwa 23000Da. Anhand der Markerproteine ergibt sich allerdings ein apparentes Molekulargewicht von etwa 30000Da. Die Diskrepanz zwischen dem theoretischen und dem apparenten

Molekulargewicht ist möglicherweise auf die Basizität des Proteins ($pI=9.5$) und die N-terminale Hexahistidinsequenz zurückzuführen. Der Vergleich von reduziertem und nicht reduziertem Protein im SDS-Gel zeigt, dass sich die apparenten Molekulargewichte von reduziertem und nicht reduziertem Protein nur minimal unterscheiden und dass Sclerostin somit kein disulfidverbrücktes Homodimer bildet, wie es für das DAN-Familienmitglied Cerberus beobachtet wird (Biben, *et al.*, 1998). Das rekombinante humane Sclerostin erscheint als zwei Spezies mit unterschiedlichen apparenten Molekulargewichten, was unter reduzierenden Bedingungen durch die Doppelbande im SDS-Gel deutlich wird. Gründe hierfür können unterschiedliche Glykosylierung oder der partielle Abbau durch Proteasen sein.

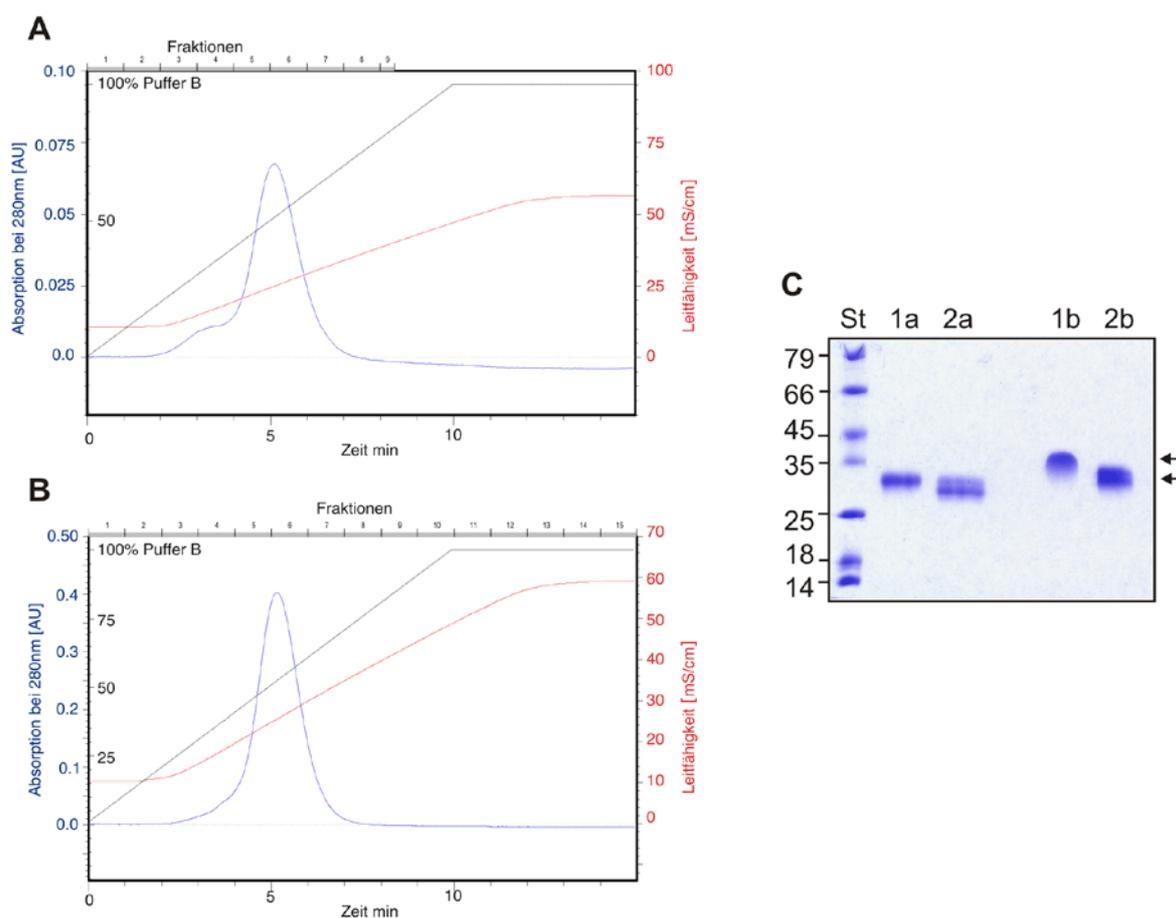


Abbildung 14: Chromatogrammprofile der Kationenaustauschchromatographie von murinem Sclerostin (A) und humanem Sclerostin (B) aus *Sf9*-Zellkultur. C) SDS-PAGE der vereinigten Fraktionen der Kationenaustauschchromatographie für (1) murines Sclerostin und (2) humanes Sclerostin (a unter reduzierenden Bedingungen, b unter nichtreduzierenden Bedingungen, St) Standard). Die Pfeile markieren die Proteinbande des murinen Sclerostins (oben) und humanen Sclerostins (unten).

3.2 Biochemische und biophysikalische Charakterisierung von wildtypischem Sclerostin

Zunächst sollte das exakte Molekulargewicht des rekombinanten murinen Sclerostins sowie des rekombinanten humanen Sclerostins bestimmt werden. Hierfür wurden die Proteine mittels „reversed-phase“ HPLC entsalzt und für die massenspektrometrische Analyse in 50% Methanol, 1% Essigsäure gelöst (siehe 2.9.1).

Es konnte weder murines noch humanes Sclerostin aus Insektenzellkultur direkt massenspektrometrisch analysiert werden. Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich in der Heterogenität der Proben, die möglicherweise durch eine inhomogene Glykosylierung der Proteine an zwei verschiedenen N-Glykosylierungsstellen (Asn²⁸ und Asn¹⁵⁰ in murinem Sclerostin) bedingt ist. Sind die Glykosylierungsstellen wie im Fall von murinem Sclerostin- Δ NC (Kapitel 3.3) nicht mehr vorhanden, so ist die massenspektrometrische Analyse des Proteins möglich.

Sclerostin wird aufgrund seiner Aminosäuresequenzhomologie der DAN-Familie zugeordnet. Für einige Mitglieder dieser Familie wird vermutet, dass sie Homodimere bilden. Ein zusätzliches Cystein, welches im Fall von Cerberus durch eine intermolekulare Disulfidbrücke zu einer kovalenten Homodimerisierung führt, kennzeichnet diese Gruppe (Biben, *et al.*, 1998). Sclerostin besitzt allerdings eine gerade Anzahl an Cysteinen und bildet daher kein disulfidverbrücktes Homodimer. Dies wird durch die SDS-PAGE-Analyse von murinem Sclerostin unter nicht reduzierenden Bedingungen belegt (Abb. 14). Über Gelfiltration sollte analysiert werden, ob Sclerostin in Lösung eventuell trotzdem ein nichtkovalent verknüpftes Homodimer bildet (siehe 2.8). Die Chromatographie wurde mit hohen Salzkonzentrationen im Laufpuffer (500mM NaCl) durchgeführt, da Sclerostin bei niedrigeren Salzkonzentrationen mit der Säulenmatrix wechselwirkt und so ionische Effekte das Elutionsverhalten stark beeinflussen. Um das apparente Molekulargewicht von Sclerostin zu bestimmen, wurde die Säule zuvor nach Herstellerangaben mit Dextranblau, Aceton und den Proteinen BSA (Serum Albumin, 67000DA), MBP (Maltose Binding Protein 42700DA) und Lysozym (14300DA) kalibriert. Aus der Retentionszeit von Sclerostin konnte über lineare Regression ein apparentes Molekulargewicht von 38000Da bestimmt werden. Sclerostin liegt somit in Lösung als Monomer vor. Ein möglicher Grund für die Abweichung vom theoretischen Molekulargewicht (23000Da) ist, dass für die Eichung globuläre Proteine

verwendet wurden und dass die dreidimensionale Struktur von Sclerostin relativ anisotrop ist und einige ungefaltete Bereiche enthält (siehe 3.6.4.1).

Dass Sclerostin in Lösung als Monomer vorliegt, konnte auch durch die Methode der dynamischen Lichtstreuung gezeigt werden. Mit dieser Methode kann die Partikelgröße von Molekülen in Lösung ermittelt werden. Dabei wird monochromatisches Licht durch eine spezielle Küvette mit drei Fenstern geleitet, die eine Proteinlösung enthält. Durch die Streuung des Lichtes an den Proteinmolekülen können Rückschlüsse bezüglich des hydrodynamischen Radius, der Molekulargewichte der Moleküle und der Polydispersität gezogen werden (siehe 2.5.6). Für Sclerostin (1mg/ml) in 20mM Na-Phosphatpuffer pH6 mit 50mM NaCl wurde ein hydrodynamischer Radius von 2.5nm und ein damit verknüpftes Molekulargewicht von 29000Da bestimmt. Die Polydispersität der Lösung beträgt 3.9%, das heißt, die Lösung ist monodispers, bzw. sie besteht nur aus Teilchen einer definierten Größe.

3.2.1 Analyse des Glykosylierungsmusters von Sclerostin aus Insektenzellen

Die Aminosäuresequenz von murinem Sclerostin enthält zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen. Eine ist im N-Terminus vor dem ersten Cystein (Sequenzmotiv N²⁸QT), eine weitere ist im C-Terminus nach dem letzten Cystein (Sequenzmotiv N¹⁵⁰QS) lokalisiert (Abb. 15). Durch die Periodsäure Schiff-Färbung (PAS „periodic acid Schiff-stain“) können Glykokonjugate an Proteinen photochemisch detektiert werden. Hierfür wurde murines Sclerostin (aus *Sf9*, pACGp67b) durch SDS-PAGE im Gel aufgetrennt und anschließend nach Herstellerangaben mit PAS-Reagenz gefärbt (siehe 2.10.1). Durch die Rosafärbung der Sclerostinbande im Gel konnte gezeigt werden, dass Sclerostin glykosyliert vorliegt (Abbildung 15).

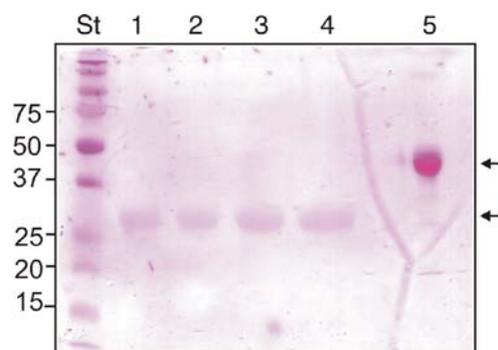


Abbildung 15: SDS-PAGE-Analyse von murinem Sclerostin PAS-gefärbt. 1-4) verschiedene Mengen an murinem Sclerostin, 5) Peroxidase als Positivkontrolle. Der obere Pfeil markiert die Proteinbande der Peroxidase, der untere Pfeil die des murinen Sclerostins.

Ergebnisse

Um zu analysieren, welche der beiden Stellen glykosyliert wird, wurde zunächst etwa 5µg murines Sclerostin (aus *Sf9*) unter reduzierenden Bedingungen im SDS-Gel aufgetrennt (zweifach durchgeführt). Beide Sclerostinbanden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und unterschiedlich behandelt. Die erste Probe wurde zunächst durch die Endoglykosidase PNGaseF deglykosyliert und anschließend mit der Endopeptidase Trypsin proteolytisch gespalten, die zweite Probe wurde ohne Deglykosylierung mit Trypsin behandelt. (siehe 2.10.2). PNGaseF hydrolysiert die Bindung zwischen Asn und dem ersten Zucker GlcNAc (N-Acetylglucosamin) und desaminiert dabei Asn zu Asp. Trypsin hydrolysiert Peptidbindungen nach Arg und Lys. Die so erhaltenen Peptide wurden aus den Gelstücken eluiert, entsalzt und massenspektrometrisch analysiert.

1	2	3	4	5		6	7
M soll [Da]	M ist [Da]		Diff	AS			Motiv
	PNGaseF	-		[ppm]	von		
	Trypsin						
2282.327	-	-		8	33	N ²⁸	NQT
2883.311	2883.316	-	2	8	33	D ²⁸	NQT
2229.105	2229.112	2229.119	5	148	166	N ¹⁵⁰	NQS
2230.089	-	-		148	166	D ¹⁵⁰	NQS

Tabelle 14: Auswertung der Proteolyse von murinem Sclerostin mit Trypsin mit vorheriger Deglykosylierung. Spalte 1: Theoretisches Molekulargewicht des Peptides aus Aminosäure x-y (siehe Spalte 5). Spalte 2: Messwerte der deglykosylierten und trypsinisierten Probe des Peptides aus Aminosäure x-y (siehe Spalte 5). Spalte 3: Messwerte der trypsinisierten Probe des Peptides aus Aminosäure x-y siehe Spalte 5. Spalte 4: Fehler in ppm. Spalte 5: Peptid aus Aminosäure x-y. Spalte 6: Aminosäure an Stelle der Glykosylierungsposition (Asparagin oder nach Deglykosylierung durch PNGaseF Aspartat) Spalte 7: Motiv der Glykosylierungsstelle.

In den Proben, die mit PNGaseF behandelt wurde, konnten zwei Peptidmassen detektiert werden (2883,316Da und 2229,112Da), die dem theoretischen Molekulargewicht der Peptide Asn⁸-Arg³³ und Phe¹⁴⁸-Lys¹⁶⁶ entsprechen, welche die Glykosylierungsstellen N²⁸QT bzw. N¹⁵⁰QS enthalten, falls Asn²⁸ zu Asp desaminiert wurde (siehe Tabelle 14). Die Peptidmasse (2230,089Da), die dem Molekulargewicht des Peptides Phe¹⁴⁸-Lys¹⁶⁶ entspricht, falls Asn¹⁵⁰ zu Asp desaminiert ist, wurde nicht gefunden. Ebenso konnte auch die Peptidmasse 2882,33Da, die dem Molekulargewicht des Peptides Asn⁸-Arg³³ entspricht, falls Asn²⁸ nicht desaminiert ist, nicht nachgewiesen werden. In der Probe, die nicht mit PNGaseF behandelt wurde, konnten nur eine der vier in Tabelle 14 dargestellten Peptidmassen detektiert werden

(2229,112Da). Diese entspricht dem theoretischen Molekulargewicht des Peptides Phe¹⁴⁸-Lys¹⁶⁶ (mit Asn¹⁵⁰). Daraus kann geschlossen werden, dass ausschließlich die N-terminale Glykosylierungsstelle (N²⁸QT) glykosyliert vorliegt und die C-terminale Glykosylierungsstelle (N¹⁵⁰QS) in *Sf9* exprimiertem Sclerostin nicht glykosyliert wird.

3.2.2 Analyse des Disulfidverbrückungsmusters von Sclerostin

Die Aminosäuresequenz von Sclerostin beinhaltet acht Cysteine, von denen sechs Cysteine eine Aminosäuresequenzfolge mit der Konsensussequenz C¹, C²xGxC³, C⁴, C⁵xC⁶ bilden, die für einen putativen Achtring-Cystinknoten codiert (Avsian-Kretchmer, *et al.*, 2004). Durch Vergleich mit bekannten Strukturen von Cystinknotenproteinen wie z.B. den BMPs wurde für Sclerostin ebenfalls ein Cystinknoten vorhergesagt. Dieser sollte durch massenspektrometrische Analyse von, durch gezielte Proteolyse entstandenen, disulfidverbrückten Peptide überprüft werden. Das Experiment wurde mit unterschiedlichen Sclerostinvarianten (siehe Kap. 3.3, 3.5) durchgeführt. Hier soll allerdings exemplarisch das Experiment mit der C-terminal verkürzten Variante (murines Sclerostin-ΔC) aus *E.coli*-Expression beschrieben werden.

Hierfür wurden 500 μg murines Sclerostin -ΔC (siehe Kapitel 3.5) unter nichtreduzierenden Bedingungen in Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer gelöst und zunächst für 7 Stunden bei 37°C mit der Endopeptidase GluC verdaut (siehe 2.9.2). GluC hydrolysiert die Peptidbindung bevorzugt nach Glutamat, spaltet aber auch nach Aspartat. Die entstandene Peptid/Proteasemischung wurde für 45 min auf 65°C erhitzt. Anschließend wurde die Protease Trypsin zugegeben und die Mischung über Nacht bei 37°C inkubiert. Die entstandenen Peptide wurden nun mittels RP-HPLC aufgetrennt (siehe 2.9.2.1). Peptid-enthaltende Fraktionen wurden gefriergetrocknet, in 50% Methanol, 1% Essigsäure gelöst und massenspektrometrisch analysiert.

Die durch die Spaltung von murinem Sclerostin-ΔC mit GluC und Trypsin entstandenen und detektierten Peptide sind in Tabelle 15 dargestellt und in die Aminosäuresequenz eingezeichnet (Abb. 16). Die Peptide decken einen Bereich von 88.6% der Aminosäuresequenz von murinem Sclerostin-ΔC ab.

Das theoretische Molekulargewicht der disulfidverbrückten Peptide wurde zuvor nach folgendem Schema berechnet:

$$m_{\text{Peptid-S-S-Peptid}} = m1_{\text{Peptid-SH}} + m2_{\text{Peptid-SH}} - m_{\text{H}^+} - 2m_{\text{H}}$$

Ergebnisse

Wobei m für die monoisotopische Masse eines einfach positiv geladenen Peptides steht, m_H für die monoisotopische Masse von Wasserstoff und m_{H^+} für die monoisotopische Masse eines Protons.

Peptidmasse [Da]	Sequenzabdeckung		Enthaltene Cys
	von AS	bis AS	
689.373	58	62	
731.393	71	77	
828.377	20	26	
853.525	89	96	
893.389	27	33	*
1330.644	99	108	
1446.651	34	46	
1802.853	53	56	55
	109	118	109
2076.958	47	56	55
	109	115	109
2087.052	63	70	69
	119	130	123
2111.033	78	88	80, 84
	136	141	140
	142	144	142
2352.129	13	33	
2368.124	13	33	*
2653.256	10	33	
2669.251	10	33	*
2882.326	8	33	
3114.387	20	46	
4719.260	49	57	55
	71	88	80, 84
	109	113	109
	133	144	140, 142

Aminosäuren in Peptiden detektiert von	147
Gesamtaminosäurezahl	166
entspricht einer Sequenzabdeckung von [%]	88.6

Tabelle 15: Liste einiger massenspektrometrisch detektierter Peptide der Proteolyse von murinem Sclerostin- Δ C mit GluC und Trypsin. Für alle Peptide ist das monoisotopische theoretische Molekulargewicht als einwertig geladenes Ion angegeben. Die Fehlergrenze für alle Peptide liegt im Bereich zwischen ± 20 ppm. Gelb, grün und orange hinterlegte Peptide repräsentieren den Cystinknoten. Das rot hinterlegte Peptid repräsentiert die zusätzliche Disulfidbrücke zwischen Cys⁶⁹ und Cys¹²³. Die Nummerierung bezieht sich auf die zu Sclerostin gehörenden Aminosäuren (Start mit Gln¹, siehe Abbildung 16 oben). *) Peptide enthalten ein oxidiertes Methionin. Dies führt zu einer Massenzunahme von 16Da.

[GSSHHHHHSSGLVPRGSHMEG]Q¹GWQAFRNDATEVIPGLGEYPEPPPENNQTMNRAENGGRRPPHH
 PYDAKDVSEYSC⁵⁵RELHYTRFLTDGPC⁶⁹SAKPVTELVCS⁸⁰SGQC⁸⁴GARLLPNAIGRVKWWRPNGPDF
 RC¹⁰⁹IPDRYRAQRVQLLC¹²³PGGAAPRSRKVRLVAS C¹⁴⁰KC¹⁴²KR¹⁴⁴

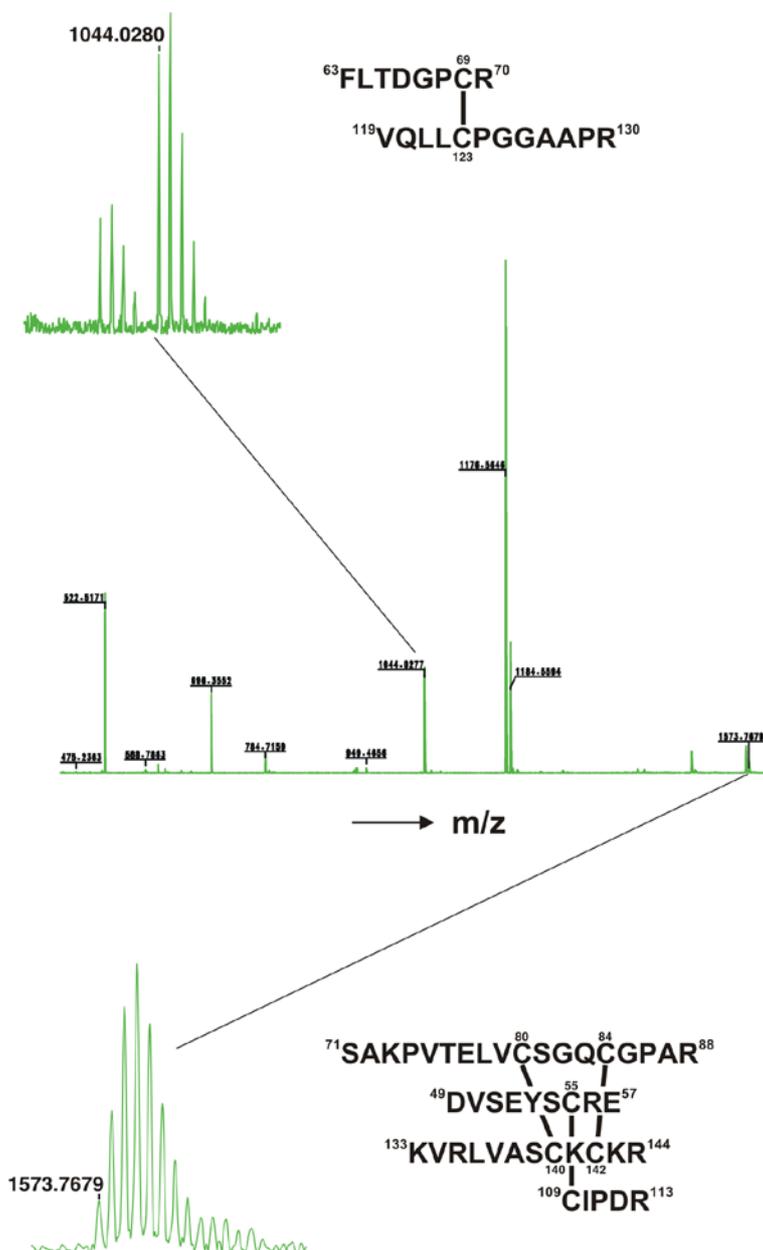


Abbildung 16: oben) Aminosäuresequenz von murinem Sclerostin- Δ C. Die eingeklammerten Sequenzabschnitte resultieren aus dem Expressionsvektor. Die unterlegten Sequenzabschnitte sind in Form von Peptiden massenspektrometrisch detektiert worden. In grau sind Peptide, die keine Cysteine enthalten, dargestellt. In rot und in grün sind Cystein-enhaltende Peptide dargestellt. Die Aminosäuren Glu, Asp, Arg, Lys nach denen die gewählten Proteasen die Peptidbindung hydrolysieren, sind in blau dargestellt. (Unten) Massenspektrum einer Peptid enthaltenden Fraktion des RP-HPLC gereinigten Proteolyseansatzes von murinem Sclerostin- Δ C. Zwei disulfidverbrückte Peptide sind vergrößert dargestellt. a) Phe⁶³-Arg⁷⁰ und Val¹¹⁹-Arg¹³⁰ verbrückt durch die Disulfidbrücke Cys⁶⁹-Cys¹²³. b) Ein den Cystinknoten repräsentierendes Peptid bestehend aus Asp⁴⁹-Glu⁵⁷, Ser⁷¹-Arg⁸⁸, Cys¹⁰⁹-Arg¹¹³ und Lys¹³³-Arg¹⁴⁴ verbunden durch 3 Disulfidbrücken (Cys⁸⁰-Cys¹⁴⁰, Cys⁸⁴-Cys¹⁴², Cys⁵⁵-Cys¹⁰⁹).

Unter anderem konnten Peptide detektiert werden, die durch mehrere Disulfide verbrückt sind und dem vorhergesagten Cystinknoten entsprechen. Diese Peptide sind in der Tabelle 15 farbig hervorgehoben. In Abbildung 16 sind exemplarisch zwei durch Disulfidbrücken verbundene Peptide von Sclerostin dargestellt. Das Peptid mit der monoisotopischen Masse 4719.29Da ($m/z = 1573.7679\text{Da}$, $z = 3$) entspricht dem Cystinknoten. Dieser setzt sich zusammen aus den Peptiden Asp⁴⁹-Glu⁵⁷, Ser⁷¹-Arg⁸⁸, Cys¹⁰⁹-Arg¹¹³ und Lys¹³³-Arg¹⁴⁴, welche durch drei Disulfidbrücken (Cys⁸⁰-Cys¹⁴⁰, Cys⁸⁴-Cys¹⁴², Cys⁵⁵-Cys¹⁰⁹) verbunden sind. Dabei wird angenommen, dass die Disulfidbrücke, welche die Peptide Asp⁴⁹-Glu⁵⁷ und Cys¹⁰⁹-Arg¹¹³ verknüpft, den Ring des Cystinknotens durchsteckt. Das Peptid mit der monoisotopischen Masse 2087.052Da ($m/z = 1044.028\text{Da}$, $z = 2$) entspricht zwei Peptiden Phe⁶³-Arg⁷⁰ und Val¹¹⁹-Arg¹³⁰ verbrückt durch die Disulfidbrücke Cys⁶⁹-Cys¹²³.

3.2.3 Analyse der Domänenstruktur von Sclerostin

Wurde wildtypisches murines Sclerostin (aus *Sf9*-Zellkultur) über einen längeren Zeitraum bei 4°C gelagert, so konnte mittels SDS-PAGE-Analyse der proteolytische Abbau des Proteins zu einem stabilen Fragment mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 10000-12000Da beobachtet werden (Abb. 17 A). Wie im vorigen Kapitel (3.2.2) beschrieben, ist der Bereich zwischen dem ersten Cystein und dem letzten Cystein (Cys⁵⁴-Cys¹⁴²) von Sclerostin durch Disulfidbrücken vernetzt. Eine Sekundärstrukturvorhersage identifiziert für diesen Bereich mehrere Sekundärstrukturelemente. Für die N- und C-terminalen Bereiche vor und nach dem ersten bzw. letzten Cystein (Aminosäurereste Gln¹-Ser⁵³ und Lys¹⁴⁵-Tyr²¹³), die reich an Prolinen sind und einen niedrigen Anteil an hydrophoben Aminosäuren beinhalten, ergab die Sekundärstrukturvorhersage, dass die Bereiche keine Sekundärstrukturelemente beinhalten. Die N- und C-terminalen Bereiche von Sclerostin liegen daher wahrscheinlich flexibel vor, wodurch sie leichter für Proteasen und deren Abbau zugänglich sind. Die massenspektrometrische Analyse des so entstandenen Sclerostin-Fragments ergab, dass das Fragment höchstwahrscheinlich dem Bereich von Glu⁵²-Cys¹⁴² entspricht, was dem Cysteinreichen Teil des Proteins gleichkommt.

Durch eine limitierte Proteolyse mit der Protease GluC sollte das Fragment gezielt hergestellt werden. Abbildung 17 B zeigt den zeitlichen Verlauf der Proteolyse von murinem Sclerostin aus *Sf9*-Zellkultur und *E.coli*-Expression (siehe 2.9.2) mit GluC nach ein, zwei und drei Stunden. Hierfür wurden 100µg Protein (0.3mg/ml) im Verhältnis 100:1 mit GluC versetzt. Es entsteht, analog zur Lagerung bei 4°C, unter anderem ein Fragment mit einem apparenten

Molekulargewicht von etwa 18000Da. Außerdem entstehen noch ein oder mehrere Spaltprodukte mit höheren apparenten Molekulargewichten (ca. 25000Da), die aber mit der Zeit zu dem Fragment mit dem apparenten Molekulargewicht von etwa 18000Da abgebaut werden. Ein möglicher Grund warum die Proteolyse der beiden Proteine aus *Sf9*-Zellkultur und *E.coli*-Expression nicht zu identischen Spaltprodukten führt ist, dass Sclerostin aus *E.coli*-Expression nicht glykosyliert ist.

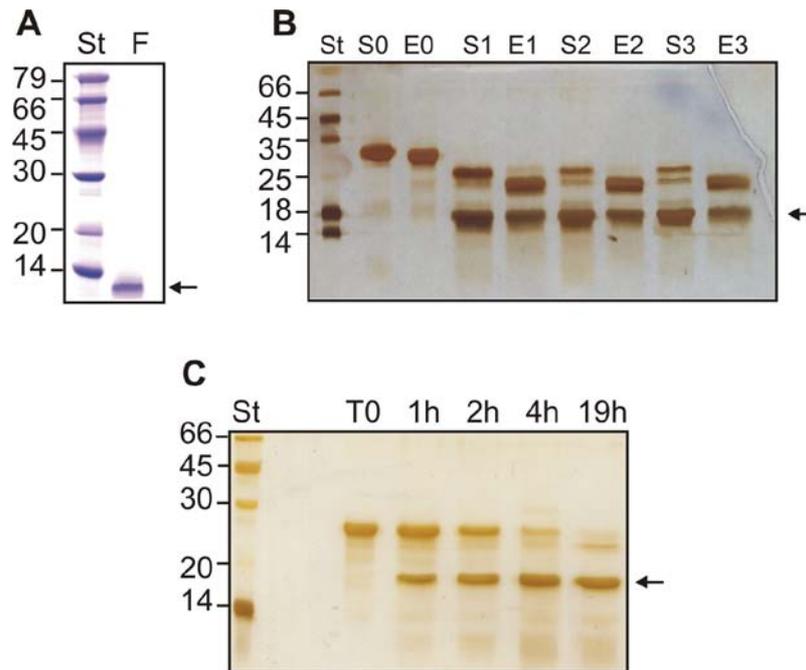


Abbildung 17: A) SDS-PAGE-Analyse des während der Lagerung bei 4°C durch Proteolyse entstandenen Sclerostin-Fragments. B) Zeitlich limitierte Proteolyse von murinem Sclerostin aus *Sf9*-Zellkultur (S) und aus *E.coli*-Expression (E) mit GluC. Die SDS-PAGE-Analyse zeigt Proben zu Beginn des Experiments (S/E0) und nach 1, 2, und 3 Stunden. C) Zeitlich limitierte Proteolyse von murinem Sclerostin- Δ C (aus *Sf9*-Zellkultur) mit GluC. Die SDS-PAGE-Analyse zeigt Proben zu Beginn des Experiments (T0) und nach 1, 2, 4 und 19 Stunden. Die Pfeile markieren das Protease-stabile Fragment, was dem Cystein-reichen strukturierten Bereich von Sclerostin entspricht.

Die Hinweise auf unterschiedlich strukturierte Bereiche führten zu der Idee, Sclerostin N- und C-Terminal zu verkürzen. Dabei entstanden die in Kapitel 3.3 beschriebenen Varianten murines Sclerostin- Δ C und murines Sclerostin- Δ NC. Die Proteolyse der C-terminal verkürzten Variante von Sclerostin (murines Sclerostin- Δ C, Gln¹-Arg¹⁴⁴) mit GluC führte ebenfalls nach einiger Zeit zu dem stabilen Fragment mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 18000Da (Abb. 17 C). Die massenspektrometrische Analyse dieses 18000Da-Fragments ergab, dass es sich um den N-terminal verkürzten Teil aus Aminosäure Asn³⁶-Arg¹⁴⁴ von Sclerostin handelt (siehe Kapitel 3.3, Abb. 19 E). Es werden also die ersten 35 Aminosäuren des N-Terminus abgespalten.

Eine andere Methode detaillierte Informationen bezüglich Faltung und Flexibilität eines Proteins zu erhalten, ist die NMR-Spektroskopie. Der Vergleich der $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -2D-HSQC-Spektren wildtypischem Sclerostins mit dem der N- und C-terminal verkürzten Variante des murinen Sclerostins- ΔNC zeigt eindeutig, dass der Cystein-reiche Bereich von Sclerostin strukturiert vorliegt, während die Aminosäuren des N- und C-terminalen Bereichs ungefaltet und flexibel sind (siehe 3.6.1). Anhand dieser Ergebnisse lässt sich Sclerostin in drei Regionen gliedern: Die N- und C-terminalen Bereiche (Gln¹-Glu³⁵ und Lys¹⁴⁵-Tyr²¹³) sind flexibel und ungefaltet und die Cystein-reiche Domäne von Sclerostin (Asn³⁶-Cys¹⁴⁴) liegt strukturiert vor.

3.3 Gewinnung verkürzter Sclerostinvarianten

Um die Region von Sclerostin einzugrenzen, welche die Inhibition des Wnt-Signalwegs vermittelt, sollte Sclerostin N- und C-terminal verkürzt werden. Zunächst wurde die kodierende Sequenz für das C-terminal verkürzte Konstrukt des murinen Sclerostins- ΔC zwischen die Restriktionsschnittstellen BamHI und XhoI des Expressionsvektors pMK1 kloniert. Das Konstrukt kodiert für die Aminosäuren Gln¹ bis Arg¹⁴⁴ und endet zwei Aminosäuren hinter dem letzten Cystein der Sequenz (Abb. 20). Es weist, wie das wildtypische Konstrukt, eine N-terminale Hexahistidinsequenz gefolgt von einer Thrombinschnittstelle auf. Die Sequenz befindet sich im Anhang. Das Plasmid mSOST ΔC _pMK1 wurde mit BacVectorTM-3000-Triple Cut Virus DNA (Novagen) (vgl. 2.4.4, Abb. 18 A) in *Sf9*-Zellen kotransfiziert. Die Expression und Sekretion von murinem Sclerostin- ΔC wurde nach der zweiten Virusamplifikation mittels Western-Blot bestätigt (Abb. 18 B). Murines Sclerostin- ΔC wurde analog zu dem wildtypischen murinen Sclerostin exprimiert und aufgereinigt (siehe Kapitel 2.6) (Abb. 18 C, D, E). Die Ausbeute an murinem Sclerostin- ΔC betrug 1.6mg/ml und war somit doppelt so hoch im Vergleich zu wildtypischem Protein (Tabelle 16).

Außerdem sollte eine Sclerostinvariante generiert werden, bei der sowohl der N- als auch der C-Terminus deletiert sind (Aminosäuren Val⁵⁰-Arg¹⁴⁴). Diese Variante wurde analog zu murinem Sclerostin- ΔC kloniert und mit BacVectorTM-3000-Triple Cut Virus DNA (Novagen) in *Sf9*-Insektenzellen kotransfiziert. Der Western-Blot nach der zweiten Virusamplifikation zeigte allerdings, dass diese Proteinvariante nicht sekretiert wurde. Möglicherweise ist der Verlust beider Glykosylierungsstellen nachteilig für die sekretorische Expression in Insektenzellen. Ähnliche Beobachtungen wurden auch für den Interleukin-4 Rezeptor (IL-4R) gemacht (mündliche Mitteilung von Prof. Dr. Thomas Müller).

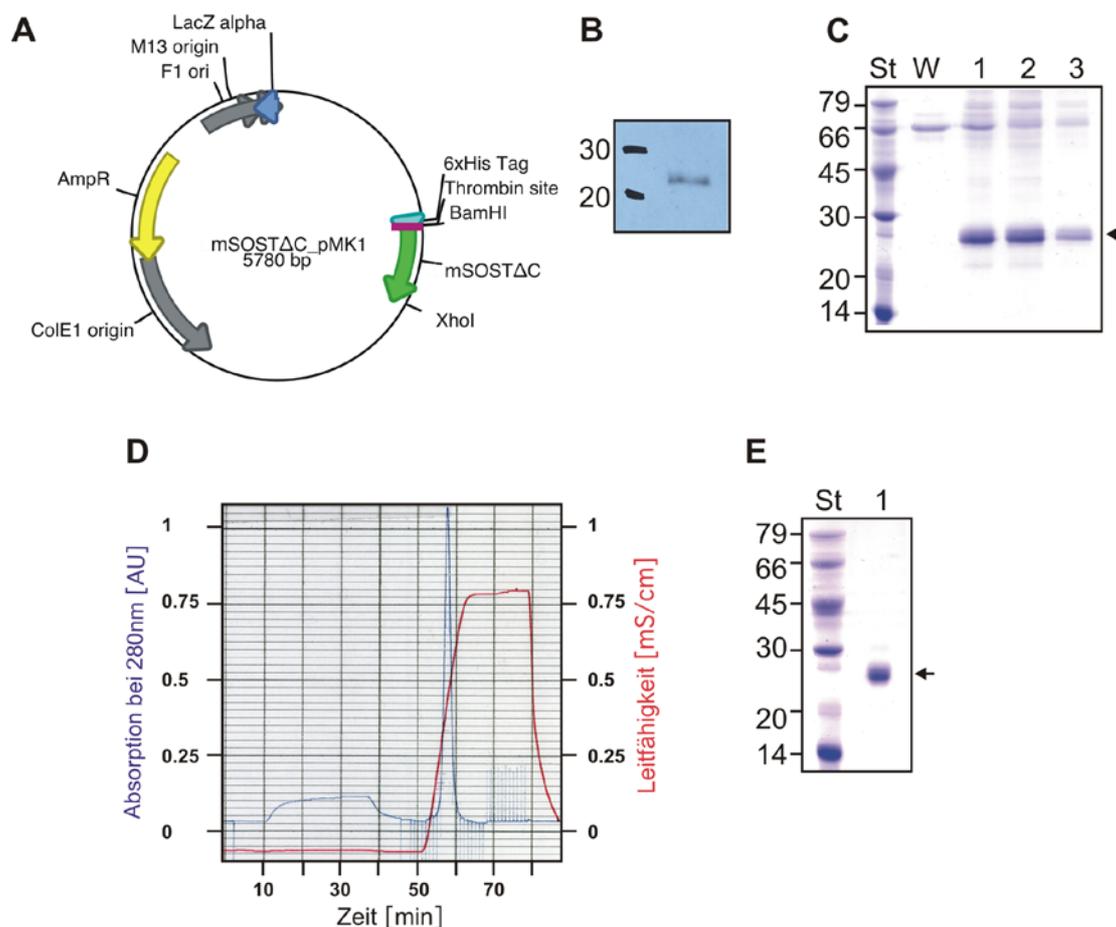


Abbildung 18: A) Vektorkarte von mSOST_ΔC_pMK1. B) Western-Blot der zweiten Virusamplifikation von murinem Sclerostin-ΔC. Als primärer Antikörper wurde ein Anti-His-Tag Antikörper verwendet. C) SDS-PAGE-Analyse der Metallchelate-Affinitätschromatographie. W: Waschfraktion, 1-3: murines Sclerostin-ΔC enthaltende Fraktionen. D) Chromatogrammprofil der Kationenaustauschchromatographie von murinem Sclerostin-ΔC. E) SDS-PAGE-Analyse der vereinigten Fraktionen der Kationenaustauschchromatographie unter reduzierenden Bedingungen. Die Pfeile kennzeichnen die Proteinbande des murinen Sclerostins-ΔC.

Reinigungsschritt:	murines Sclerostin (pMK1)	humanes Sclerostin (pMK1)	murines Sclerostin-ΔC (pMK1)
Ni-Säule *	1.8mg/l	0.84mg/l	5mg/l
Ionenaustauscher	0.8mg/l	0.4mg/l	1.6mg/l

Tabelle 16: Gewinnung von rekombinantem murinem Sclerostin, humanem Sclerostin und murinem Sclerostin- Δ C aus *Sf9*-Zellkulturüberstand. Die mg-Angaben beziehen sich auf einen Liter Zellkulturüberstand. (* Gesamtproteinmenge, enthält Verunreinigungen.)

Ergebnisse

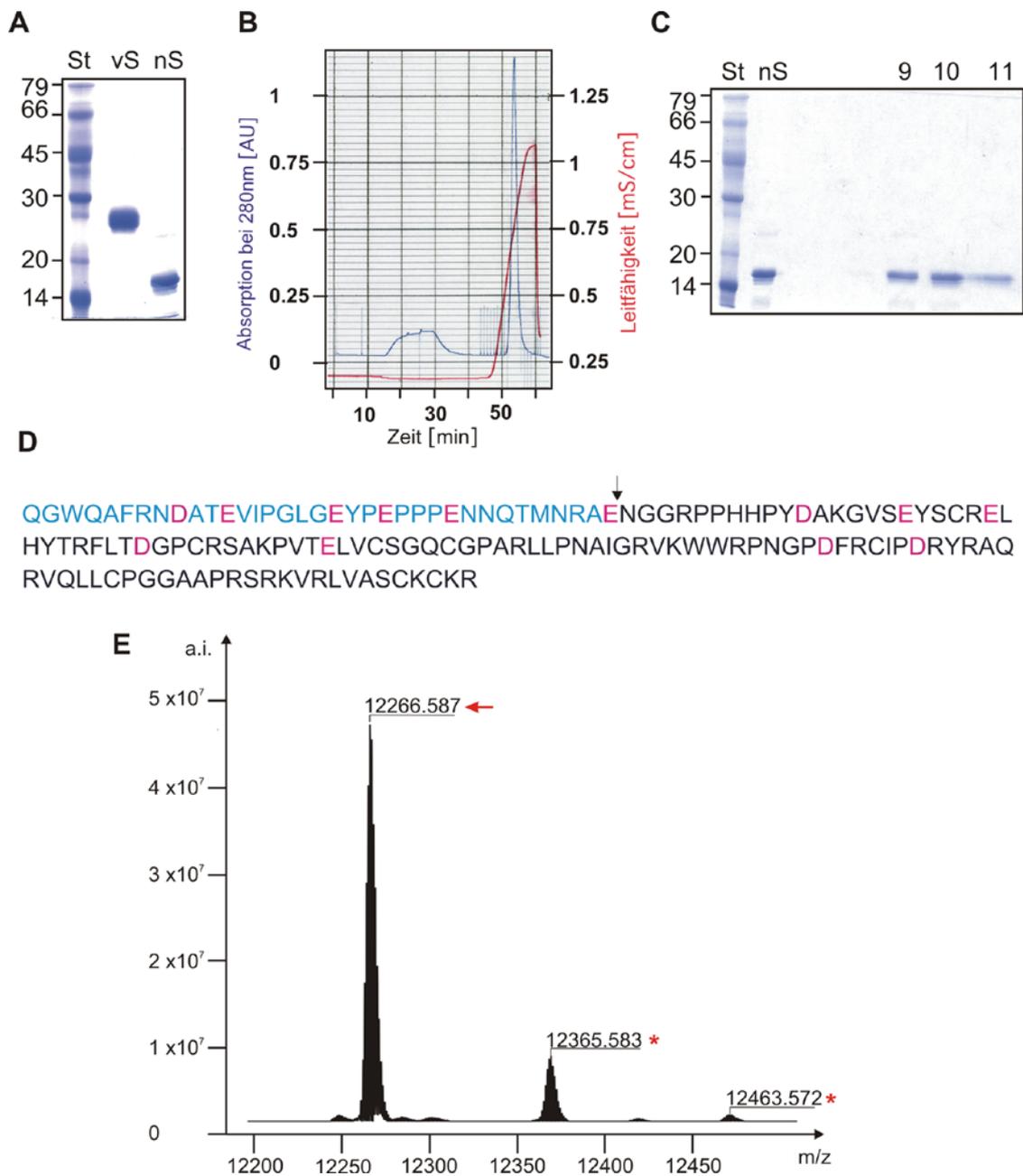


Abbildung 19: A) SDS-PAGE-Analyse der präparativen Proteolyse von murinem Sclerostin- Δ C mit GluC. vS: vor Proteolyse, nS: nach Proteolyse (beides unter reduzierenden Bedingungen). B) Chromatogrammprofil der Kationenaustauschchromatographie von murinem Sclerostin- Δ NC. C) SDS-PAGE-Analyse der Kationenaustauschchromatographie von murinem Sclerostin- Δ NC unter reduzierenden Bedingungen nS: nach Proteolyse, 9-11: Protein enthaltende Fraktionen. D) Aminosäuresequenz von murinem Sclerostin- Δ C. Die Aminosäuren, nach denen GluC die Peptidbindung hydrolysiert (Asp (D) und Glu (E)) sind rot hervorgehoben. Die blaue Sequenz wurde durch die Protease GluC entfernt. Der schwarze Pfeil markiert die Spaltstelle. E) Massenspektrum der durch Proteolyse mit GluC hergestellten Trunktionsvariante des murinen Sclerostin- Δ NC nach Dekonvolution als einfach positiv geladenes Ion. Das Molekulargewicht von 12266.587Da (roter Pfeil) entspricht dem Sequenzbereich Asn³⁶-Arg¹⁴⁴. (*) Die beiden Molekulargewichte 12365.583Da und 12463.572Da entsprechen ebenfalls dem Sequenzbereich von Asn³⁶-Arg¹⁴⁴, wobei wahrscheinlich ein bzw. zwei Phosphationen (98Da) nichtkovalent angelagert sind.

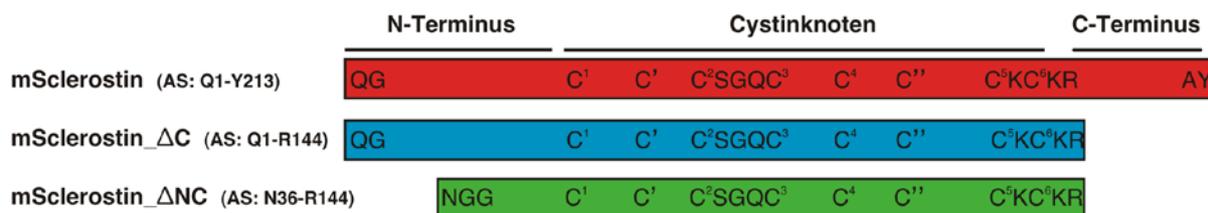


Abbildung 20: Schematische Darstellung der verschiedenen Sclerostinvarianten: murines Sclerostin, murines Sclerostin-ΔC und murines Sclerostin-ΔNC.

Da die Expression einer N- und C-terminal verkürzten Sclerostinvariante in *Sf9*-Zellen nicht erfolgreich war, musste die Variante proteinchemisch oder in einem anderen heterologen Expressionssystem hergestellt werden. Dabei wurde die in Kapitel 3.2.3 beschriebene analytische Proteolyse von murinem Sclerostin-ΔC mit GluC zugrunde gelegt. Murines Sclerostin-ΔC aus *Sf9*-Zellkultur wurde in Natriumphosphatpuffer gelöst, mit GluC im Verhältnis von 1:100 versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz wurde über eine Kationenaustauschchromatographie (siehe 2.6.2) aufgereinigt (siehe Abbildung 19). Für die Analyse des Spaltprodukts wurde das Protein mittels „reversed phase“-HPLC entsalzt und gefriergetrocknet. Die Probe wurde in 50% Methanol, 1% Essigsäure gelöst und mit Hilfe eines ESI-FT ICR Massenspektrometers untersucht. Die Analyse ergab ein Molekulargewicht von 12266.587Da für das Proteolyseprodukt, was einem N- und C-terminal verkürzten Sclerostin mit der Sequenz Asn³⁶ bis Arg¹⁴⁴ entspricht (theoretisches Molekulargewicht dieses Abschnitts beträgt 12266.202Da). Aus 700μg murinem Sclerostin-ΔC konnten so 300μg murines Sclerostin-ΔNC (Asn³⁶ bis Arg¹⁴⁴, siehe Abb. 20) gewonnen werden.

3.4 Charakterisierung der biologischen Wirkung von Sclerostin und Varianten

Für einige Mitglieder der DAN-Familie (DAN, Cerberus, Gremlin) wurde gezeigt, dass sie als direkte Antagonisten des BMP-Signalwegs fungieren (Hsu, *et al.*, 1998). Auch für Sclerostin wurde beobachtet, dass es die BMP-stimulierte ektope Knochenbildung hemmen kann (van Bezooijen, *et al.*, 2007). Im Gegensatz zu Gremlin, DAN und Cerberus fungiert Sclerostin allerdings nicht als direkter BMP-Antagonist, sondern inhibiert den kanonischen Wnt-Signalweg durch Bindung an LRP5/6 (Li, *et al.*, 2005, van Bezooijen, *et al.*, 2007). Der BMP-Signalweg und der kanonische Wnt- β -Catenin-Signalweg wirken nachgeschaltet im Differenzierungsprozess von Prä-Osteoblasten zu reifen, knochenbildenden Osteoblasten, wodurch die Wirkung von Sclerostin auf den BMP-Signalweg erklärt werden kann (Rawadi, *et al.*, 2003). Um die in *Sf9*-Zellen hergestellten Sclerostinvarianten auf ihre biologische Aktivität zu testen, wurden mehrere zellbasierende Nachweisverfahren durchgeführt. Der Einfluss von Sclerostin auf den BMP- und den kanonischen Wnt- β -Catenin-Signalweg wurde mit Hilfe eines Signalweg-spezifischen Reportergen-Nachweisverfahrens getestet, wobei die Genexpression der „Firefly“-Luciferase unter die Kontrolle eines Signalweg-spezifischen Promotors gestellt wird. Außerdem wurde Sclerostin noch in einem Nachweisverfahren getestet, in dem die Induktion der alkalischen Phosphatase (ALP) Expression bestimmt wird. Die alkalische Phosphatase gehört zu den Markerproteinen für differenzierende Osteoblasten. Durch Zugabe von BMPs wird die Differenzierung von Prä-Osteoblasten zu Osteoblasten induziert. Wie von Rawadi *et al.* gezeigt, wird durch das Aktivieren des BMP-Signalwegs zunächst die Expression von Wnt-Proteinen induziert. Dadurch kommt es zu einer Aktivierung des kanonischen Wnt- β -Catenin-Signalwegs, was letztlich zur Bildung von alkalischer Phosphatase führt (Rawadi, *et al.*, 2003) (siehe Abb. 8). Die Menge der exprimierten alkalischen Phosphatase kann bestimmt werden, indem die ALP-abhängige Dephosphorylierung von para-Nitrophenylphosphat (PNPP) photometrisch detektiert wird.

3.4.1 Einfluss von Sclerostin auf den kanonischen Wnt- β -Catenin-Signalweg

Um die biologische Aktivität der Sclerostinvarianten aus *Sf9*-Zellkultur (oder von Dickkopf-1, hDkk-1) zu überprüfen, wurden die rekombinanten Proteine in einem Wnt-Reportergen-Nachweisverfahren getestet (siehe 2.11.6). Hierfür wurden HEK293T Zellen mit dem Super8xTopFlash Reporterkonstrukt (von Randall Moon zur Verfügung gestellt, (Veeman, *et*

al., 2003)) transfiziert. Nach 24 Stunden wurde das zu testende Protein in einer Konzentrationsreihe (1 bis 500nM) zu den transfizierten Zellen gegeben. Durch die Zugabe von murinem-Wnt3a-haltigem Medium 10% (v/v) (oder Kontroll-Medium als Negativkontrolle) wurde der kanonische Wnt-Signalweg induziert. Dadurch kommt es zur Transkription und Translation des TCF/LEF-kontrollierten Reportergens, der „Firefly“-Luciferase.

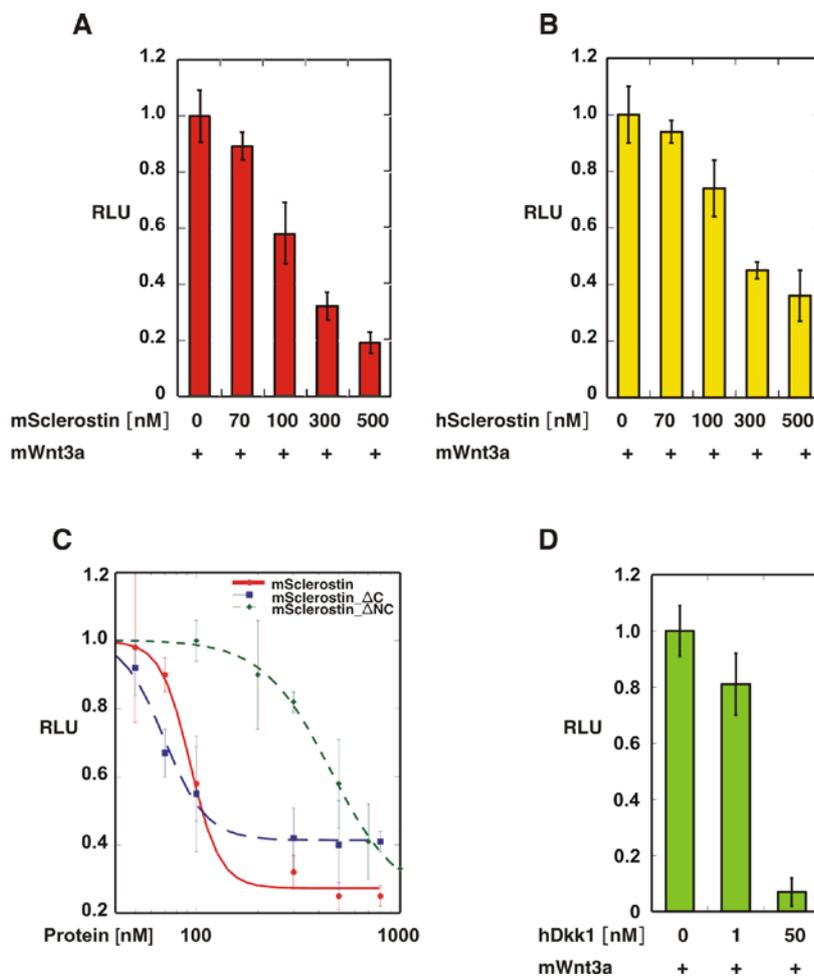


Abbildung 21: A) Balkendiagramm des Wnt-Reportergen-Nachweisverfahrens mit murinem Sclerostin aus Sf9-Zellkultur. B) Balkendiagramm des Wnt-Reportergen-Nachweisverfahrens mit humanem Sclerostin aus Sf9-Zellkultur. C) Halblogarithmische Darstellung des Wnt-Reportergen-Nachweisverfahrens mit murinem Sclerostin (rot), murinem Sclerostin-ΔC (blau), murinem Sclerostin-ΔNC (grün) mit Analyse der Konzentration, die für eine halbmaximale Inhibition notwendig ist (IC₅₀). RLU steht für relative Lumineszenz. D) Balkendiagramm des Wnt-Reportergen-Nachweisverfahrens mit humanem Dickkopf-1 (hDkk1) von der Firma Peprotech.

Die Ergebnisse belegen, dass murines und humanes Sclerostin die Expression der „Firefly“-Luciferase dosisabhängig hemmen können (siehe Abb. 21 A, B). Auch die C- sowie die N- und C-terminal verkürzten Sclerostinvarianten zeigen eine dem wildtypischen Sclerostin ähnliche biologische Aktivität im Wnt-Reportergen-Nachweisverfahren. Dabei zeigt murines

Sclerostin- Δ C eine mit dem Wildtyp vergleichbare Aktivität, während murines Sclerostin- Δ NC eine um den Faktor fünf geringere biologische Aktivität aufweist (Abb. 21 C). Die aus den Daten ermittelten Konzentrationen für eine halbmaximale Inhibition (IC_{50} -Werte) betragen in etwa 100nM für murines Sclerostin, 80nM für murines Sclerostin- Δ C und 450nM für murines Sclerostin- Δ NC. Die Daten zeigen, dass die flexiblen Termini von Sclerostin keine essentielle Funktion für die Inhibition der Wnt-Aktivität haben.

Humanes Dickkopf-1 inhibiert die Wnt-responsive Expression der „Firefly“-Luciferase ebenfalls dosisabhängig, zeigt aber verglichen mit Sclerostin schon bei wesentlich niedrigeren Konzentrationen einen deutlichen Effekt (siehe Abb. 21 D).

3.4.2 Einfluss von Sclerostin auf den BMP-Smad1/5/8- Signalweg

Mit Hilfe eines BMP-Smad1/5/8-Reporter-gen-Nachweisverfahrens und eines ALP-Nachweisverfahrens sollte der Einfluss von Sclerostin auf den BMP-Smad1/5/8-Signalweg analysiert werden. In Abbildung 22 A, B sind die BMP-Smad1/5/8-Reporter-gen-Nachweisverfahren für Sclerostin im Vergleich mit einem direkten BMP-Antagonisten, der von Willebrand Faktor Typ C Domäne 1 (VWC1) von Crossveinless-2 (CV2), dargestellt (Zhang, *et al.*, 2008). Für das Reporter-gen-Nachweisverfahren wurde die Zelllinie C3H10T1/2-BRE-Luc verwendet, die mit dem BMP-responsiven Reporterkonstrukt p(BRE)₂-Luc stabil transfiziert ist (zur Verfügung gestellt von Peter ten Dijke). Die Zellen wurden mit 200ng/ml BMP2 stimuliert und mit steigenden Konzentrationen der zu testenden Modulatorproteine bzw. Proteindomänen versetzt. Nach 24 Stunden Inkubation wurden die Zellen lysiert und die exprimierte Luciferasemenge bestimmt (siehe Kapitel 2.11.7). Es wird deutlich, dass Sclerostin im Gegensatz zum direkten BMP-Antagonisten CV2-VWC1 auch bei höheren Konzentrationen die Bildung der Luciferase nicht signifikant zu hemmen vermag, während die VWC1-Domäne eine direkte Inhibition des BMP-Signalwegs erreicht. Dies belegt, dass Sclerostin, wie auch in der Literatur beschrieben, keine direkte Hemmung auf den BMP-Signalweg ausübt (van Bezooijen, *et al.*, 2007). In Abbildung 22 C und D sind hierzu im Vergleich die Wnt-Reporter-gen-Nachweisverfahren für die VWC1-Domäne von Crossveinless-2 und für Sclerostin dargestellt. Hier wird deutlich, dass nur Sclerostin den Wnt-Signalweg inhibiert, wohin gegen die VWC1-Domäne des BMP-Antagonisten Crossveinless-2 keinen Einfluss auf diesen Signalweg ausübt.

In Abbildung 22 E ist das Balkendiagramm des ALP-Nachweisverfahrens für murines Sclerostin (aus Sf9-Zellkultur) dargestellt. Die Induktion der alkalischen Phosphatase wurde

in MC3T3E1-Zellen (Osteoblastenvorläuferzelllinie) gemessen. Die Zellen wurden in osteogenem Medium (mit 300ng/ml BMP-2) mit steigenden Konzentrationen von murinem Sclerostin versetzt und für vier Tage inkubiert (siehe Kapitel 2.11.8). Hier zeigt sich, dass Sclerostin die BMP2-induzierte Bildung der alkalischen Phosphatase bei hohen Konzentrationen hemmen kann. Sclerostin inhibiert hier vermutlich nicht direkt den BMP-Signalweg, vielmehr inhibiert es den BMP2-induzierten Wnt- β -Catenin-Signalweg (van Bezooijen, *et al.*, 2007).

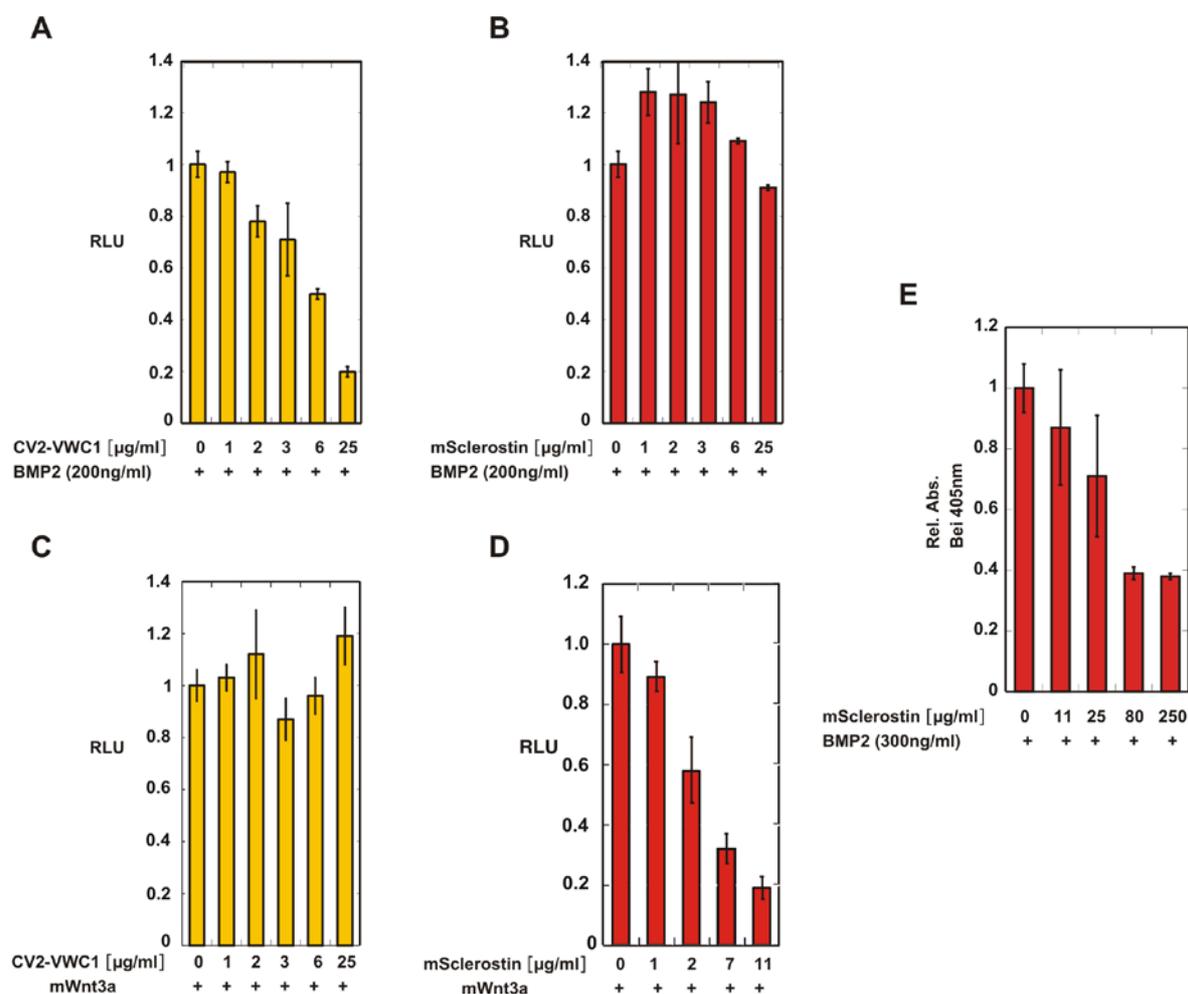


Abbildung 22: Balkendiagramm des BMP-Reportergen-Nachweisverfahrens in C3H10T1/2-BRE-luc Zellen. (RLU= relative Lumineszenz). Die Zellen wurden mit 200ng/ml BMP2 stimuliert. Die Domäne VWC1 des direkten BMP-Antagonisten Crossveinless-2 inhibiert die BMP-responsive Expression der „Firefly“-Luciferase dosisabhängig (A). Murines Sclerostin zeigt keinen inhibitorischen Einfluss auf den BMP-Signalweg (B). Balkendiagramm des Wnt-Reportergen-Nachweisverfahrens in HEK293T-Zellen. CV2-VWC1 beeinflusst die Expression der Wnt-responsiven „Firefly“-Luciferase nicht (C). Murines Sclerostin inhibiert die Expression der Wnt-responsiven „Firefly“-Luciferase dosisabhängig (D). (Molekulargewicht von Sclerostin: 23612.5Da, von CV2-VWC1: 7071.1Da) E) Balkendiagramm des ALP-Nachweisverfahrens mit murinem Sclerostin in MC3T3E1-Zellen. Die Zellen wurden mit 300ng/ml BMP2 stimuliert. Außerdem wurden steigende Mengen an murinem Sclerostin zugegeben. Sclerostin inhibiert die ALP-Expression dosisabhängig.

3.4.3 Analyse der direkten Protein-Protein-Interaktion zwischen Sclerostin und LRP6 bzw. Sclerostin und BMP7

Durch Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (SPR, „surface plasmon resonance“) lassen sich Protein-Protein-Interaktionen in Echtzeit detektieren und so Bindungskinetiken analysieren.

Unter den Bedingungen der Totalreflektion entsteht am Übergang zweier benachbarter Medien, mit unterschiedlichen optischen Dichten, ein senkrecht dazu verlaufendes exponentiell abklingendes Feld (evaneszente Welle). Wird zwischen die beiden Medien eine dünne Goldschicht eingebracht, so regt die evaneszente Welle Elektronenwolken (sog. Plasmonen) in diesem Goldfilm an. Das Phänomen das hierbei beobachtet wird, wird als Oberflächenplasmonresonanz bezeichnet.

Das Messprinzip der Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie beruht auf der Detektion der zeitlichen Verschiebung des Resonanzwinkels (Winkel der Totalreflektion). Durch Anlagerung von Ligandenmolekülen an die auf einem Sensorchip immobilisierten Rezeptormoleküle kommt es zur Veränderung im Brechungsindex des optisch dünneren Mediums. Dieses resultiert in einer Verschiebung des Winkels der Totalreflexion.

Der für das BIAcore System verwendete Sensorchip besteht aus einer dünnen Goldschicht und einer Trägermatrix und ist in vier Flusszellen unterteilt, auf die unterschiedliche Rezeptormoleküle an der Trägermatrix immobilisiert werden können. Oberhalb des Sensorchips ist die optische Einheit angebracht, die aus einem Glasprisma besteht. Durch das Einstrahlen von polarisiertem Laserlicht kommt es an der Oberfläche zwischen Prisma und Analytlösung zu Totalreflexion und zur Entstehung der evaneszenten Welle, welche die Elektronen der dazwischen liegenden Goldschicht anregt. Werden nun die gebundenen Rezeptormoleküle mit Ligandenmolekülen perfundiert und kommt es zur Bindung zwischen diesen, so ändert sich der Brechungsindex, woraus eine Verschiebung des Resonanzwinkels resultiert. Dieser ist proportional zur Massenzunahme auf der Chipoberfläche. Die Änderung des Brechungsindex und damit die Massenänderung auf der Chipoberfläche im Zeitverlauf, wird in einem so genannten Sensogramm dargestellt. Als Einheit für die Änderung des Resonanzwinkels werden RU („resonance units“) verwendet.

Die Immobilisierung des Rezeptors kann durch unterschiedliche chemische Verfahren erfolgen. Es gibt einerseits die direkte Immobilisierung, wobei Carboxylgruppen der Oberflächenmatrix zunächst mit EDC (1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimid) und NHS (N-Hydroxysuccinimid) aktiviert werden und anschließend der Rezeptor über

Amingruppen an die aktivierten Carboxylgruppen gebunden wird. Anschließend werden nicht benutzte aktivierte Stellen mit Ethanolamin abreagiert. Bei dieser Methode kann der Rezeptor allerdings auch über mehrere Amingruppen an die Chipoberfläche gekoppelt werden, was oft zur Inaktivierung des Rezeptors führt. Um dies zu verhindern, wird zunächst Streptavidin direkt auf der Chipoberfläche immobilisiert. Anschließend wird der zuvor biotinylierte Rezeptor über die Biotin-Streptavidin-Interaktion gezielt auf die Oberfläche aufgebracht. Durch milde Reaktionsbedingungen, bei denen die Rezeptormoleküle nur ein bis maximal zweimal biotinyliert werden, kann eine mehrfache Kopplung eines Rezeptormoleküls an die Matrix weitestgehend verhindert werden (siehe 2.5.5).

Ein Messzyklus besteht aus drei typischen Phasen: Bei Perfusion mit Analytlösung kommt es zur Bindung von Ligand an den immobilisierten Rezeptor (Assoziationsphase). Diese Bindung führt nach einiger Zeit zum Erreichen des Gleichgewichtszustandes (Equilibrium-Bindung) in der sich Assoziation und Dissoziation im Gleichgewicht befinden. Nach Beendigung der Perfusion mit Ligand wird nur mit Puffer gespült und der Komplex dissoziiert (Dissoziationsphase). Die Kinetikparameter der Bindung können durch das Langmuir'sche-Gesetz beschrieben werden, da ein Reaktionspartner immobilisiert ist und somit dessen Konzentration konstant bleibt (siehe 2.12).

Da das Messprinzip der SPR auf einer Änderung des Brechungsindexes beruht, können schon geringste Konzentrationsänderungen der Pufferkomponenten zu einer Änderung des Resonanzwinkels führen und somit die durch Bindung des Analyten hervorgerufene Änderung des Brechungsindexes verändern. Außerdem können Proteine unspezifisch mit der Trägermatrix interagieren, was ebenfalls zu einer Veränderung des Resonanzwinkels führt. Um dies zu umgehen, wird auf einer der vier Flusszellen kein Rezeptor immobilisiert (Leerkanal). Das, auf dieser Flusszelle, detektierte Sensogramm wird zur Normierung von den Sensogrammen der anderen Flusszellen subtrahiert.

Mittels dieser Methode wurde die Bindung von Sclerostin an seine putativen Interaktionspartner LRP6 und BMP7 analysiert (siehe Kapitel 2.12). Durch die hohe positive Oberflächenladung tendiert Sclerostin zu unspezifischer Bindung. Daher wurden zunächst Messbedingungen ermittelt, unter denen nur „spezifische“ Interaktionen zwischen den Proteinen möglich sind. Um solche Bedingungen zu ermitteln, wurde die extrazelluläre Domäne des IL-4R α (Interleukin 4 Rezeptor Alpha) als Negativkontrolle spezifische Interaktionen verwendet. IL-4R α weist eine hohe negative Oberflächenladung auf (pI 5.7) und sollte deshalb bei geringer Ionenstärke unspezifisch an Sclerostin binden. Als Kontrolle für

Ergebnisse

eine spezifische Interaktion wurde hingegen ein Antikörper-Fab-Fragment (AbD09095 von AbD-Serotec, siehe 3.7) gewählt, welches gegen murines Sclerostin aus *Sf9*-Zellkultur selektiert worden war. Beide zuvor biotinylierten Proteine (IL-4R α und AbD09095) wurden auf die ersten beiden, mit Streptavidin beladenen, Flusszellen eines CM5-Sensorchips immobilisiert. Die Messbedingungen wurden nun so gewählt, dass Sclerostin unter diesen Bedingungen keine Bindung an den IL-4R α zeigt, aber eine Bindung an das Antikörper -Fab-Fragment dennoch detektiert werden kann. Diese Analyse ergab, dass die Erhöhung der Salzkonzentration des Messpuffers auf 300mM Natriumchlorid die unspezifische ionische Interaktion von Sclerostin an IL-4R α verhindert. Nun wurden die zu analysierenden biotinylierten Proteine LRP6 (extrazelluläre Domäne, von R&D) und BMP7 über die Biotin-Streptavidin Bindung an die zwei noch freien, mit Streptavidin beladenen, Flusszellen des Sensorchips gekoppelt. Die an den Chip gebundenen Proteine (IL-4R α , AbD09095, LRP6, BMP7) wurden mit steigenden Konzentrationen (25nM, 50nM, 475nM, 2 μ M, 5 μ M 10 μ M) von murinem Sclerostin, murinem Sclerostin- Δ C und murinem Sclerostin- Δ NC in HBS300 perfundiert. In Abbildung 23 sind die erhaltenen Sensogramme der Messungen, nach Subtraktion des IL-4R α -Sensogramms, für eine Analytkonzentration von 2 μ M dargestellt.

	LRP6			
	k_a [10 ⁵ M ⁻¹ s ⁻¹]	k_d [10 ⁻² s ⁻¹]	$K_{D(kin)}$ [μ M]	$K_{D(eq)}$ [μ M]
murines Sclerostin	1	6 \pm 2	0.1	2
humanes Sclerostin	2 \pm 3	4 \pm 3	0.2	9
murines Sclerostin- Δ C	3 \pm 4	10 \pm 2	0.4	7
murines Sclerostin- Δ NC	4 \pm 5	10 \pm 3	0.3	-
	BMP7			
	k_a [10 ⁵ M ⁻¹ s ⁻¹]	k_d [10 ⁻² s ⁻¹]	$K_{D(kin)}$ [μ M]	$K_{D(eq)}$ [μ M]
murines Sclerostin	3 \pm 3	3 \pm 4	0.1	1
humanes Sclerostin	0.5 \pm 0.2	1.6 \pm 0.2	0.3	4
murines Sclerostin- Δ C	3 \pm 4	7 \pm 4	0.2	20
murines Sclerostin- Δ NC	0.8 \pm 0.8	14 \pm 8	2	18

Tabelle 17: Kinetikparameter (k_a , k_d , $K_{D(kin)}$, $K_{D(eq)}$) der Bindung von Sclerostin und Trunktionsvarianten an LRP6, BMP7.

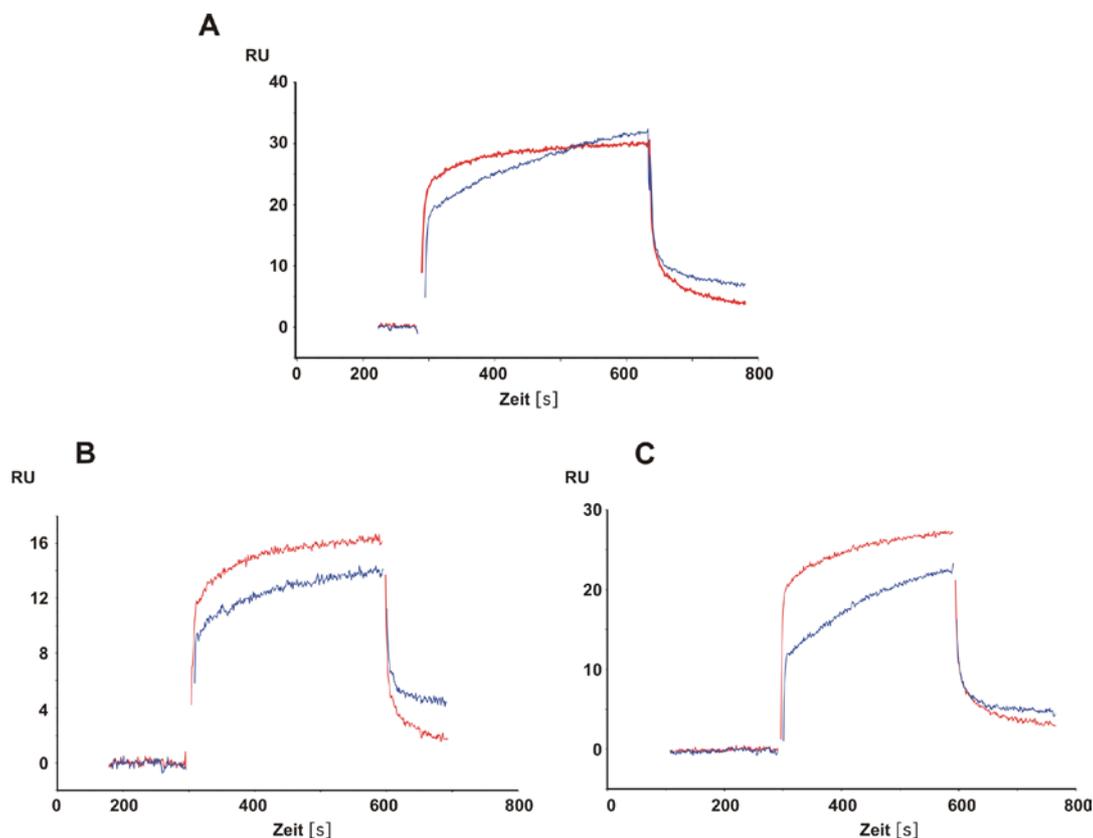


Abbildung 23: SPR-Analyse der Interaktion von Sclerostin mit seinen putativen Interaktionspartnern BMP und LRP. Beispielhaft sind die Sensogramme der Interaktionen von Sclerostin mit BMP-7 bzw. der extrazellulären Domäne von LRP6 für eine Analytkonzentration von $2\mu\text{M}$ dargestellt. A) Bindung von murinem Sclerostin (aus *E.coli*-Expression) an LRP6 (rot) und BMP7 (blau). B) Bindung von murinem Sclerostin- ΔC (aus *E.coli*-Expression) an LRP6 (rot) und BMP7 (blau). C) Bindung von murinem Sclerostin- ΔNC (aus *E.coli*-Expression) an LRP6 (rot) und BMP7 (blau).

Wildtypisches murines Sclerostin als auch die Varianten murines Sclerostin- ΔC und murines Sclerostin- ΔNC binden unter den gewählten Bedingungen sowohl an LRP6 als auch an BMP7 mit ähnlicher Charakteristik. Alle Varianten zeigen eine schnelle Assoziation sowie eine sehr schnelle Dissoziation. Der Verlauf der Bindungskurve weist auf eine biphasische Kinetik hin, was auf das Vorhandensein von Bindungsstellen mit unterschiedlicher Affinität hindeutet. Die Bindung von Sclerostin an diese unterschiedlichen Bindungsstellen erfolgt mit unterschiedlichen Kinetiken, deren Assoziationsphase und Dissoziationsphase im Sensogramm überlagern. Außerdem wird für die Bindung von Sclerostin an BMP7 und LRP6 kein Gleichgewicht (Plateau im Sensogramm) erreicht. Die Kinetikparameter der Interaktion mit schneller Assoziation und Dissoziation wurden, wie in Kapitel 2.12 beschrieben, berechnet und sind in Tabelle 17 aufgelistet. Aufgrund des biphasischen Verlaufs der Bindung können sie jedoch nur als Größenordnungen interpretiert werden, da für die Berechnung der Parameter das Langmuir'sche-Modell einer Eins-zu-Eins-Interaktion verwendet wurde. Die Abweichung zwischen $K_{D(\text{kin})}$ und $K_{D(\text{eq})}$ um den Faktor 20 und mehr

resultiert wahrscheinlich aus der Wahl des, für die Berechnung der $K_{D(eq)}$ benötigten, R_{eq} -Werts. Dieser entspricht der Anzahl der RUs im Gleichgewichtszustand der Bindung, also im Plateau des Sensogramms. Da die Bindung von Sclerostin an LRP6 und BMP7 kein Gleichgewicht erreicht, kann der R_{eq} -Wert nicht exakt identifiziert werden. Infolge der experimentellen Schwierigkeiten kann somit nur ausgesagt werden, dass Sclerostin als auch die Trunktionsvarianten LRP6 und BMP7 mit ähnlichen Affinitäten binden, die im niedrigen μM -Bereich liegen. Darüber hinaus ergab die SPR-Analyse der Bindung von Sclerostin an BMP-2 und BMP-6, dass Sclerostin keine differenzierte Spezifität für die getesteten BMPs aufweist und somit BMP-2, BMP-6 und BMP-7 mit ähnlichen Affinitäten bindet.

3.5 Aufreinigung von Sclerostin und Varianten aus *E.coli*

Für eine Strukturanalyse größerer Biomoleküle (bei Proteinen mit mehr als 100 Aminosäuren) durch NMR-Spektroskopie ist eine Markierung der zu analysierenden Proteine mit den Isotopen ^{15}N und ^{13}C unerlässlich, um die Protonensignale durch isotope-editierte dreidimensionale Spektren auflösen zu können. Hierfür werden die Proteine in Bakterien exprimiert, weshalb eine Expressions- und Isolierungsstrategie für Sclerostin aus *E.coli*-Bakterien erarbeitet werden musste. Die Isotopenmarkierung erfolgt dann durch die Kultivierung der Bakterien in Minimalmedium, welches als Kohlenstoffquelle ^{13}C -markierte Glucose und als Stickstoffquelle ^{15}N -markiertes Ammoniumchlorid enthält.

Die acht Cysteinreste von Sclerostin bilden, wie in Kapitel 3.2.2 gezeigt, vier Disulfidbrücken. Das Zytoplasma von wildtypischen *E.coli*-Bakterien ist jedoch ein reduzierendes Kompartiment, so dass die Thiolgruppen der Cysteine hier normalerweise reduziert vorliegen. Es gibt mehrere Strategien die Reduktion der Thiolgruppen zu umgehen und die Bildung von Disulfidbrücken in *E.coli*-Bakterien zu ermöglichen. Einerseits können *E.coli*-Stämme (z.B. *OrigamiTM*) verwendet werden, in denen die Gene *trxB* und *gor*, die für die Thioredoxinreduktase und die Glutathionoxidoreduktase kodieren, deletiert sind. Beide Enzyme gehören zum zelleigenen Redoxsystem. Ihre Abwesenheit führt zu einer Änderung des cytoplasmatischen Redoxpotentials, was die Bildung von Disulfidbrücken auch im Zytoplasma von *E.coli* erlaubt. Die zusätzliche Expression des Proteins als Fusion mit Thioredoxin kann die Löslichkeit des gewünschten Proteins zusätzlich erhöhen, gleichzeitig wirkt Thioredoxin als Chaperon und verbessert die Proteinfaltung. Eine weitere Strategie ist die Sekretion der exprimierten Proteine in das Periplasma von *E.coli*. In diesem Kompartiment ist die Bildung von Disulfidbrücken aufgrund des oxidativen Redoxpotentials und der Anwesenheit von Disulfidisomerasen möglich. Durch die Expression als Fusion mit

dem Maltose-Binding-Protein (MBP) oder den Disulfidisomerasen DsbA, bzw. DsbC kann die Löslichkeit des fusionierten Proteins ebenfalls erhöht werden. Durch die zusätzlich exprimierten Disulfidisomerasen kann die Bildung „falscher“ Disulfidbrücken zudem verringert werden. Beide Expressionsstrategien wurden für die Expression von Sclerostin in *E.coli* angewendet. Die Expression von Sclerostin als Thioredoxinfusion in *Origami*TM Zellen führte dazu, dass ein Großteil des Proteins als unlösliche Einschlusskörper im Zytoplasma synthetisiert wurde. Bei der Expression von Sclerostin als MBP-, DsbA- und DsbC-Fusion wurde ein weitgehender proteolytischer Abbau der Fusionsproteine beobachtet. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, Sclerostin unlöslich in Form von Einschlusskörpern im Zytoplasma von *E.coli* zu exprimieren. Diese können durch Zentrifugation mechanisch isoliert und für die Renaturierung in Harnstoff oder Guanidiniumhydrochlorid gelöst werden. Diese Strategie lieferte größere Mengen an löslichem, gefaltetem und hochreinem Sclerostin. Für die Expression von murinem Sclerostin, murinem Sclerostin- Δ C und murinem Sclerostin- Δ NC in *E.coli*-Bakterien als unlösliche Einschlusskörper wurde die kodierende Sequenz (ohne Signalsequenz) von murinem Sclerostin und dessen Trunktionsvarianten in den Expressionsvektor pET28b (Novagen) zwischen die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *XhoI* kloniert. Das Expressionskonstrukt mSOST_pET28b kodiert für die Aminosäuresequenz Gln¹ bis Tyr²¹³ von reifem murinem Sclerostin, mSOST Δ C_pET28b für die Aminosäuresequenz Gln¹ bis Arg¹⁴⁴ und mSOST Δ NC_pET28b für die Aminosäuresequenz Asn³⁶ bis Arg¹⁴⁴ (siehe Abb. 24). Alle Konstrukte enthalten eine N-terminale Hexahistidinsequenz sowie eine nachgeschaltete Thrombinschnittstelle. Die Sequenzen aller Konstrukte sind im Anhang hinterlegt. Für die Expression wurden die Konstrukte in *Rosetta*TM(DE3)-Zellen transformiert. Der *E.coli*-Stamm (*Rosetta*TM(DE3)) trägt zusätzliche Gene, die für die tRNAs für Arg, Leu, Ile und Pro kodieren. Diese tRNAs werden vor allem für die Translation eukaryontischer Gene benötigt, da durch die Benutzung unterschiedlicher Codons in Bakterien und eukaryontischen Expressionssystemen eine Limitation dieser tRNAs in *E.coli* zu einem Abbruch der Translation führt. Durch die Expression von Sclerostin in *Rosetta*TM(DE3)-Zellen wurde, verglichen mit einer Expression in *BL21*-Zellen, eine deutliche Ausbeutesteigerung an Einschlusskörpern erzielt.

Die Proteine wurden entweder, wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben, in Terrific Broth Medium exprimiert oder, falls isotopenmarkiertes Protein benötigt wurde, in M9-Minimalmedium (wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben). Die Proteinexpression wurde mittels SDS-PAGE-Analyse kontrolliert. Die SDS-PAGE-Analyse der Proben vor Zugabe von IPTG und nach einer dreistündigen Expressionsphase zeigte deutlich, dass die Probe nach der Expressionsphase

Ergebnisse

das überexprimierte Protein enthält (siehe Abb. 25). Die Zellen wurden mittels Zentrifugation geerntet und das Feuchtgewicht der Zellen bestimmt (siehe Tabelle 18).

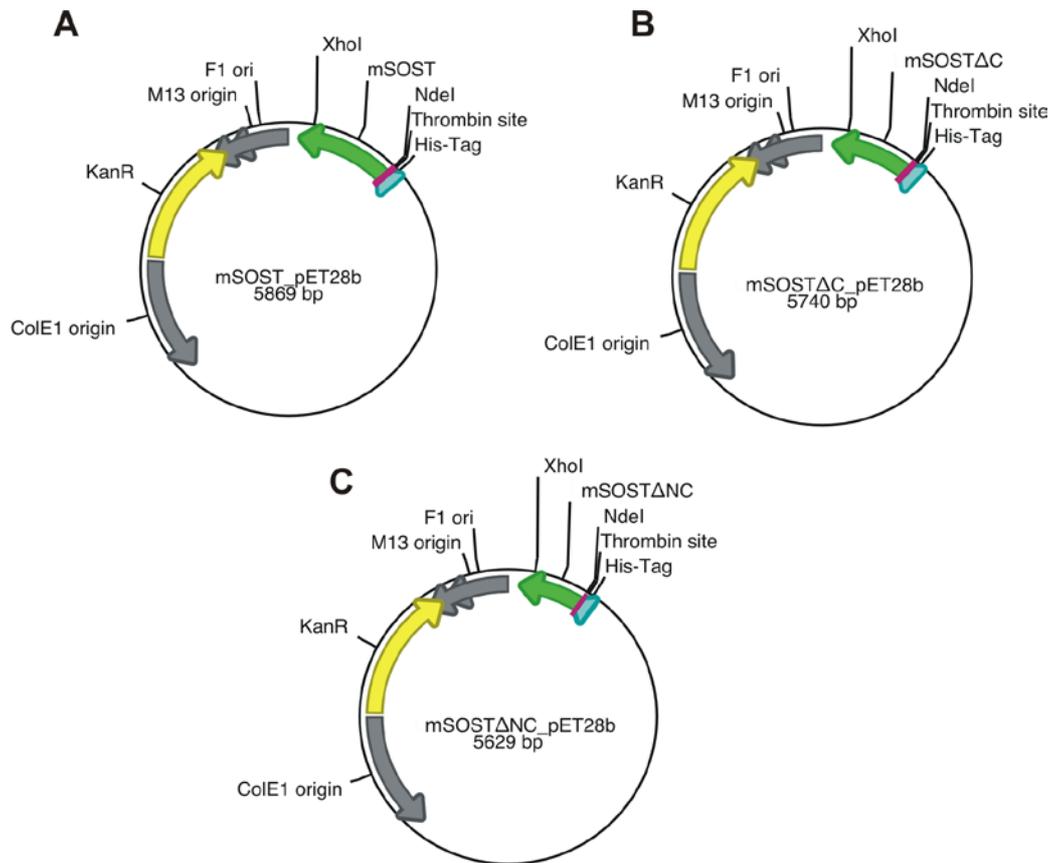


Abbildung 24: Vektorkarten. A) mSOST_pET28b. B) mSOST Δ C_pET28b. C) mSOST Δ NC_pET28b.

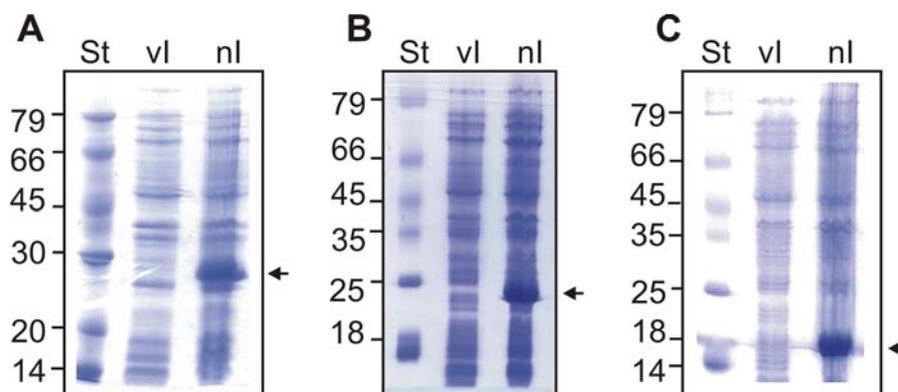


Abbildung 25: Expressionskontrolle mittels SDS-PAGE-Analyse. A) Expression von murinem Sclerostin, B) Expression von murinem Sclerostin- Δ C und C) Expression von murinem Sclerostin- Δ NC. VI steht für die Probe vor Zugabe von IPTG, nl steht für die Probe nach dreistündiger Expressionsphase. St steht für Standard. Die Pfeile markieren die Proteinbande des murinen Sclerostins (links), murinen Sclerostins- Δ C (mitte) und murinen Sclerostins - Δ NC (rechts).

Um die Einschlusskörper zu isolieren, wurden die in Tris-EDTA-Puffer resuspendierten Zellen zunächst mit Lysozym versetzt und durch eine Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Die Einschlusskörper wurden durch Zentrifugation isoliert und die Ultraschallbehandlung wurde zur weiteren Reinigung nochmals wiederholt. Nach der Isolierung wurden die Einschlusskörper mit Tris-EDTA-Puffer / 2% Triton X100 gewaschen (resuspendiert) und durch Zentrifugation vom Überstand getrennt. Das Feuchtgewicht der isolierten Einschlusskörper wurde bestimmt (Tabelle 18). Anschließend wurden diese in 6M Guanidiniumhydrochlorid gelöst und durch Zugabe von β -Mercaptoethanol reduziert. Die Lösung wurde zur Proteinextraktion über Nacht gerührt. Anschließend wurde das gelöste Protein mittels Metallionen-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen gereinigt (siehe 2.7.2). Die Protein-enthaltenden Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert (siehe Abbildung 26).

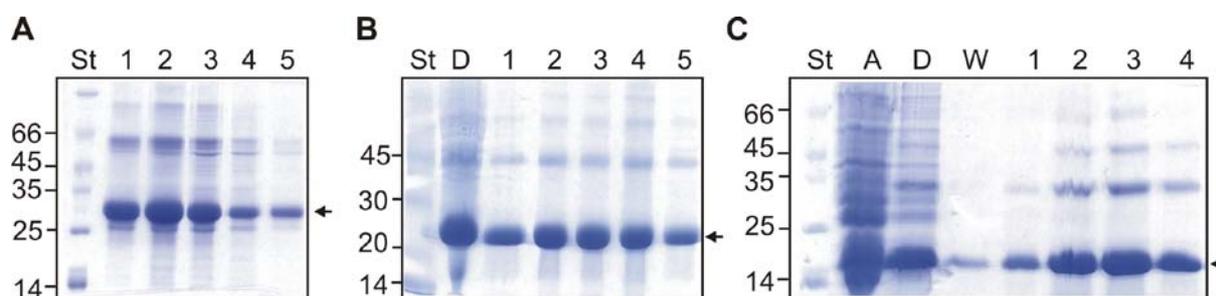


Abbildung 26: SDS-PAGE-Analyse der Protein-enthaltenden Fraktionen der Metallchelator-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen. A) 1-5: Murines Sclerostin-enthaltende Fraktionen. B) D: Durchlauf. 1-5: Murines Sclerostin- Δ C-enthaltende Fraktionen. C) A: Auftrag, D: Durchlauf, W: Waschen, 1-4: murines Sclerostin- Δ NC-enthaltende Fraktionen. Die Pfeile markieren die Proteinbande des murinen Sclerostins (links), murinen Sclerostins- Δ C (mitte) und murinen Sclerostins- Δ NC (rechts). St steht für Standard.

Für die Renaturierung des Proteins wurde der pH-Wert der Proteinlösung auf pH 8.0 eingestellt, die Thiolgruppen wurden durch Zugabe von Dithiothreitol reduziert und die Proteinlösung wurde auf eine Konzentration von 20mg/ml konzentriert. Das Konzentrat wurde bei Raumtemperatur tropfenweise im Verhältnis 1:100 unter Rühren in Renaturierungspuffer verdünnt und der Reaktionsansatz anschließend für fünf Tage bei 4°C inkubiert. Die Renaturierungslösung wurde vierfach gegen 10 Volumina des Auftragspuffers für die anschließende Kationenaustauschchromatographie dialysiert (siehe 2.7.4) und dann auf eine Carboxymethyl-Sepharose-Säule aufgetragen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch einen linearen NaCl-Gradienten (siehe Abb. 27).

Ergebnisse

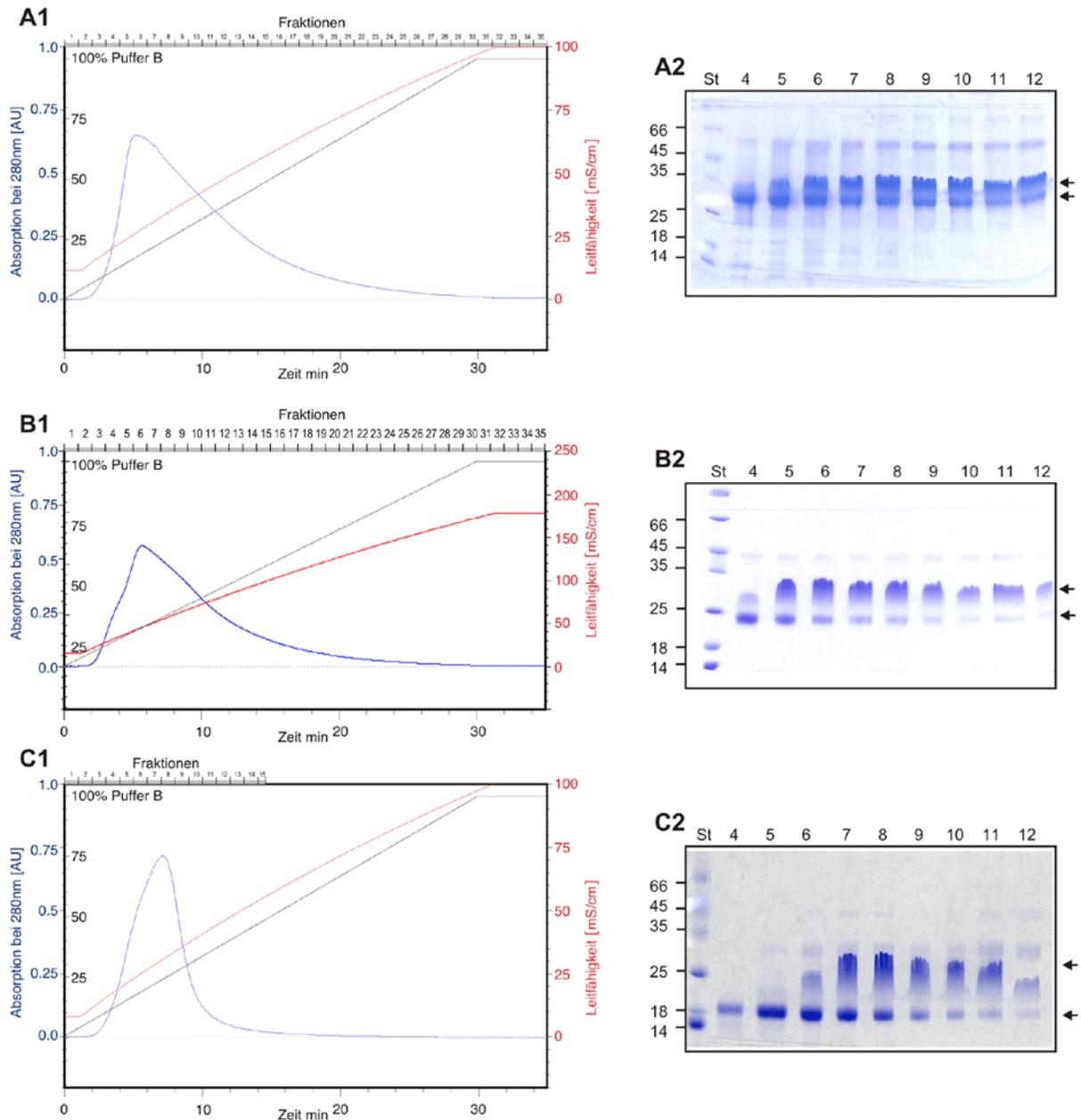
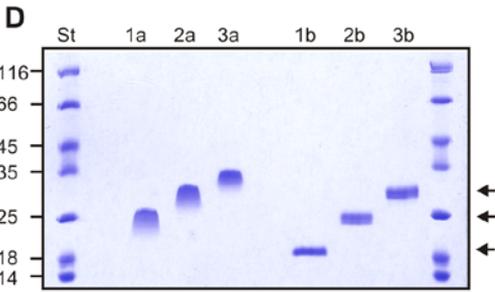
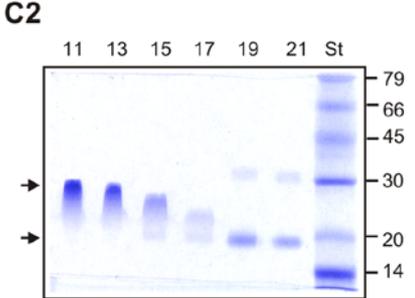
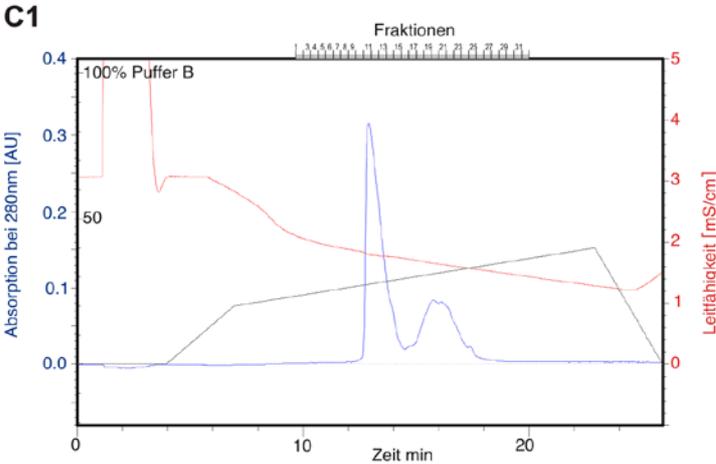
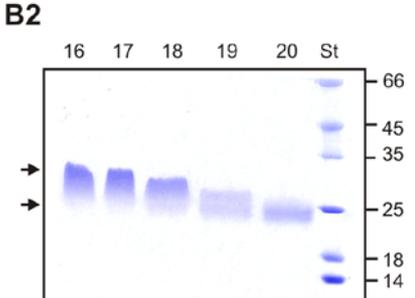
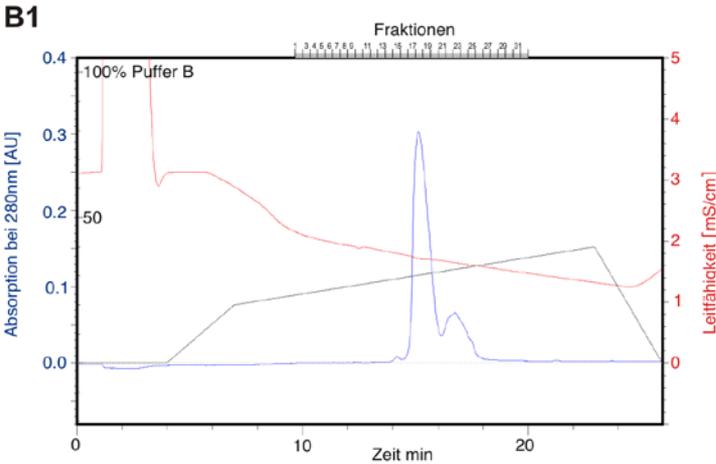
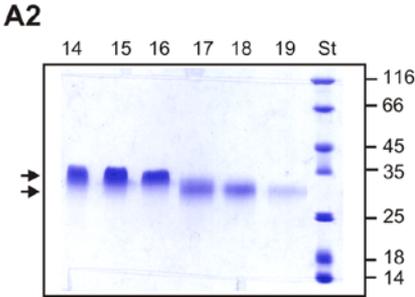
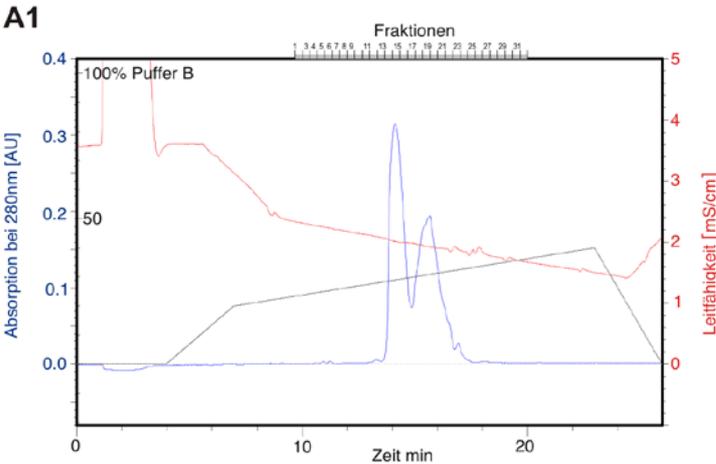


Abbildung 27: Analyse der Kationenaustauschchromatographie von Sclerostin und dessen Trunktionsvarianten. Chromatogrammprofile der Kationenaustauschchromatographie von murinem Sclerostin (A1), murinem Sclerostin- Δ C (B1) und murinem Sclerostin- Δ NC (C1). SDS-PAGE-Analyse der Protein-enthaltenden Fraktionen unter nichtreduzierenden Bedingungen für murines Sclerostin (A2), murines Sclerostin- Δ C (B2) und murines Sclerostin- Δ NC (C2). Die Pfeile markieren Proteinbanden der unterschiedlichen Faltungskonformere der Sclerostinvarianten.

Abbildung 28 (nächste Seite): RP-HPLC von Sclerostin und Varianten. Chromatogrammprofile der RP-HPLC von murinem Sclerostin (A1), murinem Sclerostin- Δ C (B1) und murinem Sclerostin- Δ NC (C1). SDS-PAGE-Analyse der Protein-enthaltenden Fraktionen unter nichtreduzierenden Bedingungen für murines Sclerostin (A2), murines Sclerostin- Δ C (B2) und murines Sclerostin- Δ NC (C2). Die Pfeile markieren die unterschiedlichen Faltungskonformere der Sclerostinvarianten. D) SDS-PAGE-Analyse der final gereinigten Sclerostinvarianten unter nichtreduzierenden Bedingungen (a) und unter reduzierenden Bedingungen (b) für murines Sclerostin- Δ NC (1), murines Sclerostin- Δ C (2) und murines Sclerostin (3). Die Pfeile markieren die Proteinbanden der drei Sclerostinvarianten.



Ergebnisse

Die Analyse der Eluate mittels SDS-PAGE unter nichtreduzierenden Bedingungen zeigte, dass während der Renaturierung zwei unterschiedliche Faltungskonformere entstehen, die sich durch unterschiedliches Laufverhalten im SDS-Gel unterscheiden (siehe Abb. 27). Wird die Proteinlösung vor der Analyse reduziert, so ist nur noch die untere Proteinbande im Gel sichtbar. Die getrennte Analyse der biologischen Aktivität beider Konformere in einem Wnt-Reporter-gen-Nachweisverfahren ergab, dass das Konformer, mit dem höheren apparenten Molekulargewicht, eine zehnfach höhere biologische Aktivität als das zweite Konformer aufweist. Fraktionen, die zum größten Teil dieses Faltungskonformer enthielten, wurden vereinigt und mit 20mM Tris-Puffer pH 8.0 im Verhältnis 1:1 verdünnt, um die Präzipitation von Sclerostin zu vermeiden. Die abschließende Reinigung von wildtypischem Sclerostin und dessen Trunktionsvarianten erfolgte mittels „reversed phase“-HPLC (siehe 2.7.5). Die Elution der Proteine erfolgte durch einen optimierten nichtlinearen Gradienten. Wie im Chromatogrammprofil zu sehen, eluieren alle Sclerostinvarianten in zwei Peaks (siehe Abb. 28). Wie die SDS-PAGE-Analyse unter nichtreduzierenden Bedingungen zeigt, enthält der erste Peak das Faltungskonformer mit höherer biologischer Aktivität, während der zweite Peak das Faltungskonformer mit dem niedrigeren apparenten Molekulargewicht enthält (siehe Abb. 28). Fraktionen, die ausschließlich das aktivere Faltungskonformer in reiner Form enthielten, wurden vereinigt und gefriergetrocknet.

Protein	murines Sclerostin		murines Sclerostin- Δ C	murines Sclerostin- Δ NC		
	-	^{15}N		-	^{15}N	$^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}$
Isotopenmarkierung	-	^{15}N		-	^{15}N	$^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}$
Zellfeuchtgewicht pro l Expressionskultur	3.5g/l	3.3g/l	3.3g/l	3g/l	4g/l	4g/l
Feuchtgewicht Einschlusskörper	200mg/g	125mg/g	200mg/g	220mg/g	110mg/g	100mg/g
Ni-Säule	4mg/g	3.3mg/g	7mg/g	6.6mg/g	4.4mg/g	3.5mg/g
Ionenaustauschsäule	1.4mg/g	0.57mg/g	1.4mg/g	3mg/g	0.6mg/g	0.85mg/g
RP-HPLC	0.32mg/g	0.18mg/g	0.5mg/g	1.1mg/g	0.23mg/g	0.28mg/g

Tabelle 18: Aufreinigung von Sclerostin und dessen Trunktionsvarianten aus *E.coli*-Expression. Die mg-Angaben beziehen sich auf das für die Proteinisolierung eingesetzte Zellfeuchtgewicht.

In Tabelle 18 sind die Ausbeuten (Zellmasse oder Protein) nach den verschiedenen Reinigungsschritten dargestellt. Die verkürzten Sclerostinvarianten murines Sclerostin- Δ C und Sclerostin- Δ NC konnten im Vergleich zu dem wildtypischen Protein in zwei bis dreifach höherer Ausbeute erhalten werden. Durch die Expression in Minimalmedium mit isotope markierten Stickstoff- und/oder Kohlenstoffquellen verschlechterte sich die Proteinexpression in allen Fällen.

Die gereinigten Proteine wurden, wie in Kapitel 2.9.1 beschrieben, massenspektrometrisch untersucht. Die Analyse ergab, dass das N-terminale Methionin in allen Fällen vollständig posttranslational prozessiert wurde und an dem reifen Protein fehlt. Für alle Proteine konnte das korrekte Molekulargewicht experimentell bestimmt werden. Abbildung 28 D zeigt eine SDS-PAGE-Analyse der Sclerostinvarianten unter reduzierenden und nichtreduzierenden Bedingungen. Wildtypisches murines Sclerostin und murines Sclerostin- Δ C bestehen aus mindestens zwei Proteinspezies, wie die Doppelbande im SDS-Gel unter reduzierenden Bedingungen belegt. Massenspektrometrische Untersuchungen der Proteine belegten, dass zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus prozessiert und proteolytisch abgespalten wurden. Neben dem vollständigen Protein konnten Spezies detektiert werden, denen die Aminosäuren 1 bis 36 oder 1 bis 42 fehlen.

Alle aus *E.coli*-Zellkultur isolierten Sclerostinvarianten wurden in einem Wnt-Reportergen-Nachweisverfahren auf ihre biologische Aktivität getestet (Kapitel 2.11.6). Die Varianten zeigten eine dosisabhängige Hemmung der Wnt-responsiven „Firefly“-Luciferase Expression mit ähnlicher Aktivität und entsprechen hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität den aus *Sf9* – Zellkultur isolierten Proteinen.

Für die Strukturanalyse mittels NMR-Spektroskopie wurde die N-terminal angehängte Hexahistidinsequenz durch enzymatische Proteolyse mittels Thrombin abgespalten. Hierfür wurde murines Sclerostin bzw. murines Sclerostin- Δ NC (oder die isotope markierten Proteine) in Tris-Puffer pH 7.5 gelöst und mit 0.1U biotinyliertem Thrombin pro mg Sclerostinprotein versetzt (siehe 2.7.6). Nach Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur wurde die Protease durch Bindung an Streptavidin-Agarose aus der Lösung abgetrennt und die verbleibende Proteinlösung durch RP-HPLC aufgereinigt. Wie am Beispiel von murinem Sclerostin- Δ NC (Abbildung 29 A, B) gezeigt, entstehen während der Proteolyse zwei Spaltprodukte, die mittels RP-HPLC sehr gut voneinander getrennt werden können. Die apparenten Molekulargewichte der beiden Produkte können unter reduzierenden Bedingungen in der SDS-PAGE-Analyse unterschieden werden (Abb. 29 B). Die massenspektrometrische Analyse der beiden Elutionsfraktionen ergab (siehe 2.9.1), dass die zweite Fraktion das

Ergebnisse

Protein mit dem erwarteten Molekulargewicht von 12680,603Da enthielt, während das Protein in der ersten Fraktion 18 Dalton schwerer ist. (Das theoretische Molekulargewicht des erwarteten Produktes beträgt 12679.357Da). Eine Massendifferenz von 18 Dalton entspricht dem Molekulargewicht eines Wassermoleküls (Abbildung 29 C, D), woraus geschlossen werden kann, dass Thrombin innerhalb der Cystein-reichen Domäne von Sclerostin eine zweite Peptidbindung unter Addition von Wasser hydrolysiert. Fraktionen, die das erwünschte vollständige Spaltprodukt enthielten, wurden vereinigt. Wie in Abbildung 29 B gezeigt, konnte durch die Wahl der optimalen Thrombinkonzentration die Menge des Nebenprodukts minimiert werden.

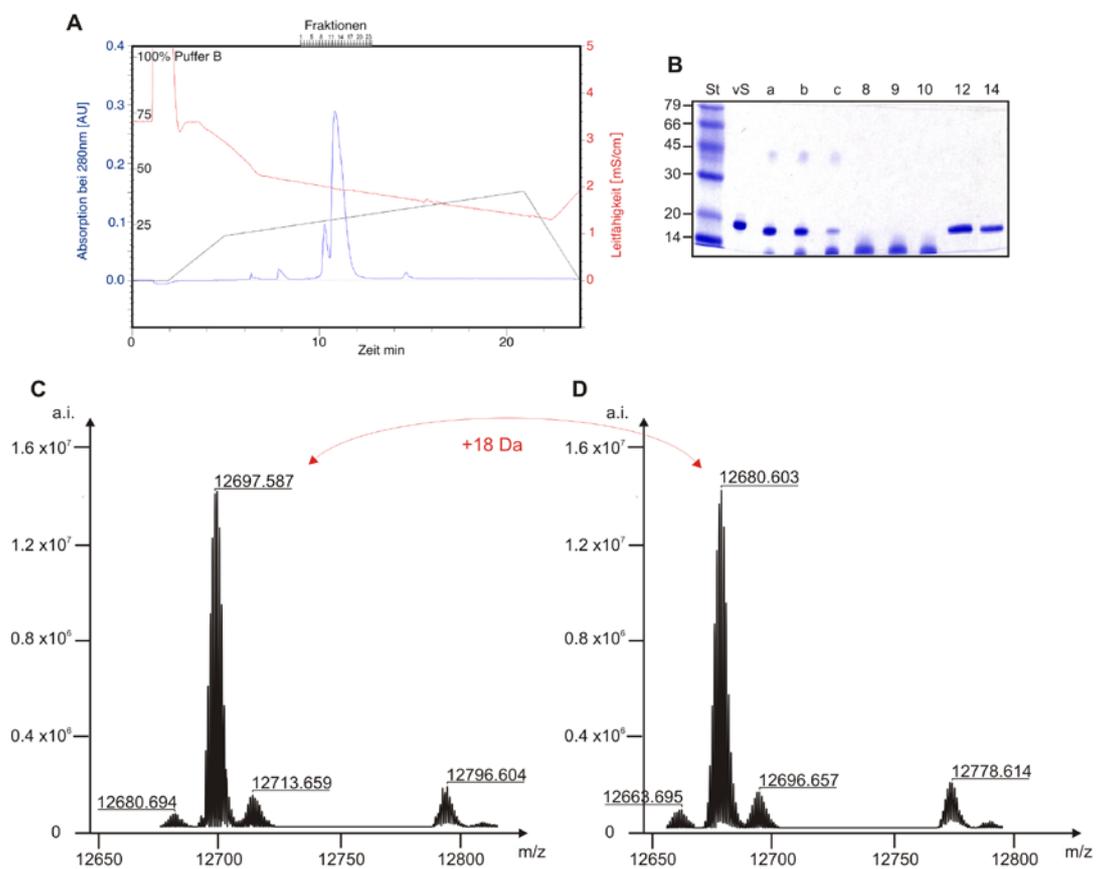


Abbildung 29: Entfernung der Hexahistidinsequenz von murinem Sclerostin- Δ NC durch enzymatische Proteolyse mit Thrombin. A) RP-HPLC Chromatogramm nach der Thrombinspaltung. B) SDS-PAGE-Analyse nach Thrombinspaltung von murinem Sclerostin- Δ NC. vS) vor Spaltung, a) nach Spaltung mit einer Thrombinkonzentration von 0.1U/mg, b) nach Spaltung mit einer Thrombinkonzentration von 0.5U/mg, c) nach Spaltung mit einer Thrombinkonzentration von 2U/mg. 8-10) Erste Fraktion der RP-HPLC. 12-14) Zweite Fraktion der RP-HPLC. Die SDS-PAGE-Analyse erfolgte unter reduzierenden Bedingungen. C) Massenspektrum der Fraktion 9 nach Dekonvolution. D) Massenspektrum der Fraktion 12 nach Dekonvolution. Die beiden Spaltprodukte unterscheiden sich in ihrem Molekulargewicht durch 18Da.

3.6 Analyse der dreidimensionalen Struktur von Sclerostin mittels NMR-Spektroskopie

Für die Strukturaufklärung von Sclerostin mittels NMR-Spektroskopie wurden die Proteine murines Sclerostin und murines Sclerostin- Δ NC in 250 μ l 20mM Kaliumphosphatpuffer pH 6.0, 50mM Natriumchlorid, 5% D₂O, 0.2% Natriumazid gelöst (siehe Kapitel.: 2.13.1) und in ein NMR-Röhrchen überführt. Die Proteinkonzentration der unmarkierten und markierten Proben betrug zwischen 0.25 und 1mM.

Alle NMR-Messungen wurden von Dr. Peter Schmieder oder Monika Beerbaum (Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie, Berlin, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Hartmut Oschkinat) durchgeführt (siehe Kapitel: 2.13.2). Alle gemessenen Spektren sind in Tabelle 23 im Anhang aufgelistet und wurden, wie in Kapitel 2.13.3 beschrieben, prozessiert.

3.6.1 NMR-spektroskopische Analyse von Sclerostin

Anhand erster NMR-spektroskopischer Analysen sollte bestimmt werden, welche der drei Sclerostinvarianten (murines Sclerostin, murines Sclerostin- Δ C oder murines Sclerostin- Δ NC) für die Strukturaufklärung am besten geeignet ist. Kriterien hierfür waren, dass die Variante einerseits biologisch aktiv ist und andererseits möglichst wenige flexible Bereiche enthalten sollte, um eine Überlappung der NMR-Signale in den Spektren gering zu halten. Die zellbasierenden Nachweisverfahren ergaben, dass der Cystein-reiche Teil des Proteins für die Wnt-inhibierende Funktion von Sclerostin ausreicht. Weiterhin weist eine gezielte Proteolyse darauf hin, dass N- und C-Terminus von Sclerostin flexibel vorliegen (siehe Kapitel 3.2.3). Bei nahezu identischer biologischer Aktivität sollte nun durch den Vergleich von ¹H¹⁵N 2D-HSQC Experimenten der drei Varianten bestimmt werden, welche Variante nur strukturierte Bereiche enthält. Das ¹H¹⁵N 2D-HSQC Experiment liefert ein zweidimensionales heteronukleares Spektrum mit Kreuzsignalen zwischen einem ¹⁵N-Stickstoffkern und seinem kovalent verknüpften Proton. Dies sind in Proteinen nahezu ausschließlich die Amidprotonen und Amidstickstoffe der Proteinhauptkette. Da die chemische Umgebung der Amidbindung die Lage des NMR-Signals beeinflusst (also die Art der Aminosäure sowie ihre unmittelbare Nachbarschaft), geben diese Kreuzsignale ein hochaufgelöstes Bild der Umgebung, in der die einzelnen Aminosäuren lokalisiert sind. Unter Annahme, dass ein Protein völlig entfaltet ist, sind alle Kreuzsignale in der ¹H-Dimension innerhalb eines schmalen Streifens zwischen 7.5 und 8.5ppm des Spektrums lokalisiert. Bereiche zwischen 7-7.5ppm und 8.5-12ppm in der ¹H-Dimension sind hingegen

Ergebnisse

charakteristisch für Aminosäuren, die Teil einer β -Faltblattstruktur sind. Kreuzsignale von Aminosäuren, die sich in α -helikalen Bereichen oder Schleifen befinden, sind zwar ebenfalls in dem Streifen zwischen 7.5 und 8.5 ppm lokalisiert, unterscheiden sich jedoch in Intensität und Linienbreite. Aufgrund der schmalen Linienbreite, bedingt durch die langsamere Relaxation der Magnetisierung der angeregten Zustände von flexiblen Bereichen, ist hier die Intensität der Kreuzsignale von Aminosäuren in ungeordneten dynamischen Bereichen größer.

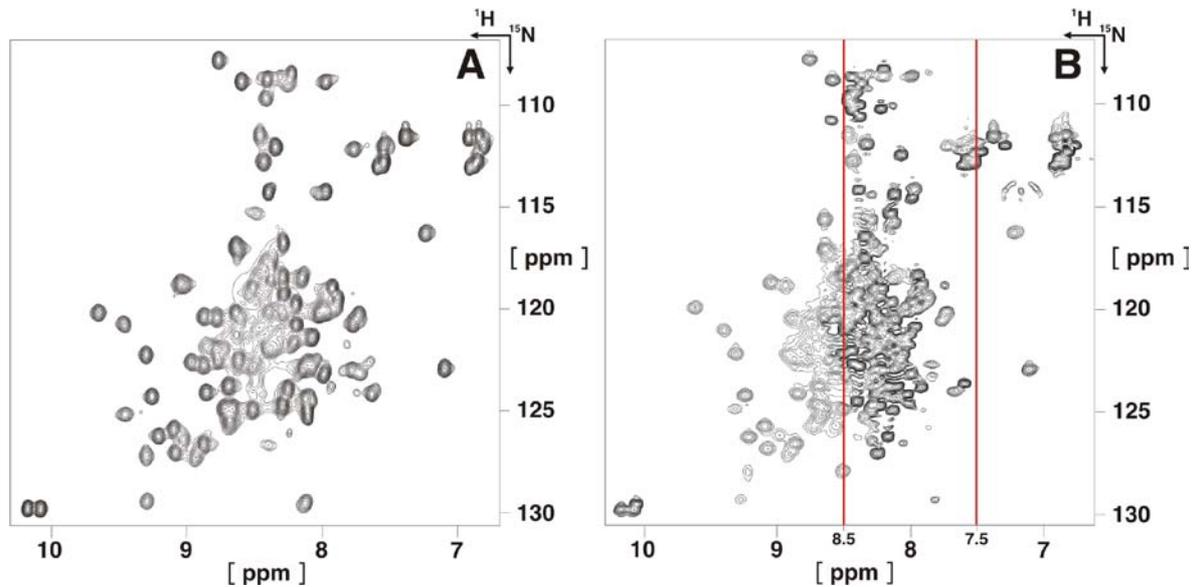


Abbildung 30: $^1\text{H}^{15}\text{N}$ 2D-HSQC Spektrum von A) murinem Sclerostin- ΔNC und B) murinem Sclerostin. Der Streifen in dem die Kreuzsignale von Aminosäuren aus ungefalteten Bereichen lokalisiert sind, ist durch die zwei roten Linien gekennzeichnet.

Für die Analyse wurden zunächst $^1\text{H}^{15}\text{N}$ 2D-HSQC Spektren von murinem Sclerostin und murinem Sclerostin- ΔNC aufgenommen (siehe Abb. 30). Aufgrund der typischen Verteilung und den Linienbreiten der Kreuzsignale zeigt das in Abbildung 30 dargestellte Spektrum von murinem Sclerostin- ΔNC , dass die Cystein-reiche Domäne des Proteins gefaltet vorliegt, und dass Sclerostin vor allem β -Faltblattelemente enthält. Der Vergleich mit dem Spektrum des nichttrunkierten Proteins ergab, dass die zusätzlichen Aminosäuren des N- und C-Terminus eine ungefaltete Konformation aufweisen und aufgrund der schmalen Linienbreiten flexibel und dynamisch ungeordnet vorliegen müssen. Da die Kreuzsignale der Aminosäuren des gefalteten Bereichs in beiden Spektren nahezu identische Positionen aufweisen, konnte überdies gefolgert werden, dass die Trunkation von N- und C-Terminus des Proteins keinen Einfluss auf die Struktur des gefalteten Bereiches hat. Aus diesem Grund wurde die Variante murines Sclerostin- ΔNC für die weitere Strukturanalyse gewählt.

3.6.2 Zuordnung der chemischen Verschiebungen

Die Zuordnung der NMR-Signale der Proteinhauptkette von murinem Sclerostin- Δ NC erfolgte auf der Basis eines heteronuklearen 3D-Spektrensatzes, der die folgenden „Tripleresonanz“-Experimente enthält: CBCA(CO)NH, CBCA(N)NH und HN(CA)CO, HNCO.

Auf der Basis der ^1H - ^{15}N -Kreuzsignale in der ^1H - ^{15}N -Projektion werden 2D ^1H - ^{13}C -Streifen in den ^{15}N -Scheiben der 3D-Spektren isoliert, die den Spinsystemen einer Aminosäure bzw. einer Aminosäurepaarung entsprechen. Für jede Aminosäure wird somit ein 2D- ^1H - ^{13}C -Streifen mit der ihr eigenen ^{15}N -chemischen Verschiebung des Amidstickstoffs erhalten. Der 2D- ^1H - ^{13}C Streifen zeigt nun im Fall des CBCA(CO)NH Spektrums Kreuzsignale zwischen dem Amidproton der eigenen Aminosäure in der ^1H - und ^{15}N -Dimension und den $\text{C}\alpha$ - und $\text{C}\beta$ -Atomen der vorigen Aminosäure in der ^{13}C -Dimension. Im Fall des CBCA(N)NH Spektrums enthält der 2D-Streifen in der ^{13}C -Dimension die Information über die chemischen Verschiebungen für die α - und $\text{C}\beta$ -Atome der vorigen **und** der eigenen Aminosäure. Die chemischen Verschiebungen der $\text{C}\alpha$ - und $\text{C}\beta$ -Atome einer Aminosäure werden von der chemischen Umgebung der eigenen Seitenkette beeinflusst und sind somit charakteristisch für die jeweilige Aminosäure (Cavanagh, *et al.*, 1996). Für die sequenzielle Zuordnung werden beliebig zwei korrespondierende ^1H - ^{13}C -Streifen im CBCA(CO)NH und im CBCA(N)NH als Startpunkt ausgewählt (siehe Abb. 31 A). Die $\text{C}\alpha$ - und $\text{C}\beta$ - Signale der eigenen Aminosäure im CBCA(N)NH-Streifen werden nun dazu verwendet, im CBCA(CO)NH nach einem ^1H - ^{13}C -Streifen zu suchen, der identische $\text{C}\alpha$ - und $\text{C}\beta$ - Signale aufweist. Über die charakteristischen $\text{C}\alpha$ - und $\text{C}\beta$ -Verschiebungen können die einzelnen Aminosäuretypen identifiziert und mit Abschnitten in der Proteinsequenz verglichen werden.

Nach erfolgreicher Identifizierung eines Sequenzabschnitts wurden die chemischen Verschiebungen für HN, N, $\text{C}\alpha$ und $\text{C}\beta$ in die im Anhang aufgeführte Tabelle der chemischen Verschiebungen übernommen. Abschließend wurde die Zuordnung mit dem Spektrenpaar HN(CA)CO und HNCO überprüft. Hier enthalten die 2D-Streifen allerdings die Information über die chemische Verschiebung des Carbonylkohlenstoffs (CO) der vorigen, bzw. der vorigen **und** der eigenen Aminosäure und basieren somit auf unabhängigen ^{13}C -Kohlenstoff-Verschiebungsdaten. Abbildung 31 zeigt exemplarisch die Zuordnung zweier Sequenzbereiche von murinem Sclerostin- Δ NC aus den Spektrenpaaren CBCA(CO)NH und CBCA(N)NH (Aminosäure Ser¹³³-Val¹³⁹) und HN(CA)CO und HNCO (Aminosäure Gly¹²⁷-Ala¹³⁰).

Ergebnisse

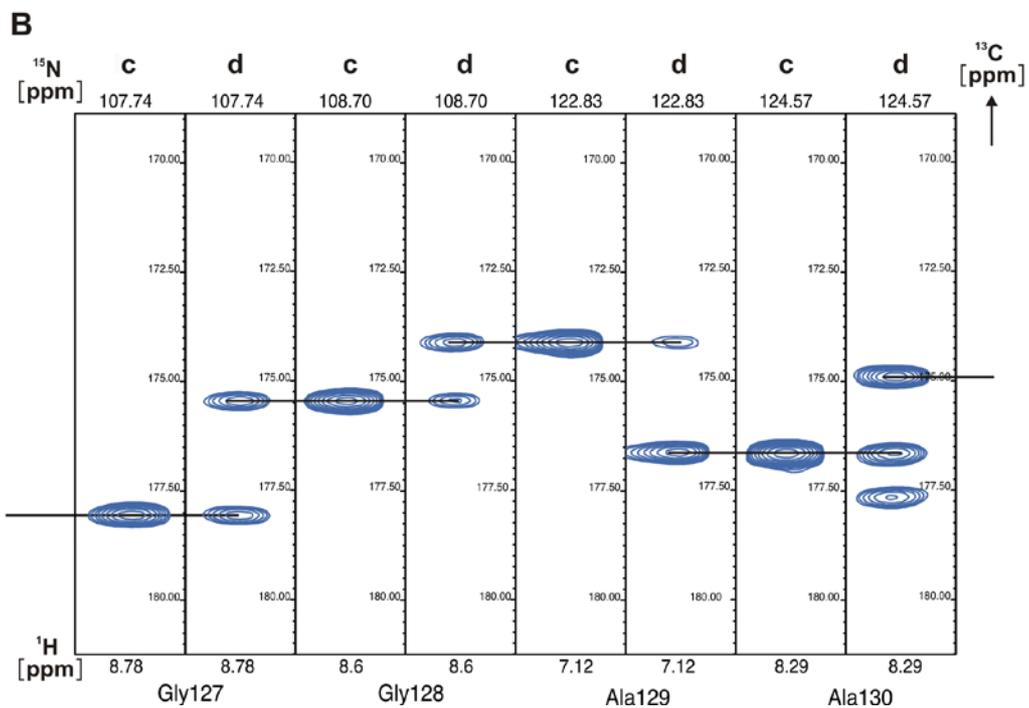
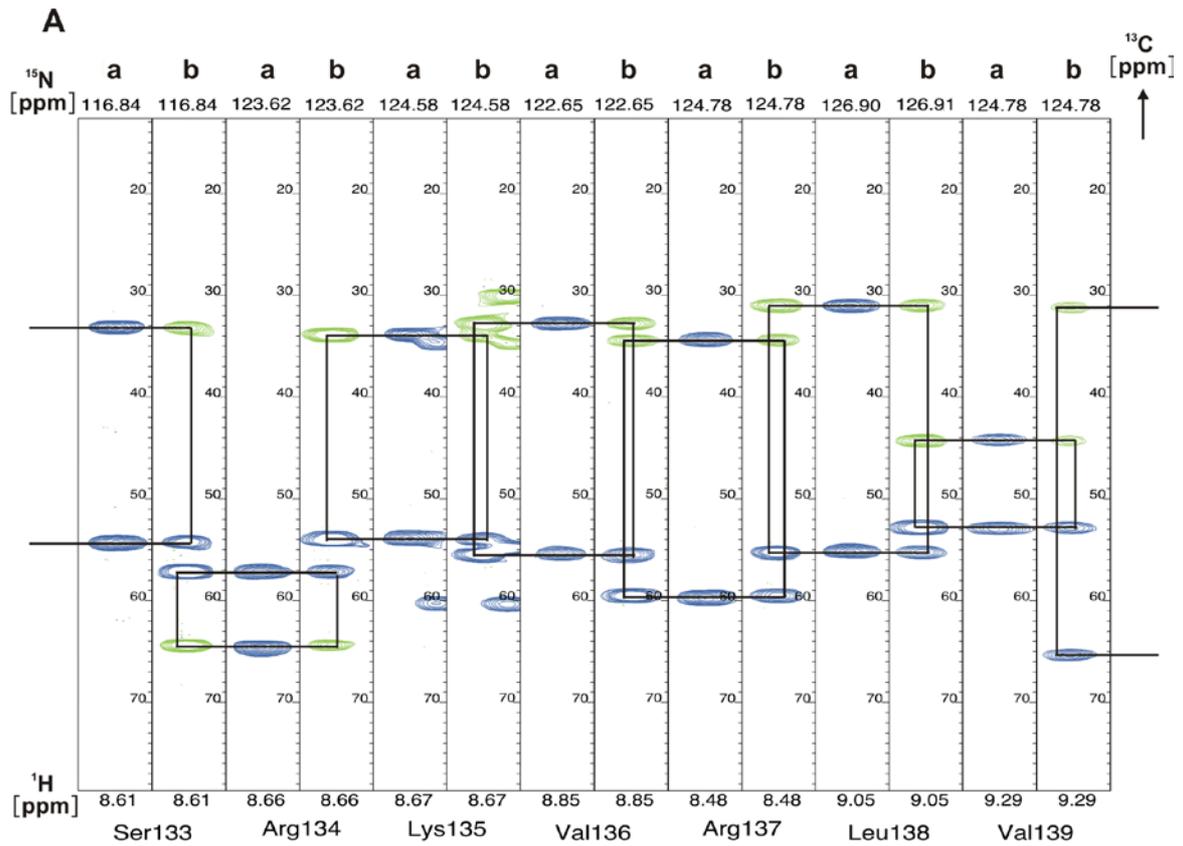


Abbildung 31: A) Zuordnung der Sequenzbereiche Ser¹³³-Arg¹³⁹ mit Hilfe der Spektrenpaare CBCA(CO)NH (a), CBCANNH (b). B) Zuordnung der Sequenzbereiche Gly¹²⁷-Ala¹³⁰ mit Hilfe der Spektrenpaare und HN(CO)CA (c), HNCO (d).

Die fehlenden chemischen Verschiebungen für die Protonen ($H\alpha$, $H\beta$, $H\gamma$, $H\delta$ etc.) und Kohlenstoffe ($C\gamma$, $C\delta$, etc.) der Seitenketten wurden aus den heteronuklearen 3D-Spektren (HBHA(CO)NH und H(C)(CO)NH-TOCSY, CBCA(CO)NH und CC(CO)NH-TOCSY, HCCH-TOCSY und HCCH-COSY) gewonnen. Im HBHA(CO)NH Spektrum werden die chemischen Verschiebungen der $H\alpha$ - und $H\beta$ -Protonen einer Aminosäure über das Carbonyl mit dem Amidproton der darauf folgenden Aminosäure korreliert. Das Spektrum erhält die Information über die chemischen Verschiebungen für $H\alpha$ und $H\beta$ einer Aminosäure bei der chemischen Verschiebung des Amidprotons der nächsten Aminosäure. Das H(C)(CO)NH-TOCSY korreliert die vollständige Seitenkette einer Aminosäure mit dem Amidproton der darauf folgenden Aminosäure und gibt somit Auskunft über die chemischen Verschiebungen für $H\alpha$, $H\beta$, $H\gamma$, $H\delta$, etc. einer Aminosäure bei der chemischen Verschiebung des Amidprotons der nächsten Aminosäure. Die Information für die Kohlenstoffe ($C\gamma$, $C\delta$, etc.) der Seitenketten wurden nach analogem Prinzip aus dem Spektrum CC(CO)NH-TOCSY erhalten. Die Zuordnung der Protonen zu ihren gekoppelten Kohlenstoffen wurde durch die Spektren HCCH-TOCSY und HCCH-COSY überprüft. Die Identifikation der chemischen Verschiebungen der Aromaten-Protonen wurde im 2D-NOESY- und 2D-TOCSY-Spektrum vorgenommen.

Für murines Sclerostin- Δ NC konnten so insgesamt 91 von 113 Aminosäuren vollständig zugeordnet werden. Von den verbleibenden 22 Resten konnten 19 Aminosäuren partiell und für drei Aminosäuren keine chemischen Verschiebungen zugeordnet werden. Einige Aminosäuren zeigten NMR-Signale mit großer Linienbreite, was auf eine Flexibilität auf der langsamen bis mittleren NMR-Zeitskala hinweist. Diese Aminosäuren (Tyr⁵³, Ser⁵⁴, Cys⁵⁵, Arg⁵⁶, Glu⁵⁷, Cys⁸⁴, Gly⁸⁵, Asp¹⁰⁶, Phe¹⁰⁷, Cys¹⁰⁹, Ile¹¹⁰) sind Teil des Cystinknotens oder liegen in unmittelbarer Nähe dazu. Daraus lässt sich schließen, dass der Cystinknoten von Sclerostin wahrscheinlich eine langsame Dynamik im μ s-Bereich aufweist. Beispielhaft für die Zuordnung der Aminosäuren sind in Abbildung 32 die Amidprotonenkreuzsignale des $^1\text{H}^{15}\text{N}$ 2D-HSQC Spektrums von murinem Sclerostin- Δ NC mit ihren zugehörigen Aminosäuren beschriftet.

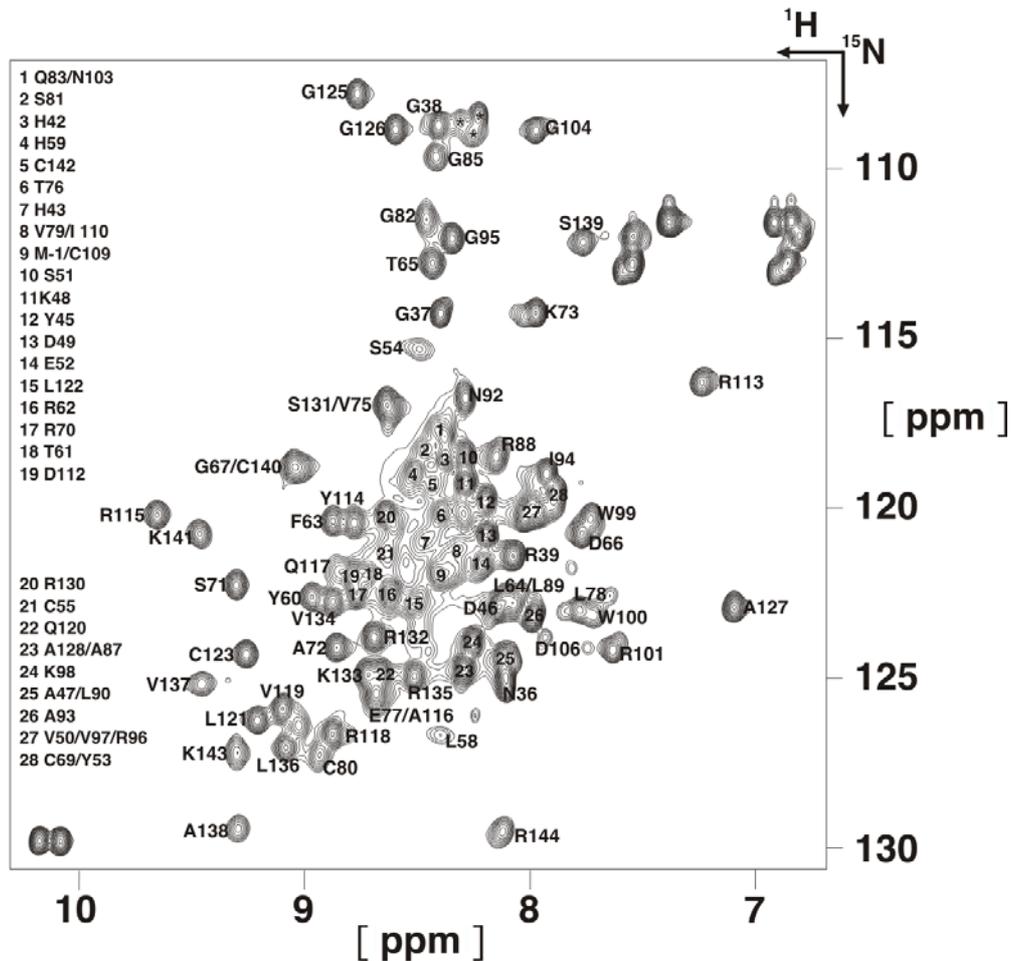


Abbildung 32: $^1\text{H}^{15}\text{N}$ 2D-HSQC-Spektrum von murinem Sclerostin- ΔNC . *) Nicht zugeordnete $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Kreuzsignale. Es handelt sich wahrscheinlich um ein zweites $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Kreuzsignal von Gly³⁸ oder Gly¹²⁶, was durch Konformationsänderungen des N-Terminus und der Schleife in der Spitze des 2. Fingers bedingt ist.

3.6.3 Sekundärstrukturanalyse von murinem Sclerostin- ΔNC

3.6.3.1 Sekundärstrukturanalyse aus NOESY-Spektren

Ein NOE-Kreuzsignal zwischen zwei Protonen entsteht, wenn der Abstand zwischen beiden Protonen kleiner als 5\AA ist. Das Volumen des NOE-Kreuzsignals ist hierbei invers proportional zum Abstand in der sechsten Potenz. Für die Sekundärstrukturelemente α -Helix und β -Faltblatt sind, aufgrund der besonderen Anordnung der Hauptkettenprotonen, charakteristische NOE-Kreuzsignale im 2D-NOESY-Spektrum zu erwarten. Im β -Faltblatt ist der Abstand des Amidprotons der Aminosäure $i+1$ (HN_{i+1}) und des H_α Protons der Aminosäure i (H_i) etwa 2.2\AA , was zu einem starken „sequenziellen“ NOE-Kreuzsignal

$(|i-j|=1)$ führt. Für α -helikale Bereiche gilt, dass der Abstand zwischen den Amidprotonen benachbarter Aminosäuren ($\text{NH}_i - \text{NH}_{i+1}$) etwa 2.5\AA beträgt, wodurch ebenfalls ein starkes „sequenzielles“ NOE-Kreuzsignal entsteht. Durch die Schleifenanordnung in helikalen Elementen kommen sich zudem die Hauptkettenatome von Aminosäure i und Aminosäure $i+3$ bzw. $i+4$ nahe. Hier beträgt der Abstand zwischen dem αH -Proton der Aminosäure i (H_α) und dem Amidproton der Aminosäure $i+3$ (NH_{i+3}) etwa 3.5\AA , weshalb ein so genanntes „Medium-range“-NOE-Kreuzsignal ($|i-j|\leq 4$) beobachtet werden kann.

Um die Sekundärstrukturelemente von murinem Sclerostin- ΔNC zu ermitteln, wurden oben genannte NOE-Kreuzsignale in den Spektren $3\text{D-}^{15}\text{N-HSQC-NOE-HSQC}$ (Kreuzsignale zwischen Amidprotonen) und $3\text{D-}^{15}\text{N-HSQC-NOESY}$ gesucht. Die Intensität der Signale wurde klassifiziert (stark, mittel und schwach) und gegen die Aminosäuresequenz aufgetragen. Für murines Sclerostin- ΔNC wurden zwei Bereiche mit typischer β -Faltblattstruktur bestimmt: Der erste Bereich ist unregelmäßig ($\beta 1$: Tyr⁵⁹-Thr⁶⁰, $\beta 2$: Leu⁶⁵-Asp⁶⁶, $\beta 3$: Cys⁶⁹-Ser⁷⁰, $\beta 4$: Thr⁷⁷-Glu⁷⁸), der zweite Bereich weist ein regelmäßiges antiparalleles β -Faltblatt auf ($\beta 5$: Arg¹¹⁵-Leu¹²¹, $\beta 6$: Arg¹³⁰-Leu¹³⁶) (siehe Abbildung 33).

3.6.3.2 Sekundärstrukturanalyse nach Wishart

Die chemischen Verschiebungen der H_α -, C_α -Atome und des Carbonylkohlenstoffs einzelner Aminosäuren eines Proteins zeigen eine Korrelation mit der vorliegenden Sekundärstruktur. Durch die Zugehörigkeit einer Aminosäure zu einem bestimmten Sekundärstrukturelement erfahren H_α , C_α und der Carbonylkohlenstoff charakteristische Hoch- bzw. Tieffeldverschiebungen verglichen mit ihren chemischen Verschiebungen in ungeordneten Peptiden („random-coil“). Wishart *et al.* entwickelte die hier angewandten Analysemethoden (siehe 2.13.6) (Wishart, *et al.*, 1992). Im Fall der H_α -Protonen wird für jede Aminosäure aus der Differenz zwischen tatsächlich beobachteter H_α -Protonen-Verschiebung und ihrem entsprechenden Wert in ungeordneten Strukturen ein chemischer Verschiebungsindex (CSI) abgeleitet (= Messwert – „random-coil“-Wert). Eine negative Abweichung von mehr als -0.1ppm entspricht dabei einem Index von -1 , eine Abweichung von mehr als $+0.1\text{ppm}$ einem Index von $+1$. Dazwischenliegende Werte ergeben einen Index von 0 . Der chemische Verschiebungsindex wird anschließend gegen die Aminosäuresequenz aufgetragen. Ist der chemische Verschiebungsindex für einen Abschnitt von drei oder mehr Aminosäuren -1 , so

Ergebnisse

weist dieser Bereich eine helikale Sekundärstruktur auf, ein Verschiebungsindex von +1 steht für β -Faltblattelemente.

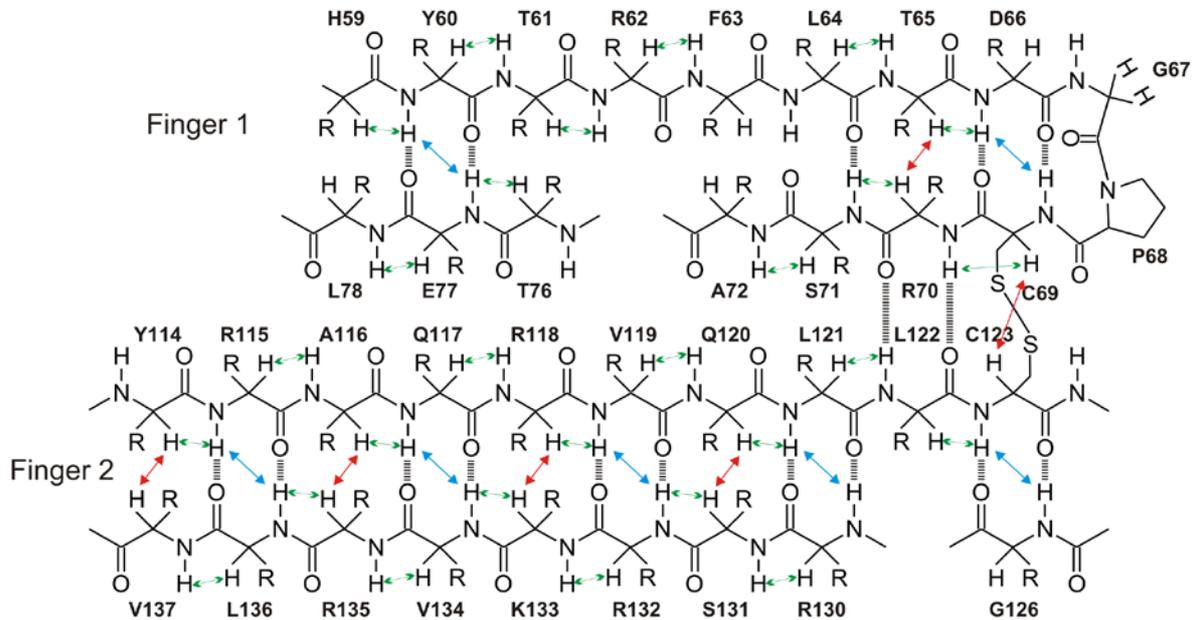


Abbildung 33: Schematische Darstellung der β -Faltblätter in den Fingern 1 und 2 von murinem Sclerostin- Δ NC. Experimentelle NOE-Kreuzsignale zwischen Amidprotonen sind als blaue Pfeile eingezeichnet, NOE-Kreuzsignale zwischen $H\alpha$ -Protonen als rote Pfeile und NOE-Kreuzsignale zwischen HN_{i+1} und $H\alpha_i$ sind als grüne Pfeile dargestellt. Die resultierenden Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte Linien dargestellt.

Für das $C\alpha$ -Atom und den Carbonylkohlenstoff jeder Aminosäure werden ebenfalls die Differenzen der „random-coil-Werte“ und der Messwerte ($\Delta\delta = \text{„random-coil-Wert“} - \text{Messwert}$) gebildet und die Ergebnisse werden gegen die Aminosäuresequenz aufgetragen. Hier zeigen Abweichungen mit negativem Vorzeichen α -helikale Bereiche an, während Abweichungen mit positivem Vorzeichen auf Bereiche mit β -Faltblatt Struktur hinweisen. In Abbildung 34 sind die Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse für murines Sclerostin- Δ NC dargestellt. Die Grafik macht deutlich, dass murines Sclerostin- Δ NC generell ein Protein mit nur geringem Sekundärstrukturanteil darstellt. Es konnten keine α -helikalen Bereiche identifiziert werden, allerdings wurden mit dieser Methode ebenfalls zwei Bereiche mit β -Faltblatt-Struktur identifiziert, die mit den aus NOESY-Spektren identifizierten Bereichen übereinstimmen. Sie wurden mit Finger 1 und Finger 2 bezeichnet. Der N-Terminus (Gly¹-Ser⁵⁴) und der Schleifenbereich (Gly⁸⁵-Phe¹⁰⁷) scheinen ebenso keine Sekundärstrukturelemente zu enthalten, der ermittelte CSI mit negativen Werten und die $\Delta\delta(C\alpha)$ - und $\Delta\delta(CO)$ -Werte mit positiven Abweichungen sind für eine reguläre Sekundärstruktur (α -helikal oder β -Faltblattstrang) inkonsistent.

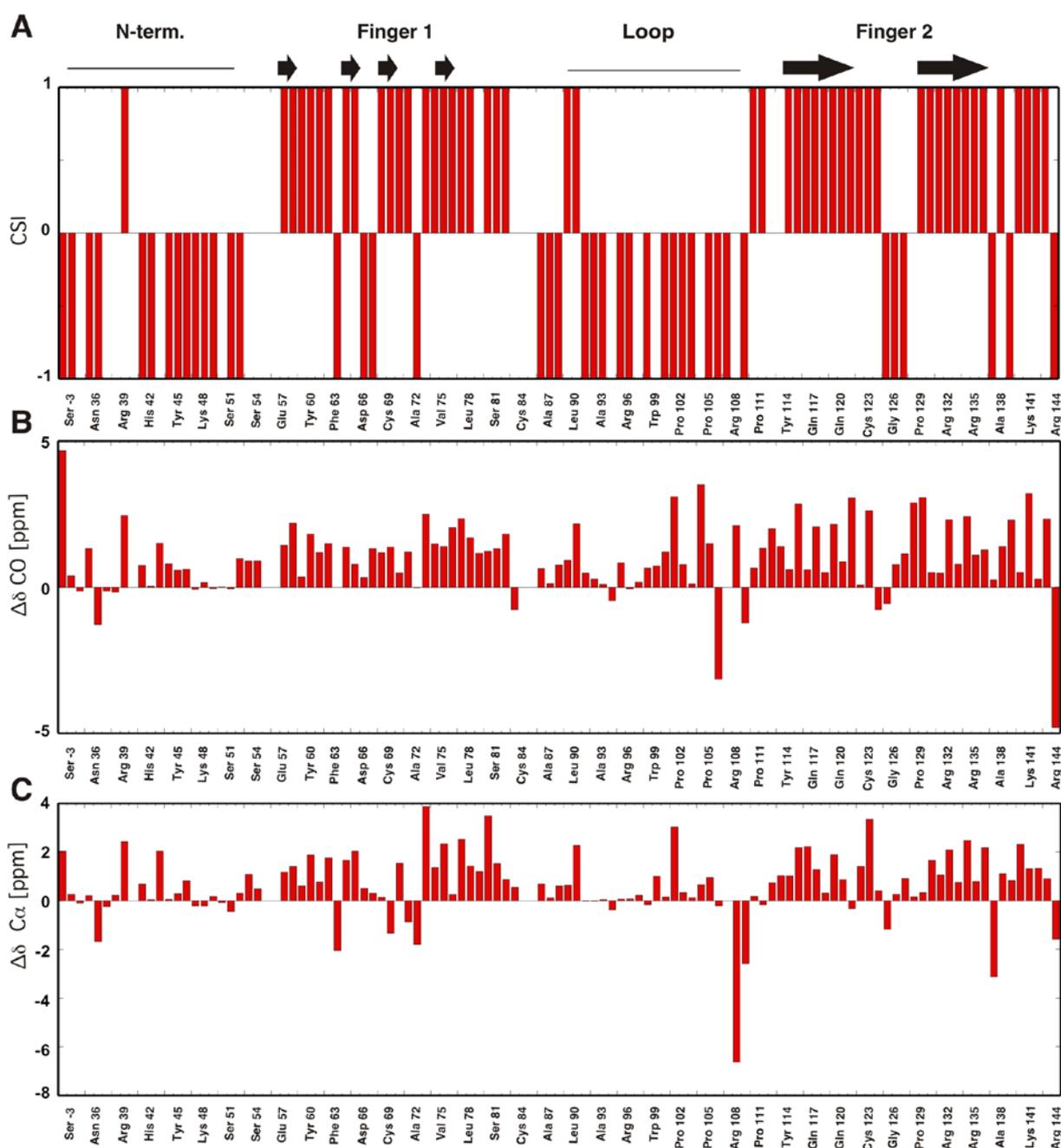


Abbildung 34: Graphische Darstellung der Abweichung der einzelnen chemischen Verschiebungen in murinem Sclerostin- Δ NC von den „random-coil“-Werten. Oben sind die identifizierten Sekundärstrukturelemente von murinem Sclerostin- Δ NC schematisch dargestellt: Pfeile stehen für β -Faltblattstränge. A) Chemischer Verschiebungsindex (CSI) der Protonen für murines Sclerostin- Δ NC nach Wishart (Wishart, *et al.*, 1992). Die Balken kennzeichnen die Abweichungen von den „random-coil“-Werten, die größer 0.1 (Balken nach oben) oder kleiner -0.1 (Balken nach unten) sind. Für die chemische Verschiebung von C α (B) und dem Carbonylkohlenstoff CO (C) sind Absolut-Werte der Differenz von („random-coil“-Wert – Messwert) in ppm angegeben.

3.6.4 Strukturanalyse

Für die Berechnung der Struktur von murinem Sclerostin- Δ NC wurden insgesamt 1143 Abstände auf der Basis einer semiquantitativen Analyse von NOE-Kreuzsignalen aus verschiedenen 2D- und 3D-NOESY-Experimenten gewonnen. Die Abstandsinformationen wurden in 3 Klassen stark (1.8-2.5Å), mittel (1.8-3.5Å) und schwach (1.8-5Å) unterteilt (siehe 2.13.7). Als unterer Grenzabstand wurde für alle Klassen 1.8Å (van-der-Waals-Abstand) gewählt, da jeweils nur ein NOE-Experiment gemessen und somit keine exakte quantitative Beziehung der NOE/Abstandsbeziehung abgeleitet werden konnte. Die Distanzeinschränkungen lassen sich in 471 NOE-Kreuzsignale innerhalb von Aminosäuren („intraresidue“), 280 sequenzielle NOE-Kreuzsignale ($|i-j|=1$), 75 so genannte „Medium range“-NOE-Kreuzsignale ($|i-j|\leq 4$) und 317 sogenannte „Long range“-NOE-Kreuzsignale ($|i-j|>4$) einteilen (siehe Tabelle 19). In Abbildung 35 sind alle in der Strukturberechnung verwendeten NOE-basierenden Abstände als gestrichelte Linien in der finalen Struktur von murinem Sclerostin- Δ NC dargestellt. Die statistische Auswertung ergibt durchschnittlich 11.8 NOE-basierende Abstände pro Aminosäure, was in erster Näherung nur eine relativ geringe „Strukturgenauigkeit“ der hier bestimmten Struktur von murinem Sclerostin- Δ NC erwarten lässt. Aus Abbildung 35 wird allerdings deutlich, dass der Großteil der Abstandsinformationen in Finger 1 und Finger 2 von murinem Sclerostin- Δ NC ermittelt wurden. Hier wurden auch die meisten NOE basierenden Abstände der „Medium-range“- und „Long-range“-Klasse gefunden. In dieser Region des Proteins wurden somit deutlich mehr als 11.8 NOE-basierende Abstände pro Aminosäure ermittelt, was bedeutet, dass die „Strukturgenauigkeit“ dieser Region deutlich besser ist. Im Schleifenbereich, im verbleibenden N-Terminus und im Bereich des Cystinknotens konnte nur eine geringe Zahl von NOE-Kreuzsignalen identifiziert werden. Die in diesen Regionen ermittelten NOEs zählen fast ausschließlich zu den „intraresidue“- und den sequenziellen-NOEs. Aufgrund des unterschiedlichen Strukturierungsgrades des Schleifenbereichs und der Finger wurden beide Bereiche in der weiteren Analyse getrennt betrachtet.

Mit Hilfe des Programms TALOS wurden Torsionswinkel für die Proteinhauptkette (ϕ und ψ) auf der Basis der chemischen Verschiebungen von $H\alpha$, $C\alpha$, $C\beta$, CO und N ermittelt (siehe 2.13.8). Aus diesen Berechnungen konnten Φ und Ψ Torsionswinkel für 87 Aminosäuren erhalten werden.

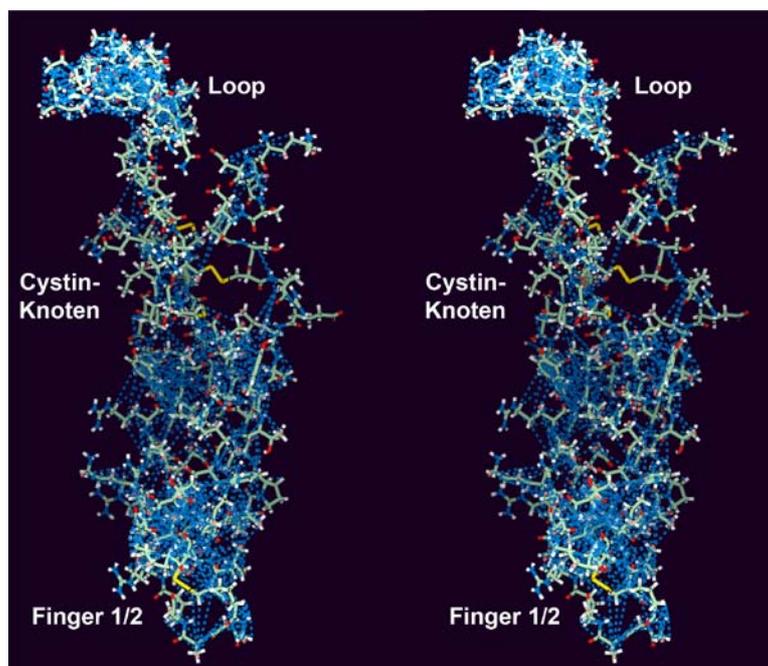


Abbildung 35: Darstellung der aus NOE-Kreuzsignale ermittelten Abstandsinformationen. Die Abstände sind als Linien in die finale Struktur von murinem Sclerostin- Δ NC eingezeichnet.

Winkel- und Distanzdaten für die Strukturberechnung

NOE basierend:

Gesamt	1143
„intraresidue“-NOEs	471
sequenzielle-NOEs ($ i-j =1$)	280
„Medium-range“-NOEs ($ i-j \leq 4$)	75
„Long-range“-NOEs ($ i-j >4$)	317
NOEs/Aminosäure	11.8
Wasserstoffbrücken	9
Torsionswinkel	78
Chemische Verschiebungen der $C\alpha$ -, $C\beta$ -Atome	78

Tabelle 19: Experimentelle Daten für die Strukturberechnung.

Ergebnisse

Die Abstands- und Torsionswinkelinformationen wurden zusammen mit den Daten für die chemischen Verschiebungen der C α - und C β -Atome von 78 Aminosäuren und den neun, aus der Sekundärstrukturanalyse ermittelten, Wasserstoffbrücken der Strukturberechnung zugrunde gelegt (siehe 2.13.9). Basierend auf einem „simulated annealing“ Protokoll, welches ausgehend von einer Startstruktur eine Proteinfaltung simuliert, wurden 100 Strukturen berechnet (Nilges, *et al.*, 1988). Hierfür wurde die Software XPLOR verwendet. Das verwendete Protokoll simulierte dabei das Aufheizen einer Startstruktur mit der Sequenz von murinem Sclerostin- Δ NC auf 2000K und die anschließende molekulare Dynamik unter Einwirkung geometrischer Einschränkungen und experimenteller Daten über einen Zeitraum von 10ps. Anschließend wird die Peptidkette einer langsamen, über 5ps andauernden, Abkühlung auf 100K unterzogen. Aus den 100 erhaltenen Strukturen wurden 15 Strukturen auf der Basis der niedrigsten Gesamtenergie und der geringsten Zahl an Abstands- und Winkelverletzungen ausgewählt. Die Strukturen wurden so ausgewählt, dass keine systematischen Abstandsverletzungen um mehr als 0.2Å und keine systematischen Winkelverletzung um mehr als 15° beobachtet werden konnten. Anschließend wurde aus den 15 Strukturen eine gemittelte Struktur errechnet, welche die Strukturschar repräsentierte. Die Qualität der Struktur wurde anhand der Energien für die Geometrie und deren Standardabweichungen abgeschätzt. Die Mittelwerte der Energien und der Standardabweichung von der idealen Geometrie sind in Tabelle 20 zusammengefasst. Die Berechnung der mittleren Quadratwurzelabweichung von der gemittelten Struktur für das vollständige Proteinerückgrat aller 15 Strukturen ergab einen Wert von $> 5 \text{ \AA}$, was durch die hohe Flexibilität von „Loop“-Bereich und N-Terminus begründet ist. Wurden die flexiblen Regionen (Aminosäure 36-56, 79-113, 138-144) von der Berechnung ausgeschlossen, ergab sich eine mittlere Quadratwurzelabweichung von der gemittelten Struktur von $(0.63 \pm 0.09 \text{ \AA})$. Die Qualität der Hauptkettentorsionswinkelverteilung wurde mit dem Programm PROCHECK ermittelt (Laskowski, *et al.*, 1996). Die Φ -, Ψ -Winkelverteilung im Ramachandran-Diagramm zeigte für alle 15 Strukturen, dass die Torsionswinkel der Hauptkette für 69.3% der Aminosäuren in Bereichen liegen, die energetisch als besonders günstig klassifiziert sind, 27.2% in energetisch erlaubten Bereichen, 3.3% in energetisch noch erlaubten Bereichen und nur 0.3% in energetisch verbotenen Bereichen (siehe Abbildung 36).

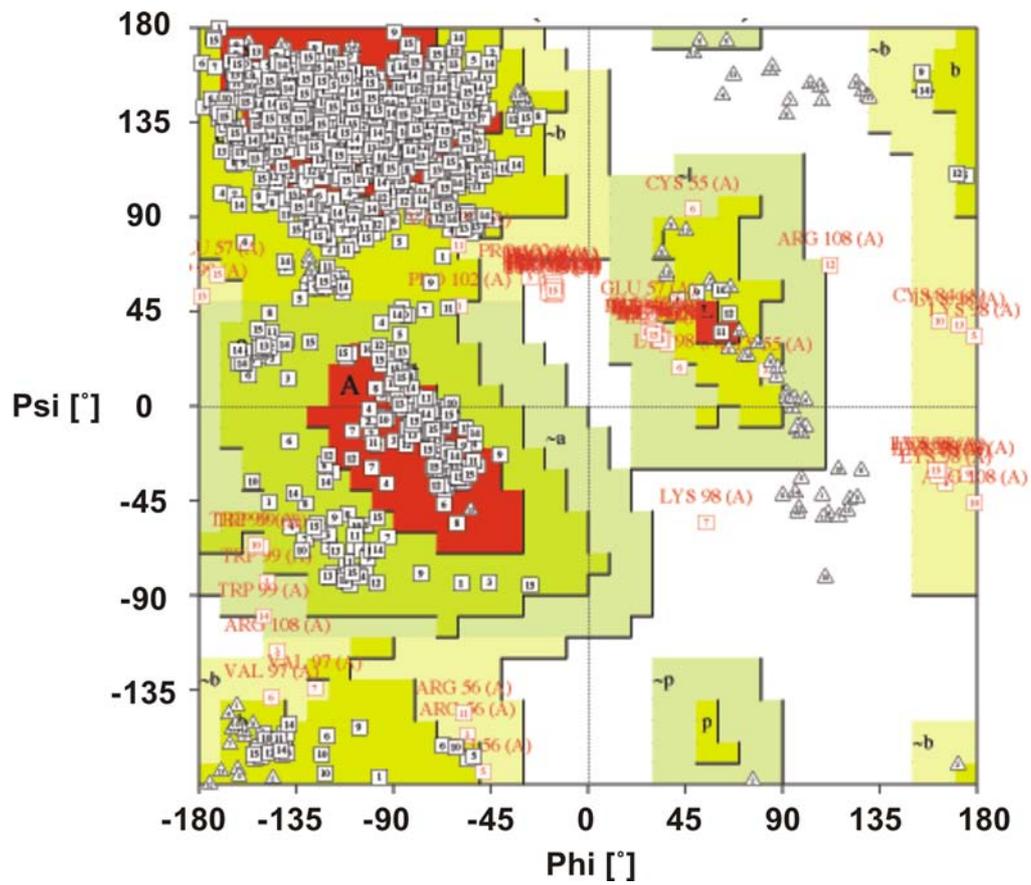


Abbildung 36: Ramachandran-Diagramm der Aminosäurereste aller 15 Strukturen von murinem Sclerostin- Δ NC

Ergebnisse

Struktur Statistik:	
R.M.S.D der experimentellen Distanzeinschränkungen (NOE) (Å)	0.022 ± 0.003
R.M.S.D der Winkeleinschränkungen (TALOS) (deg.)	5.676 ± 0.651

R.M.S.D von der idealen Geometrie:	
Bindungen (Å)	0.003 ± 0.0004
Winkel (deg.)	0.497 ± 0.033

Energien (kcal/mol) der 15 Strukturen:	
E _{NOE}	41.7 ± 10.0
E _{Bindung}	15.3 ± 4.1
E _{Winkel}	107.5 ± 14.6
E _{van-der-Waals}	38.8 ± 11.9
E _{Torsionswinkel}	34.6 ± 7.9

R.M.S.D der gemittelten Struktur (Å):	
Proteinrückgrat der Aminosäuren 57-78 und 114-138	0.63 ± 0.09
Nichtwasserstoffatome der Aminosäuren 57-78 und 114-138	1.17 ± 0.11
Proteinrückgrat der Aminosäuren 57-78 und 114-138 (für alle 100 Strukturen)	0.71 ± 0.17
Nichtwasserstoffatome der Aminosäuren 57-78 und 114-138 (für alle 100 Strukturen)	1.28 ± 0.17

Analyse mit PROCHECK:	
Aminosäuren in energetisch günstigen Regionen des Ramachandran-Diagramms (%)	69.3 (821)
Aminosäuren in energetisch erlaubten Regionen (%)	27.2 (322)
Aminosäuren in energetisch noch erlaubten Regionen (%)	3.3 (39)
Aminosäuren in energetisch verbotenen Regionen (%)	0.3 (3)

Tabelle 20: Statistische Daten der Strukturanalyse.

3.6.5 NMR-Struktur von murinem Sclerostin- Δ NC (Asn³⁶-Arg¹⁴⁴)

Die Strukturberechnung für murines Sclerostin- Δ NC ergab eine Struktur mit nur geringem globulären Charakter. Sie besteht aus drei Schleifen, die von dem zentralen Cystinknoten in zwei Richtungen ausgehen (siehe Abb. 37). Der Cystinknoten wird durch die Disulfidbrücken zwischen Cys⁵⁵-Cys¹⁰⁹, Cys⁸⁰-Cys¹⁴⁰, Cys⁸⁴-Cys¹⁴² gebildet (siehe Abb. 38 A). Zwei der Schleifen, Finger 1 (His⁵⁹-Leu⁷⁸) und Finger 2 (Asp¹¹²-Cys¹⁴⁰) verlaufen hierbei in eine Richtung und bilden jeweils ein antiparalleles β -Faltblatt. Die dritte Schleife, hier als „Loop“ bezeichnet (Gly⁸⁵-Phe¹⁰⁷), verläuft in die entgegengesetzte Richtung und weist keine reguläre Sekundärstruktur auf.

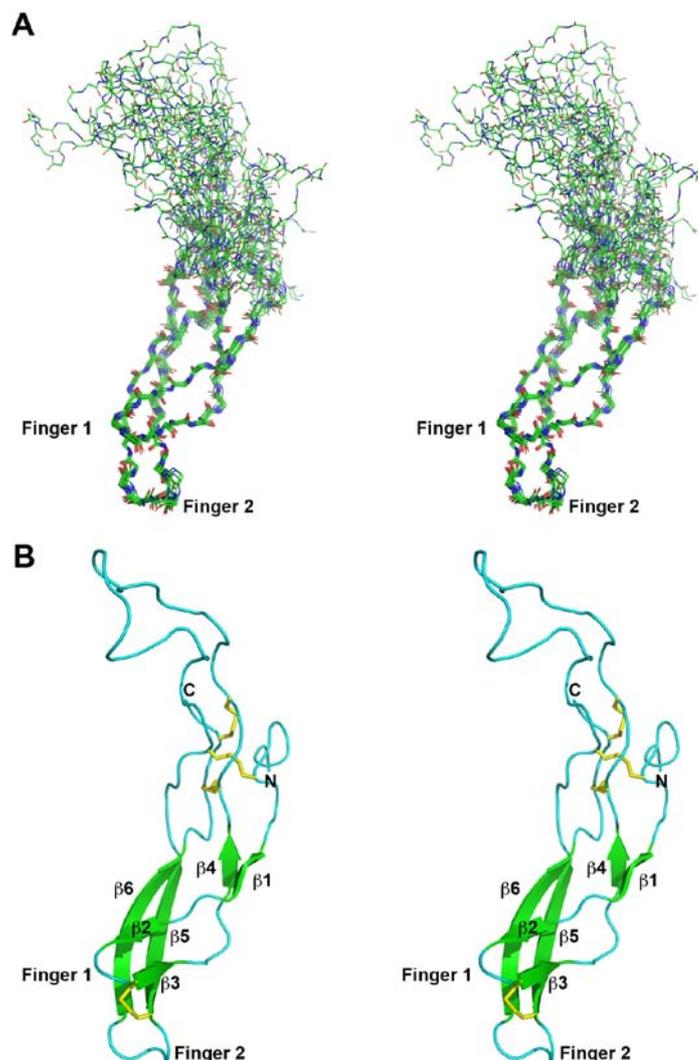
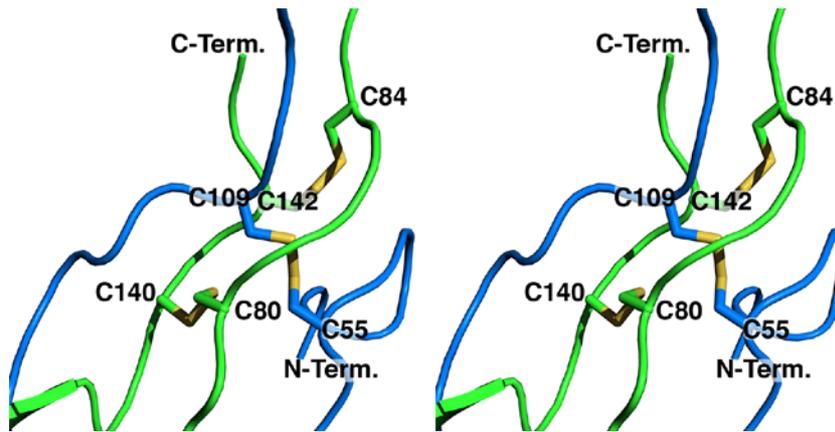
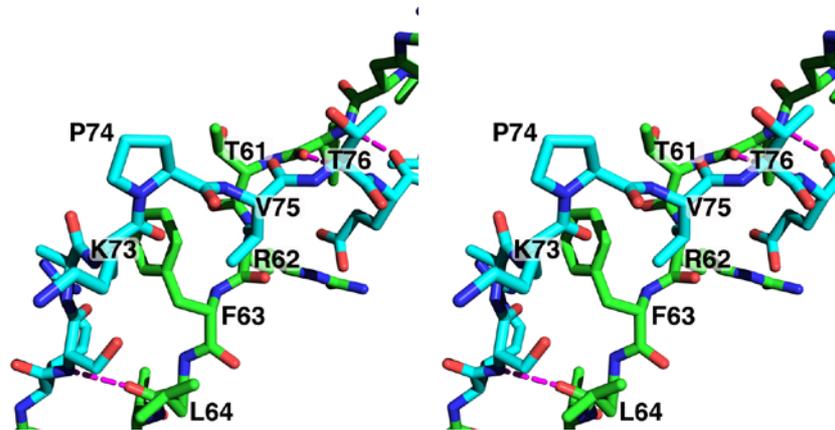


Abbildung 37: A) Stereoansicht der Strukturschar von murinem Sclerostin- Δ NC aus 15 Strukturen (nur Hauptkettenatome ohne Protonen). B) Stereoansicht der Bänderdarstellung mit Sekundärstrukturelementen der NMR-Struktur von murinem Sclerostin- Δ NC: β -Faltblattbereiche sind als Pfeile dargestellt. Die Disulfidbrücken sind als Linien in gelb dargestellt. Alle Strukturbilder wurden mit dem Programm PyMOL erstellt (DeLano, 2002).

A



B



C

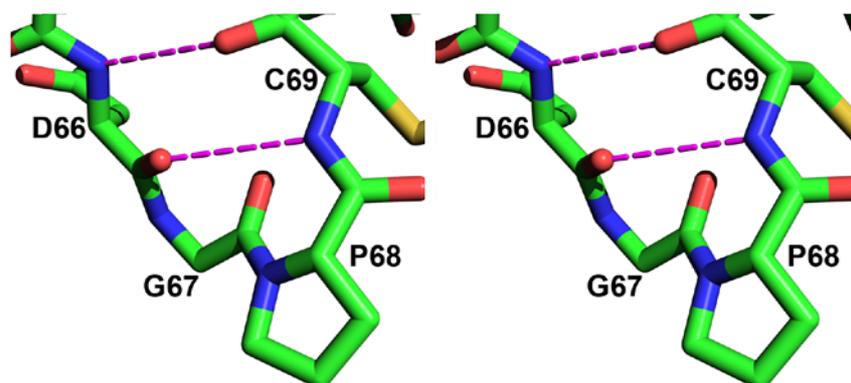


Abbildung 38: (Stereoansicht) A) Schematische Darstellung des Cystinknotens von murinem Sclerostin. B) Vergrößerte Darstellung des Bereiches um Pro⁷⁴ des ersten Fingers. Pro⁷⁴ ist für das Überkreuzen der Stränge in Finger 1 verantwortlich. C) Abbildung der β -Schleife von Finger 1.

Finger 1 enthält zwei kurze β -Faltblattbereiche (Abb. 37 B), der erste Abschnitt besteht aus Strang β_1 (His⁵⁹-Tyr⁶⁰) der antiparallel zu Strang β_4 (Glu⁷⁷-Leu⁷⁸) verläuft. Der zweite Abschnitt befindet sich in der Spitze von Finger 1 und besteht aus den antiparallelen Strängen β_2 (Thr⁶⁵-Asp⁶⁶) und β_3 (Cys⁶⁹-Arg⁷⁰). Zwischen diesen kurzen β -Faltblattbereichen liegt Pro⁷⁴, welches einerseits dafür verantwortlich ist, dass der reguläre Verlauf des β -Faltblatts unterbrochen wird und andererseits einen Knick des Proteinrückgrates induziert, der dazu führt, dass sich beide Stränge von Finger 1 kreuzen (Abb. 38 B). Beide Stränge des ersten Fingers werden in der Fingerspitze durch eine β -Schleife verbunden, die durch zwei Wasserstoffbrücken zwischen Carbonylsauerstoff und Amidprotonen der Reste Asp⁶⁶ und Cys⁶⁹ stabilisiert wird (Abb. 38 C). Finger 2 enthält ein langes antiparalleles β -Faltblatt bestehend aus den Strängen β_5 (Arg¹¹³-Cys¹²³) und β_6 (Arg¹³⁰-Ser¹³⁹). Der Bereich zwischen beiden Fingern besteht aus hydrophoben Resten (Leu⁷⁸, Val⁷⁵, Leu⁶⁴, Ser⁷¹, Leu¹²¹, Val¹¹⁹, Val¹³⁴, Gln¹¹⁷, Leu¹³⁶, Val¹³⁷), deren hydrophobe Wechselwirkungen Finger 1 und 2 stabilisieren (Abb. 39).

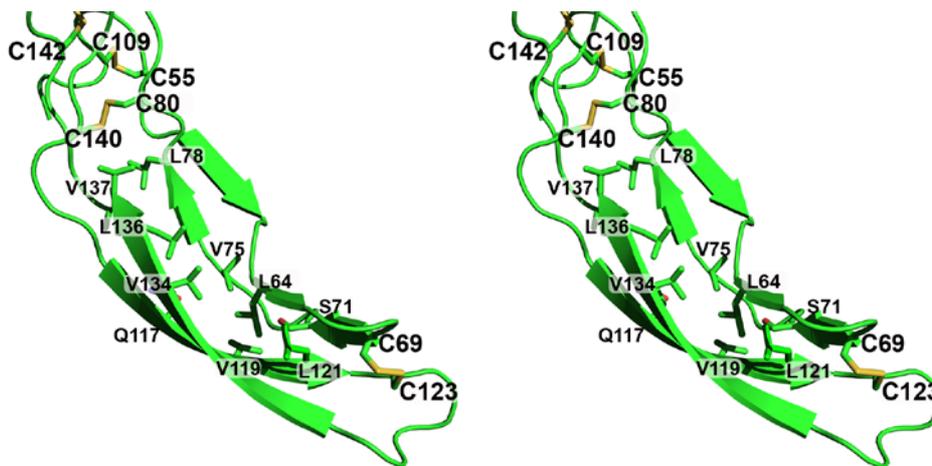


Abbildung 39: (Stereoansicht) Hydrophober Bereich zwischen Finger 1 und Finger 2 von murinem Sclerostin- Δ NC.

In dieser Region können keine polaren Interaktionen zwischen dem Proteinrückgrat beider Finger beobachtet werden. In den Fingerspitzen werden die beiden Finger durch die zusätzliche Disulfidbrücke zwischen Cys⁶⁹ (β -Strang 3) und Cys¹²³ (β -Strang 5) verbunden und somit fixiert. Dieser Bereich wird zusätzlich durch zwei Wasserstoffbrücken zwischen den Carbonylsauerstoffen und den Amidprotonen von Arg⁷⁰ und Leu¹²² stabilisiert. Hier

Ergebnisse

überkreuzen sich die Fingerspitzen, was durch hydrophobe Wechselwirkungen der Aminosäuren Leu¹²¹ und Leu⁶⁴ und den aliphatischen Bereichen der Seitenketten von Arg¹³² und Ser⁷¹ stabilisiert wird (Abb. 40).

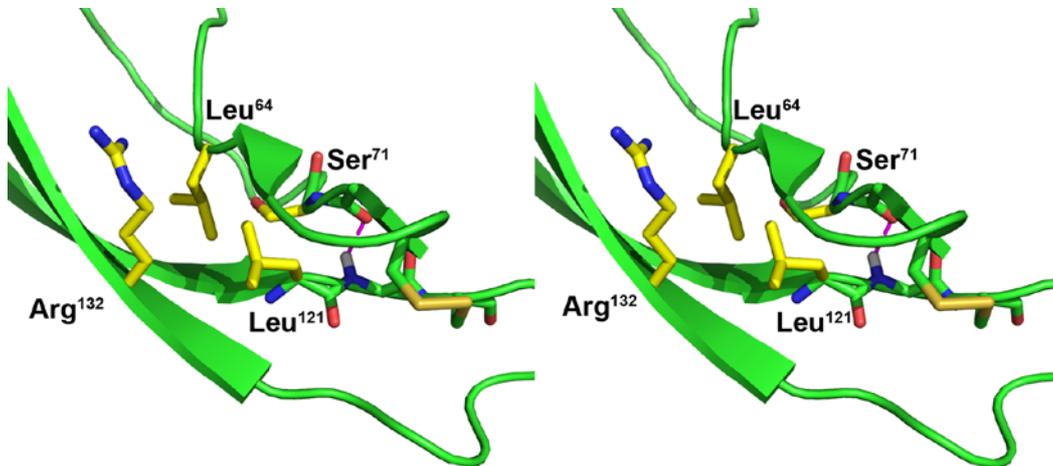


Abbildung 40: Stereoansicht des hydrophoben Bereichs, der durch das Überkreuzen der Finger entsteht.

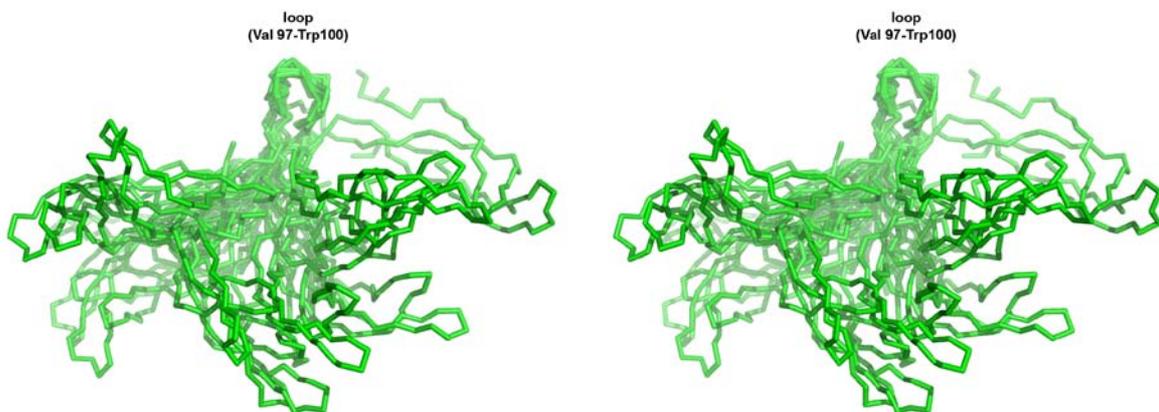


Abbildung 41: (Stereoansicht) Überlagerung der 15 Strukturen im Schleifenbereich „Loop“ (Val⁹⁷-Trp¹⁰⁰) von murinem Sclerostin- Δ NC.

Abbildung 37 A und Abbildung 41 verdeutlichen, dass große Bereiche des Proteins flexibel zu sein scheinen. Hierzu zählen der N-Terminus (Asn³⁶-Cys⁵⁵), die zweite, „Loop“ genannte, Schleife und der Bereich des Cystinknotens. Die Aminosäuren des Cystinknotens und der näheren Umgebung zeigen Kreuzsignale mit relativ großer Linienbreite. Außerdem konnten

in diesem Bereich nur wenige „Medium-range“- und „Long-range“-NOE-Kreuzsignale identifiziert werden. Außer den Cysteinresten sind alle Aminosäureseitenketten des Cystinknotens nach außen gerichtet. Es konnten weder Wasserstoffbrücken zwischen den Strängen, noch zwischen den Seitenketten im Cystinknoten identifiziert werden, die diesen Bereich stabilisieren können. Auch sind keine hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren des Cystinknotens möglich. Werden die 15 Strukturen in der Spitze des „Loop“-Bereichs (Asn⁹²-Trp¹⁰⁰) überlagert, so wird deutlich, dass eine partielle Ordnung im Schleifenbereich des „Loop“-Bereichs vorliegt (siehe Abb. 41). Diese entsteht durch die beiden Tryptophanreste Trp⁹⁹ und Trp¹⁰⁰ und weitere hydrophobe Aminosäuren in der direkten Nachbarschaft, die durch hydrophobe Wechselwirkungen die Flexibilität des „Loop“-Bereichs verringern.

In Abbildung 42 ist die Ladungsverteilung für murines Sclerostin- Δ NC dargestellt. Hierfür wurden die Aminosäuren in vier Gruppen unterteilt. Die negativ geladenen Aminosäuren Glu und Asp sind in rot, die positiv geladenen Aminosäuren Arg und Lys in blau, die ungeladenen, polaren Aminosäuren Ser, Thr, Asn und Gln in grün und die hydrophoben Aminosäuren Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Met, Phe, Tyr, Trp, His und Pro in grau gefärbt dargestellt. Für die verschiedenen Ansichten wurde die Struktur um jeweils 90° in der Y-Achse rotiert. Durch die 15 Argininreste und sechs Lysinreste weist murines Sclerostin- Δ NC eine positive Nettooberflächenladung auf. Die bei neutralem pH positiv geladenen Arginine und Lysine sind in murinem Sclerostin- Δ NC vor allem in Finger 2 (acht Arginine, zwei Lysine) und in der Spitze des „Loops“ (zwei Arginine, ein Lysin) konzentriert. Verglichen mit Finger 2 sind in Finger 1 eine geringere Anzahl positiv geladener Aminosäuren lokalisiert (drei Arginine, ein Lysin). Negativ geladene Aminosäuren (drei Glutamate, fünf Aspartate) sind hingegen vereinzelt über die Struktur verteilt.

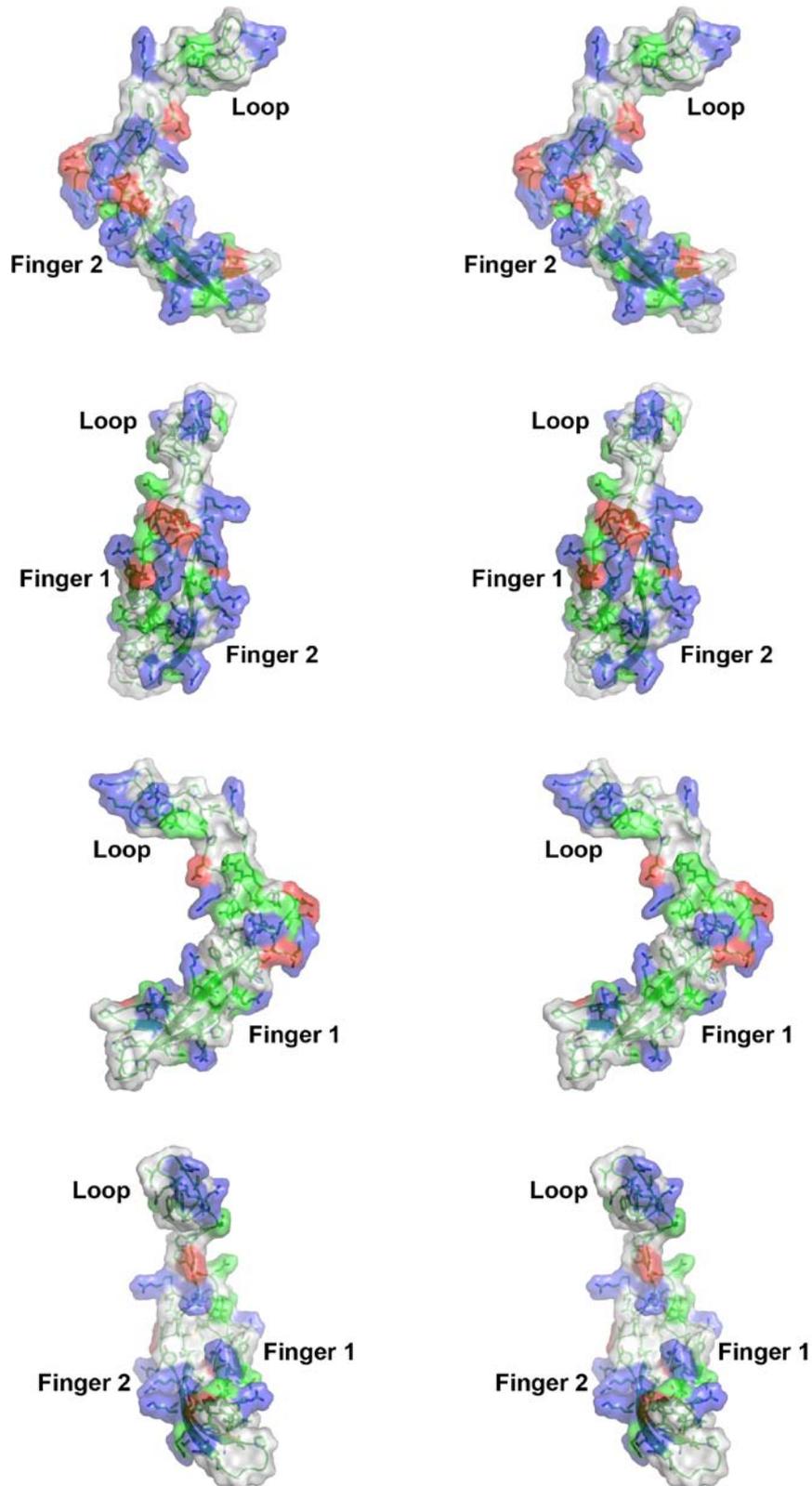


Abbildung 42: (Stereoansicht) Ladungsverteilung von murinem Sclerostin- Δ NC. Die Aminosäuren sind in 4 Klassen unterteilt. Rot: Asp, Glu. Blau: Arg, Lys. Grün: Ser, Thr, Gln, Asn. Grau: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Cys, Phe, Tyr, Trp, His, Pro. Die Struktur von murinem Sclerostin- Δ NC wurde für jede Darstellung jeweils um 90° um die Y-Achse gedreht.

3.6.6 $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ Hetero-NOE-Experiment

Um die Ursache für die ungeordneten Bereiche von murinem Sclerostin näher zu charakterisieren, wurde ein $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ Hetero-NOE-Experiment durchgeführt, welches eine Aussage über die Flexibilität der Proteinhauptkette erlaubt. Dabei wird die lokale Beweglichkeit des H-N Bindungsvektors jeder einzelnen Aminosäure durch die Bildung des $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ Hetero-NOEs analysiert. Für jede Aminosäure wird ein $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ Hetero-NOE-Wert zwischen -1 und +1 berechnet (siehe 2.13.10). Je niedriger dieser Wert ist, desto dynamischer ist der N-H-Bindungsvektor dieser Aminosäure. Mit Hilfe dieses Experiments sollte untersucht werden, ob der „Loop“-Bereich von murinem Sclerostin- ΔNC tatsächlich dynamisch ist oder der geringe Strukturierungsgrad auf eine unzureichende Identifizierung von NOE-Kreuzsignalen zurückzuführen ist. In Abbildung 43 A sind die Hetero-NOE-Werte der Aminosäuren von murinem Sclerostin- ΔNC gegen die Aminosäuresequenz aufgetragen. Für die Aminosäuren des N-Terminus und des „Loop“-Bereichs wurden niedrige $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ Hetero-NOE-Werte erhalten, während für Aminosäuren in den beiden Fingern Werte nahe 1 erhalten wurden. Dies belegt, dass der N-Terminus und der „Loop“-Bereich in der Tat flexibel und dynamisch sind. Zum Vergleich ist in Abbildung 43 B die mittlere Quadratwurzelabweichung (R.M.S.D.) der $\text{C}\alpha$ -Position der einzelnen Aminosäuren aller 15 Strukturen (überlagert im Bereich der beiden Finger: Leu⁵⁸-Leu⁷⁸, Arg¹¹³-Val¹³⁷) von der $\text{C}\alpha$ -Position der entsprechenden Aminosäure in der gemittelten Struktur gegen die Aminosäuresequenz aufgetragen. Die flexiblen Regionen von murinem Sclerostin- ΔNC , „Loop“-Bereich und N-Terminus, weisen niedrigere $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ Hetero-NOE-Werte auf und sind durch hohe R.M.S.D.-Werte gekennzeichnet. Abbildung 43 C zeigt den „Sausage-Plot“ der gemittelten Struktur von murinem Sclerostin- ΔNC . Flexible Bereiche, die eine hohe geometrische Abweichung von der gemittelten Struktur aufweisen erscheinen hier rot, strukturierte Bereiche sind blau dargestellt.

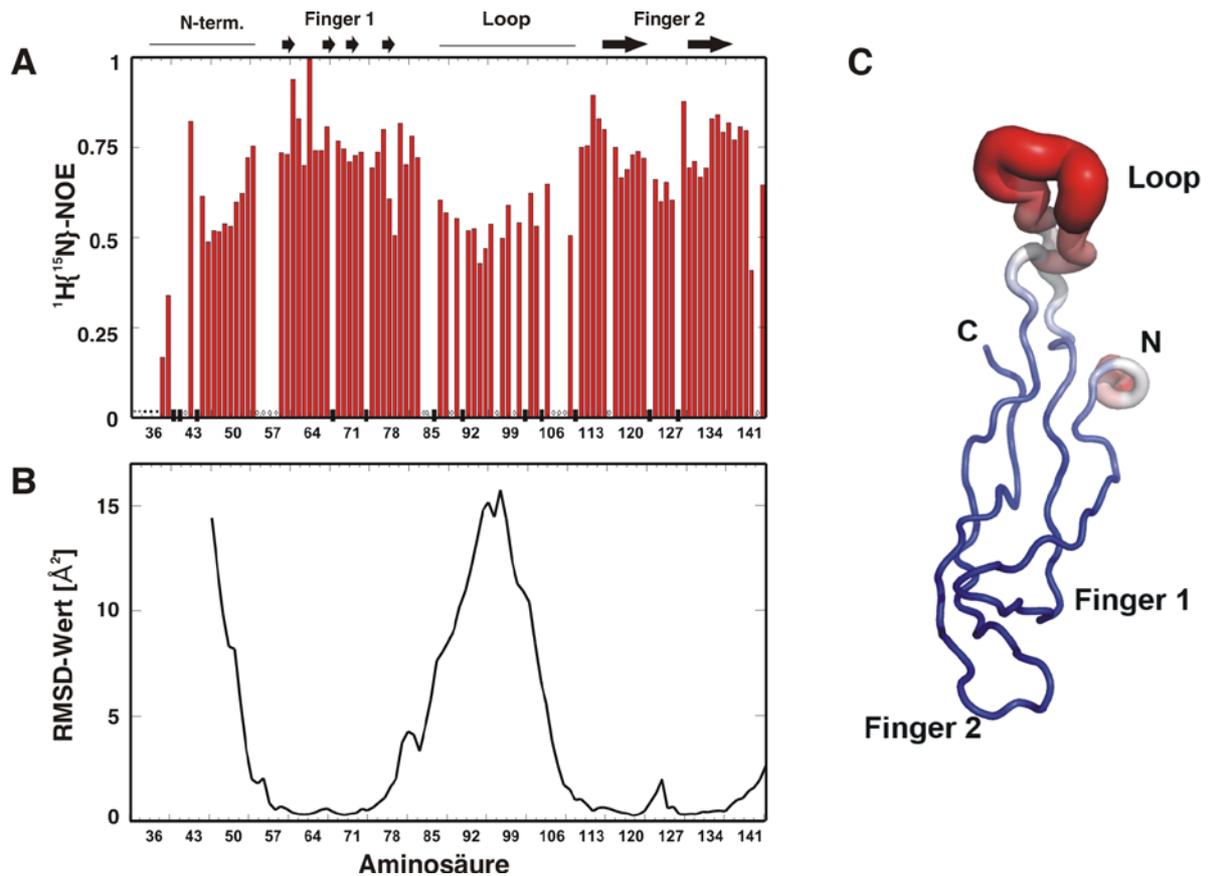


Abbildung 43: A) $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ Hetero-NOE-Experiment. (Schwarzer Balken: steht für die Aminosäure Prolin in der Aminosäuresequenz, *: Signale dieser Aminosäuren waren nicht auswertbar, Raute: Für diese Aminosäuren war der $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ Hetero-NOE nicht auswertbar, da aufgrund von Überlappung von Signalen, die Integration einzelner Signale nicht durchführbar war.) B) Darstellung der mittleren Quadratwurzelabweichung der $\text{C}\alpha$ -Position der einzelnen Aminosäuren aller 15 Strukturen (überlagert im Bereich der beiden Finger: Leu⁵⁸-Leu⁷⁸, Arg¹¹³-Val¹³⁷) von der $\text{C}\alpha$ -Position der Aminosäure in der gemittelten Struktur. C) „Sausage Plot“-Darstellung der gemittelten Struktur von murinem Sclerostin- Δ NC. In der Bänderdarstellung von murinem Sclerostin- Δ NC (Aminosäure 48-144) sind die aus den R.M.S.D.-Werten berechneten Temperaturfaktoren graphisch dargestellt. Die Farbe blau steht für einen niedrigen Temperaturfaktor und kennzeichnet Regionen mit hoher Rigidität, die Farbe Rot steht für einen hohen Temperaturfaktor und kennzeichnet flexible und dynamische Regionen. Der Durchmesser der Bänderdarstellung korreliert mit der Flexibilität.

3.7 Anti-Sclerostin Fab-Fragmente

In Kooperation mit der Firma AbD-Serotec entstanden acht Anti-Sclerostin Fab-Fragmente. „Phage Display“-Selektion, Expression und Aufreinigung der Fab-Fragmente wurden von der Firma AbD-Serotec durchgeführt. Für die „Phage Display“-Selektion wurde dem Unternehmen humanes und murines Sclerostin aus *Sf9*-Zellkultur zur Verfügung gestellt.

Für die Selektion der Fab-Fragmente gegen rekombinantes humanes und murines Sclerostin wurde die HuCAL GOLDTM Antikörperbibliothek von MorphoSys verwendet (Knappik, *et al.*, 2000, Rothe, *et al.*, 2008). Die Antigen-Proteine wurden biotinyliert (EZ-link Sulfo-NHS-LC-Biotin, Pierce) und Antigen-bindende Fab-Fragmente wurden in einem so genannten „solution panning“ angereichert (Steidl, *et al.*, 2008). Nach drei Runden einer derartigen Selektion mittels „Phage Display“ wurden die cDNAs der Sclerostin bindenden Fab-Fragmente in einen Expressionsvektor umklontiert, der eine Herstellung der Fab-Fragmente in *E.coli*-Bakterien erlaubt. Die Fab-Fragmente weisen am C-Terminus der Fd-Kette eine Thrombin-Schnittstelle und einen Myc-His₆-Affinitätstag auf. Von jeder Antikörperselektion wurden 368 Klone im ELISA auf Bindung an humanes und murines Sclerostin getestet. Sclerostin bindende Fab-Fragmente wurden in *E.coli*-Bakterien exprimiert und durch Affinitätschromatographie aufgereinigt.

3.7.1 Charakterisierung der Fab-Fragmente mittels Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie

Die Bindungsparameter der Fab-Fragment-Bindung an humanes und murines Sclerostin wurden mittels Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie analysiert. Hierfür wurden die Fab-Fragmente zunächst biotinyliert und anschließend an die mit Streptavidin beladenen Kanäle des Sensor Chips gekoppelt (siehe 2.5.5, 2.12). Die an der Chipoberfläche immobilisierten Fab-Fragmente wurden mit steigenden Konzentrationen (5nM, 10nM, 15nM, 20nM, 30nM 40nM) von murinem und humanem Sclerostin, sowie den Trunktionsvarianten murines Sclerostin- Δ C und murines Sclerostin- Δ NC in HBS150-Puffer perfundiert. Die Parameter der Interaktion wurden, wie in Kapitel 2.12 beschrieben, berechnet und sind in Tabelle 21 dargestellt. Die Affinitäten der Bindung aller Fab-Fragmente an die verschiedenen Sclerostinvarianten liegen im niedrigen nanomolaren Bereich.

Ergebnisse

Das Fab-Fragment AbD09094 bindet speziesspezifisch an murines Sclerostin, alle anderen Fab-Fragmente binden sowohl humanes als auch murines Protein. Die geringe Zahl speziesspezifischer Fab-Fragmente, die in der Selektion erhalten wurden, können durch die geringen Sequenzunterschiede von humanem und murinem Sclerostin erklärt werden (siehe Abb. 44). Die meisten Fab-Fragmente, die gegen humanes Sclerostin selektiert wurden, binden mit etwa zweifach niedrigerer Affinität auch murines Sclerostin. Alle Fab-Fragmente binden zudem die Trunktationsvarianten murines Sclerostin- Δ C und murines Sclerostin- Δ NC mit Bindungsaffinitäten, die mit der Bindung an wildtypisches murines Sclerostin vergleichbar sind. Dies spricht dafür, dass die Bindeepitope aller Fab-Fragmente im Aminosäuresequenzbereich zwischen Asn³⁶ und Arg¹⁴⁴ von murinem Sclerostin lokalisiert sind.

```
1 EGQGWQAFKNDATEIIP ELGEYEP EPPPEL ENNKTMNRAENGGRPPHHPFETKDVSEYSCREL 62
1 EGQGWQAFRNDATEEVIPIGLGEYEP EPPPE--ENNQTMNRAENGGRPPHHPYDAKGVSEYSCREL 60

63 HFTRYVTDGPCRS AKPVTELVCSGQC GPARRLLPNAIGRGKWWRPSCPDFRCIPDRYRAQRVQ 124
61 HYTRFLT DGPCRS AKPVTELVCSGQC GPARRLLPNAIGRVKWWRPNGPDFRCIPDRYRAQRVQ 122

125 LLCPGGEAPRARKVRLVASCKCKRLTRFHNQSELKDFGT EAARPQKGRKPRPRARS AKANQA 186
123 LLCPGGAAPRSRKVRLVASCKCKRLTRFHNQSELKDFGPE TARPQKGRKPRPGARGAKANQA 184

187 ELENAY 192
185 ELENAY 190
```

Abbildung 44: Aminosäuresequenzvergleich von humanem (oben) und murinem (unten) Sclerostin. Der Vergleich wurde mit der Programm Clustal W Software des EMBL European Bioinformatik Institut erstellt (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

Fab-Fragment	Antigen	murines Sclerostin			
		$k_a [10^5 M^{-1} s^{-1}]$	$k_d [10^{-3} s^{-1}]$	$K_{D(kin)} [nM]$	$K_{D(eq)} [nM]$
AbD09094	mSclerostin	6.2±7	3.7±0.8	6.0	28.0
AbD09095	mSclerostin	16.7±3	1.9±0.4	1.1	3.3
AbD09096	mSclerostin	9.0±1	0.2±0.05	0.2	-
AbD09097	mSclerostin	6.0±0.6	0.5±0.1	0.9	-
AbD09098	hSclerostin	23.3±5	11.7±0.8	5.0	11.5
AbD09099	hSclerostin	21.0±6	6.3±0.3	3.0	10.8
AbD09100	hSclerostin	64.1±21	21.4±4	3.4	3.9
AbD09101	hSclerostin	10.4±5	7.05±1	6.8	10.5
Fab-Fragment	Antigen	humanes Sclerostin			
		$k_a [10^5 M^{-1} s^{-1}]$	$k_d [10^{-3} s^{-1}]$	$K_{D(kin)} [nM]$	$K_{D(eq)} [nM]$
AbD09094	mSclerostin	-	-	-	-
AbD09095	mSclerostin	4.1±3	25.8±3	87.6	77.8
AbD09096	mSclerostin	10.5±3	0.6±0.1	1.5	-
AbD09097	mSclerostin	6.8±0.6	1.4±0.06	2.0	-
AbD09098	hSclerostin	9.9±5	6.2±0.7	6.3	3.8
AbD09099	hSclerostin	9.2±2	6.3±0.5	6.9	8.9
AbD09100	hSclerostin	51.2±10	9.3±2	1.8	1.9
AbD09101	hSclerostin	8.3±2	0.1±0.05	0.1	4.5
Fab-Fragment	Antigen	murines Sclerostin-ΔC			
		$k_a [10^5 M^{-1} s^{-1}]$	$k_d [10^{-3} s^{-1}]$	$K_{D(kin)} [nM]$	$K_{D(eq)} [nM]$
AbD09094	mSclerostin	4.6±1	3.7±0.9	22.8	35.2
AbD09095	mSclerostin	17.2±5	1.8±0.3	1.0	1.8
AbD09096	mSclerostin	12.4±0.2	0.3±0.1	0.2	-
AbD09097	mSclerostin		< 0.1	< 0.1	-
AbD09098	hSclerostin	23.0±4	19.2±3	8.4	9.5
AbD09099	hSclerostin	15.7±6	9.3±0.6	5.9	8.0
AbD09100	hSclerostin	58.8±30	19.3±4	3.3	5.7
AbD09101	hSclerostin	10.7±5	7.0±1	6.5	13.7
Fab-Fragment	Antigen	murines Sclerostin-ΔNC			
		$k_a [10^5 M^{-1} s^{-1}]$	$k_d [10^{-3} s^{-1}]$	$K_{D(kin)} [nM]$	$K_{D(eq)} [nM]$
AbD09094	mSclerostin	4.2±2	4.2±0.4	15.8	58.8
AbD09095	mSclerostin	18.2±7	1.6±0.2	0.9	2.5
AbD09096	mSclerostin	14.4±3	0.2±0.1	0.2	-
AbD09097	mSclerostin	18.2±5	1.1±0.2	0.6	-
AbD09098	hSclerostin	22.2±12	13.7±2	6.2	7.7
AbD09099	hSclerostin	15.3±6	6.0±0.7	3.9	6.8
AbD09100	hSclerostin	81.3±40	15.8±2	1.9	4.0
AbD09101	hSclerostin	18.0±5	5.9±2	3.2	7.4

Tabelle 21: Daten der Interaktion der einzelnen Fab-Fragmente mit den verschiedenen Sclerostinvarianten. Die Spalte „Antigen“ enthält die Sclerostinvariante murines (m) Sclerostin und humanes (h) Sclerostin, die für das jeweilige Fab-Fragment als Antigen verwendet wurde.

3.7.2 Charakterisierung der Fab-Fragmente mittels Wnt-Reporterge- Nachweisverfahren

Um Hinweise auf den Aminosäuresequenzbereich von Sclerostin zu erhalten, der für die Inhibition des Wnt-Signalwegs verantwortlich ist, wurden die Fab-Fragmente in einem Wnt-Reporterge-Nachweisverfahren auf ihren Einfluss auf die Wnt-inhibitorische Wirkung von Sclerostin getestet. Fab-Fragmente, welche die Inhibition des Wnt-Signalwegs durch Sclerostin neutralisieren, binden im selben Aminosäuresequenzbereich von Sclerostin, der für die Interaktion zwischen Sclerostin und LRP5/6, benötigt wird. Kann durch andere Verfahren das Bindeepitop von Sclerostin an das neutralisierende Fab-Fragment bestimmt werden, so ist dies ein erster Hinweis auf die Aminosäuren von Sclerostin, die an der direkten Interaktion von Sclerostin und LRP5/6 beteiligt sind.

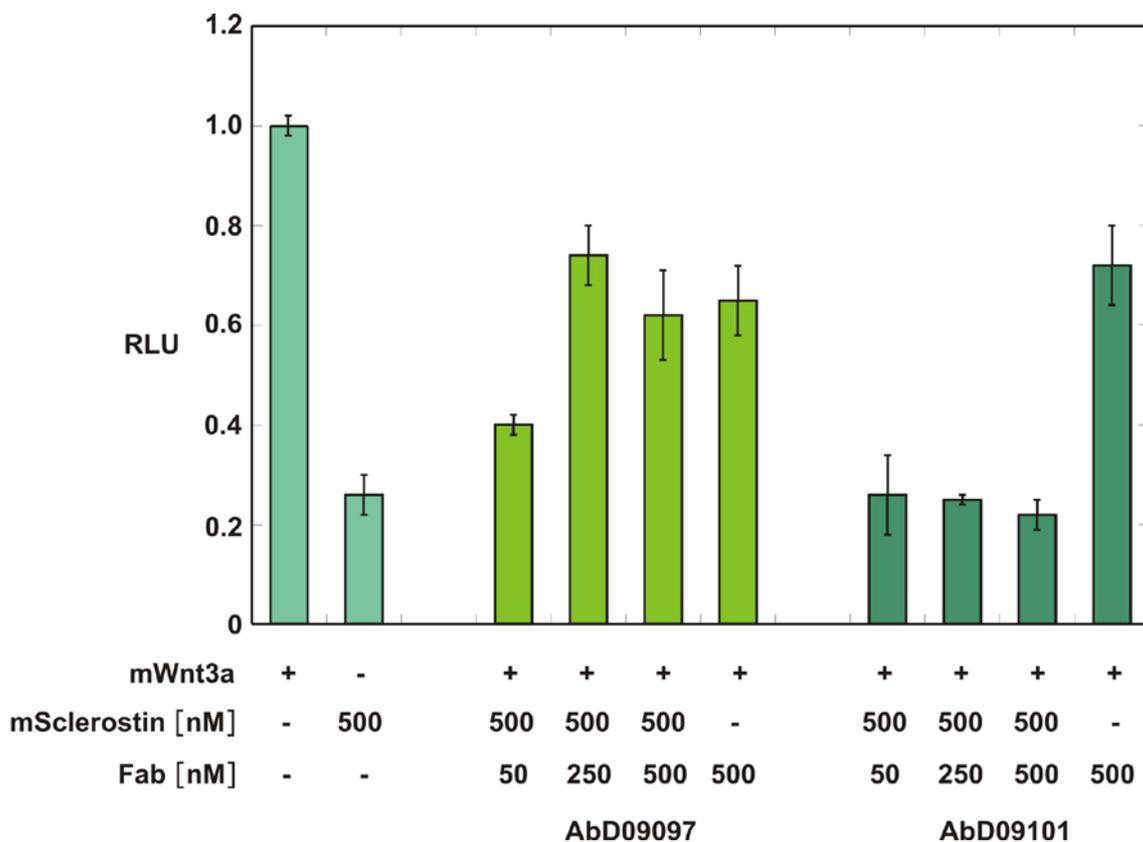


Abbildung 45: Wnt-Reporterge-Nachweisverfahren für die Fab-Fragmente AbD09097 und AbD09101 der Firma AbD-Serotec. AbD09097 neutralisiert die Inhibition durch Sclerostin dosisabhängig, AbD09101 zeigt hingegen keinen Einfluss auf die Inhibition des Wnt-Signalwegs durch Sclerostin.

Das Wnt-Reportergen-Nachweisverfahren wurde, wie in Kapitel 2.11.6 beschrieben, durchgeführt. 500nM Sclerostin wurde mit steigenden Konzentrationen des jeweiligen Fab-Fragments gemischt, für 15min inkubiert und zu den SuperTopFlash8x-transfizierten HEK293T-Zellen gegeben. Abbildung 45 zeigt das Balkendiagramm des Wnt-Reportergen-Nachweisverfahrens für die beiden Fab-Fragmente AbD09097 und AbD09101. Das Fab-Fragment AbD09101 zeigt keinerlei Einfluss auf die Inhibition des Signalwegs durch Sclerostin, selbst in höheren Konzentrationen nicht. Das Fab-Fragment AbD09097 hingegen neutralisiert die Inhibition des Wnt-Signalwegs durch Sclerostin dosisabhängig. Bereits ein 1:10 stöchiometrisches Verhältnis von AbD09097 und Sclerostin zeigt eine Abschwächung des inhibitorischen Effekts von Sclerostin.

3.7.3 Bestimmung des Bindeepitops von Sclerostin an AbD09097 mittels NMR-Spektroskopie

Um die Aminosäuren von Sclerostin zu identifizieren, die an der Bindung von Sclerostin an das Fab-Fragment AbD09097 beteiligt sind, wurden $^1\text{H}^{15}\text{N}$ 2D-HSQC-Spektren von uniform ^{15}N -markiertem freien Sclerostin- ΔNC und ^{15}N -markiertem Sclerostin- ΔNC im Komplex mit dem Fab-Fragment AbD09097 (stöchiometrisches Verhältnis 1:1) verglichen. Da die Lage der $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Kreuzsignale im Spektrum von der chemischen Umgebung der Aminosäuren abhängt, führt die Komplexbildung zu Änderungen in der chemischen Umgebung der an der Bindung beteiligten Aminosäuren und damit zu einer Änderung der chemischen Verschiebungen der Signale dieser Aminosäuren. Abbildung 46 zeigt die Überlagerung beider $^1\text{H}^{15}\text{N}$ 2D-HSQC-Spektren (murines Sclerostin- ΔNC in grün, Komplex aus murinem Sclerostin- ΔNC und AbD09097 in rot). Die Bindung des Fab-Fragments beeinflusste die Lage der $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Kreuzsignale von Sclerostin auf unterschiedliche Weise. Die $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Kreuzsignale einiger Aminosäuren traten bei stark veränderten chemischen Verschiebungen auf (Ser⁵⁴, Leu⁵⁸, His⁵⁹, Cys⁸⁰, Trp⁹⁹, Arg¹⁰¹, Asp¹⁰⁶, Lys¹⁴³, Arg¹⁴⁴), andere Signale bei nur schwach veränderten chemischen Verschiebungen (Glu⁵², Tyr⁶⁰, Leu⁷⁸, Gly⁸², Gln⁸³, Asn⁹², Ala⁹³, Gly⁹⁵, Arg⁹⁶, Val⁹⁷, Lys⁹⁸, Trp⁹⁹(E1), Trp¹⁰⁰(E1), Trp¹⁰⁰, Asn¹⁰³, Gly¹⁰⁴, Gln¹¹⁷, Ser¹³⁹) und wieder andere Signale änderten nicht die chemische Verschiebung, sondern die Signale verloren durch die Linienverbreiterung an Intensität (Cys⁵⁵, Ser⁸¹, Ile⁹⁴, Val¹³⁷, Ala¹³⁸). In Abbildung 47 A sind diejenigen Aminosäuren durch Balken gekennzeichnet, deren Amidproton-Amidstickstoff-Kreuzsignale durch die Fab-Fragment-Bindung die chemischen

Ergebnisse

Verschiebungen änderten. Es wird deutlich, dass die betroffenen Aminosäuren vor allem im flexiblen „Loop“-Bereich angesiedelt sind (Leu⁹⁰-Asp¹⁰⁶). Zudem scheinen auch die Aminosäuren in der unmittelbaren Umgebung des Cystinknotens von der Bindung des Fab-Fragments beeinflusst zu werden. Die Position der betroffenen Aminosäuren in der Struktur ist in Abbildung 47 B, C dargestellt. Die hier genannten Ergebnisse basierend auf NMR-Titrationsexperimenten stimmen gut mit den Resultaten aus „Peptide-mapping“-Studien der Firma Pepscan überein. Durch das „Peptid-mapping“-Verfahren identifizierte die Firma Pepscan zwei lineare Bindeepitope in der Aminosäuresequenz von humanem Sclerostin für die Bindung des Fab-Fragments AbD09097. Die erste Region umfasst den Bereich um den ersten Cysteinrest Glu⁵²-Tyr⁶⁰ (in murinem Sclerostin), die zweite Region den flexiblen „Loop“-Bereich Arg⁹⁶-Trp⁹⁹ (minimales Epitop, murines Sclerostin). Beide Bereiche konnten durch die hier vorgestellte NMR-Bindungsstudie bestätigt werden.

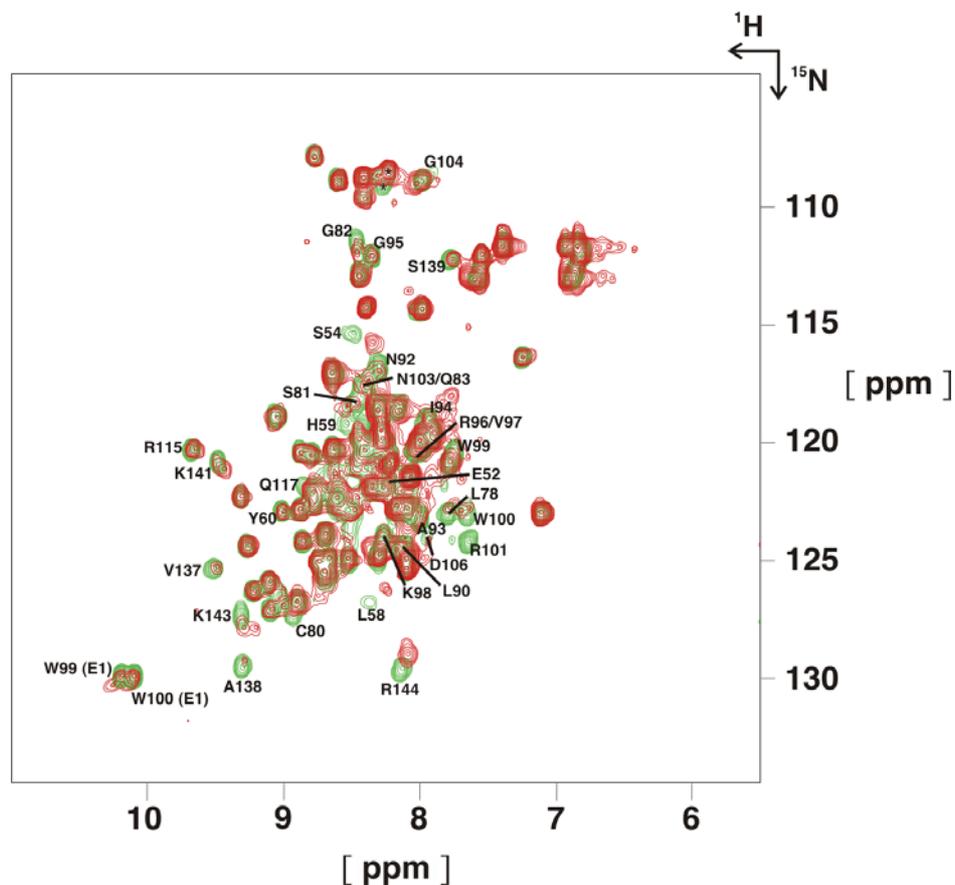


Abbildung 46: Überlagerung der beiden ¹H¹⁵N 2D-HSQC-Spektren von isoliertem murinem (grün) und ¹⁵N-markiertem Sclerostin-ΔNC im Komplex mit dem Fab-Fragment AbD09097 (rot). Die Amidstickstoff-Amidproton-Kreuzsignale der Aminosäuren, deren Positionen sich im Spektrum durch Bindung des Fab-Fragments geändert haben, sind beschriftet. *) siehe Abbildung 32.

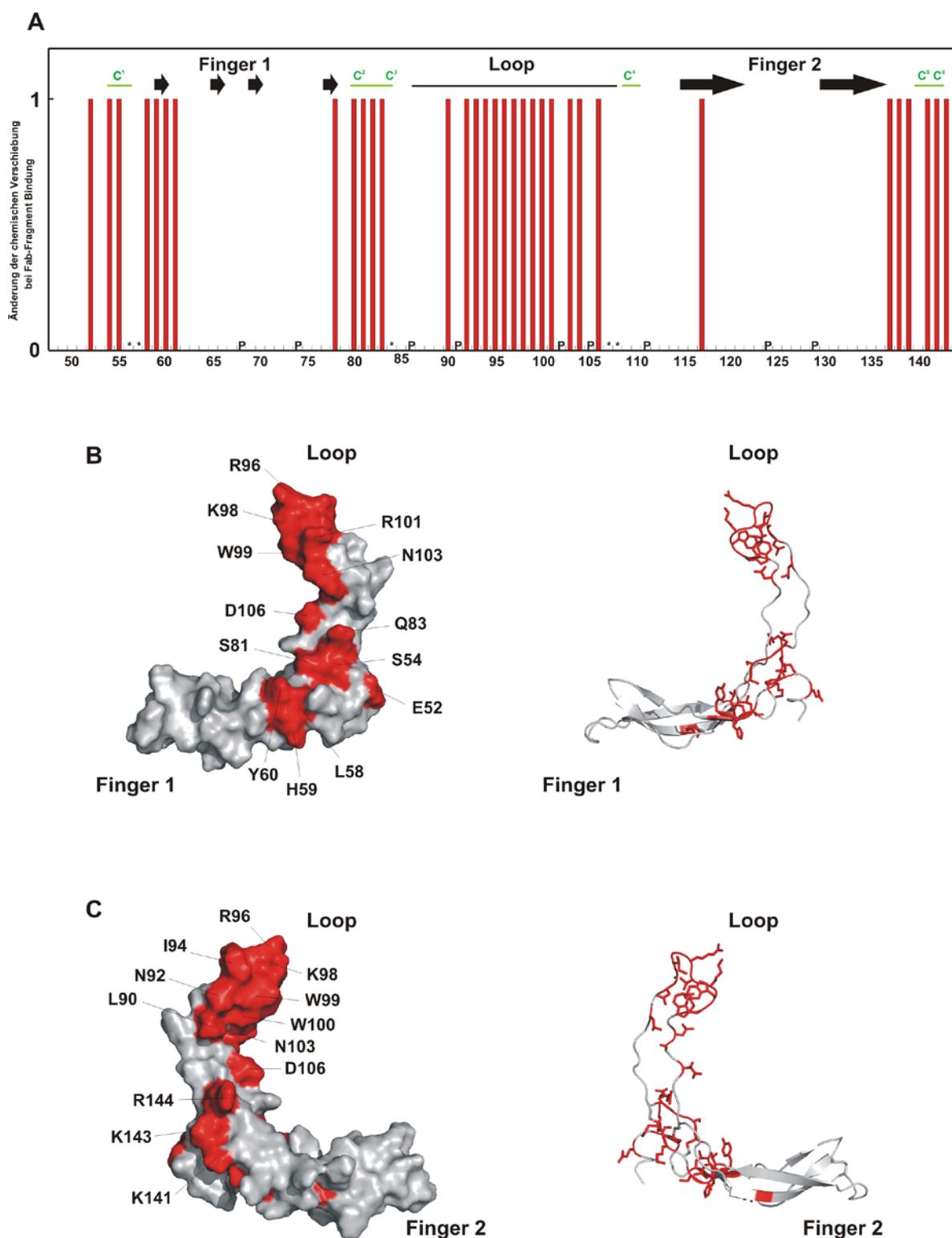


Abbildung 47: A) Darstellung der durch die Bindung des Fab-Fragments AbD09097 beeinflussten $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Kreuzsignale aufgetragen gegen die Aminosäuresequenz von murinem Sclerostin. *) Aminosäuren, denen kein Signal im $^1\text{H}^{15}\text{N}$ 2D-HSQC-Spektrum zugeordnet werden konnte. P) steht für die Aminosäure Prolin. B) Darstellung der Van-der-Waals-Oberfläche und Bänderdarstellung von Sclerostin. Die durch die Bindung des Fab-Fragments AbD09097 beeinflussten Aminosäurereste sind in rot hervorgehoben. C) Darstellung der Van-der-Waals-Oberfläche und Bänderdarstellung des um 90° um die Y-Achse rotierten Moleküls.

4 Diskussion

4.1 Methodische Strategien

4.1.1 Expression von Sclerostin in *Sf9*-Insektenzellen

Eine Grundvoraussetzung für die strukturelle und funktionelle Charakterisierung von Sclerostin ist zunächst die Expression und Aufreinigung von biologisch aktivem Protein. Sclerostin ist ein extrazellulär lokalisiertes Protein mit Disulfidbrücken, welches nur in Eukaryonten vorkommt. Daher sollte Sclerostin zunächst in einem heterologen, Säugerzellsystem-ähnlichen Expressionssystem exprimiert werden, welches den Transport durch das sekretorische System unterstützt und mögliche posttranslationale Modifikationen anfügt.

Ein möglicher Ansatz wäre die Expression von Sclerostin in Säugerzellen selbst (z.B. HEK293T-Zellen), beispielsweise durch die transiente Transfektion eines Expressionsplasmids oder die Herstellung einer stabilen Zelllinie. Diese Methode erfordert jedoch eine aufwendige, für größere Proteinmengen schwierig skalierbare Zellkultur und große Mengen an Plasmid-DNA. Das *Sf9*-Insektenzell-Expressionssystem bietet durch seine Vorzüge (einfache Vermehrung der Zellen, einfache Herstellung des Virus für die Expression, Expression durch Virusinfektion der Zellen, leichte Amplifikation des Virus, hoher Durchsatz) eine bessere Alternative für die heterologe Expression von Sclerostin im Großmaßstab. Dieses Expressionssystem lieferte aktives Protein, in 0.2-1mg Mengen pro Liter Zellkultur. Die Aktivität konnte durch verschiedene biologische Nachweisverfahren belegt werden (siehe 3.4).

Verglichen mit anderen, in diesem Expressionssystem exprimierten Proteinen, wie z.B. DRAGON (8-10mg/l Zellkulturüberstand, Tina Hellmann persönliche Mitteilung) konnten für Sclerostin nur niedrige Ausbeuten (0.2–1mg/l Zellkulturüberstand) erhalten werden, was mehrere Gründe haben kann. Hierzu zählt möglicherweise eine geringe Translationsleistung, verursacht durch mRNA-Sekundärstrukturen, Abbau durch sekretierte Proteasen oder die geringe Sekretion des Proteins durch die Zellen. Um die Auswirkung unterschiedlicher Sequenzen im 5'-Bereich des SOST-Expressionskonstrukts zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Expressionsvektoren (pACGP67 und pMK1) verwendet, die sich durch die Lage des Hexahistidintags und der Proteaseschnittstelle unterscheiden. In pACGP67 befindet sich die kodierende Sequenz für den Hexahistidintag und die Thrombinschnittstelle hinter, in

Diskussion

pMK1 vor dem für Sclerostin kodierenden Bereich. Der pMK1-Vektor bietet außerdem eine weitere Möglichkeit Einfluss auf die Expression zu nehmen. Durch die Verwendung des pMK1-Vektors konnte linearisierte Virus-DNA vom Typ BAC-3000 (Novagen) verwendet werden, welche nach Rekombination einen Virus generiert, in dem das Gen *v-cath* für eine sekretierte virale Protease deletiert ist. So konnte durch die Kombination von Änderungen des 5'-Bereiches der mRNA und die Verringerung ins Medium sekretierter Proteasen die Ausbeute an murinem und humanem Sclerostin verdoppelt werden.

Ein weiterer Grund liegt eventuell in der ineffizienten Sekretion des Proteins oder in der Bindung von Sclerostin an die Zelloberfläche, wodurch die Menge an Sclerostin im Zellkulturüberstand verringert wird. Mittels Western-Blot Analyse der Expressionsstudien von Sclerostin in verschiedenen Expressionssystemen (*Sf9*-Zellen, *Drosophila melanogaster* Zellen (S2-Zellen) und HEK293T-Zellen) konnte bestätigt werden, dass Sclerostin in den Überstand sekretiert wird, jedoch auch immer im Zelllysat vorhanden war. Hierbei konnte nicht zwischen ineffizienter Sekretion oder Bindung an die Zellen nach Sekretion unterschieden werden. Veverka *et al.* publizierten, dass Sclerostin eine Bindestelle für Heparin besitzt, wodurch es an membranständige Proteoglykane auf der Oberfläche von Zellen zu binden vermag (Veverka, *et al.*, 2009). Durch Zugabe von Heparin in verschiedenen Konzentrationen zu Sclerostin exprimierenden HEK293T-Zellen konnten Veverka *et al.* zeigen, dass bei gleicher Sclerosting Gesamtmenge die Proteinmenge im Zellkulturüberstand durch die Zugaben von Heparin erhöht werden konnten (Veverka, *et al.*, 2009). Dieses Ergebnis deutet auf eine Bindung von Sclerostin an die Zelloberfläche und gegen eine ineffiziente Sekretion des Proteins hin. Eigene Versuche, die Ausbeute an humanem Sclerostin aus Insektenzellkultur durch die Zugabe von Heparin zu erhöhen, führten jedoch zu keiner nennenswerten Ausbeutesteigerung.

Durch die Wahl des Expressionssystems sollte nicht nur die native Faltung des Proteins, sondern auch das Anfügen möglicher posttranslationaler Modifikationen gewährleistet werden. In besonderen Fällen sind posttranslationale Modifikationen wie die Glykosylierung essentiell für die biologische Aktivität eines Proteins (Elliott, *et al.*, 2004, Saremba, *et al.*, 2008, Ulloa-Aguirre, *et al.*, 1999). So ist im Fall von BMP-6 die Glykosylierung des Proteins essentiell für die Bindung an den Typ-I-Rezeptor ActR-I (Activin-Rezeptor-I) (Saremba, *et al.*, 2008). BMP-6, welches in *E.coli*-Bakterien exprimiert wird und somit nicht glykosyliert ist, ist nicht in der Lage an seinen „Signaling“-Rezeptor ActR-I zu binden und ist somit in

C2C12-Zellen biologisch inaktiv. Sclerostin wird in den Insektenzellen an der N-terminalen N-Glykosylierungsstelle (Asn²⁸) glykosyliert. Die Glykosylierung hat allerdings keinen Einfluss auf die Inhibition des Wnt-Signalwegs durch Sclerostin, da auch von *E.coli*-Bakterien exprimiertes Sclerostin in den von uns verwendeten Nachweisverfahren biologisch aktiv ist (siehe 3.5).

4.1.2 Expression von Sclerostin in *E.coli*-Bakterien

Für die Strukturaufklärung von Sclerostin war eine Herstellung des Proteins aus *E.coli*-Bakterien erforderlich, da das nach der in unserem Labor etablierten Methode aus *Sf9*-Zellen gewonnene Protein aus mehreren Gründen ungeeignet ist. Einerseits ist die durch Insektenzellen angefügte Glykosylierung für eine Kristallisation nachteilig, da sie die Löslichkeit der Proteine stark erhöht und zudem oft heterogen erfolgt. Eine Unterdrückung der Glykosylierung durch Zugabe von Inhibitoren wie Tunicamycin oder durch Substitutionsmutanten verringert in den meisten Fällen die Ausbeute drastisch und stellt somit keine Alternative dar. Andererseits ist die für die NMR-Spektroskopie erforderliche Markierung der Proteine mit den NMR-aktiven Isotopen ¹⁵N und ¹³C im Insektenzellkultursystem sehr kostenintensiv, da hier ein auf isotopenmarkierten Aminosäuren basierendes Medium benötigt wird.

Da Sclerostin ein extrazelluläres Cystinknotenprotein mit vier Disulfidbrücken ist, erscheint eine zytoplasmatische lösliche Expression von Sclerostin ohne Hilfsmittel nicht möglich. Ein für die BMP-Rezeptoren etabliertes Verfahren, die Expression des Proteins im Zytoplasma von *E.coli*-Bakterien mit verändertem Redoxpotential durchzuführen, welches die Bildung von Disulfidbrücken ermöglicht, führte im Fall von Sclerostin zur Expression von unlöslichem Protein. Eine weitere Strategie, Sclerostin in den periplasmatischen Spalt zu sekretieren, erwies sich als nicht erfolgreich, da ein Großteil des Proteins, aufgrund der flexiblen Bereiche, von dort vorkommenden Proteasen abgebaut wurde. Daher wurde Sclerostin letztlich im Zytoplasma in Form unlöslicher Einschlusskörper exprimiert, die nach Zellaufschluss und einem Waschschrift isoliert und in 6M Guanidiniumhydrochlorid gelöst wurden. Für die Renaturierung von Sclerostin wurde auf vorhandene Rückfaltungsprotokolle für Cystinknotenproteine, den BMPs, zurückgegriffen und diese für die Renaturierung von Sclerostin optimiert. Dabei lieferte der Rückfaltungspuffer für BMP-6 mit anschließender Dialyse die höchste Ausbeute an aktivem Sclerostin.

4.1.3 Strukturaufklärung

Für die hochauflösende Strukturaufklärung eines Proteins stehen zwei, großteils komplementäre Methoden zur Verfügung, NMR-Spektroskopie und Röntgenstrukturanalyse. Beide Verfahren haben sehr unterschiedliche Ansätze und stellen teils spezifische Anforderungen an die Proteineigenschaften der Probe. Für die NMR-Spektroskopie sollte ein Protein eine hohe Löslichkeit aufweisen, da Konzentrationen zwischen 0.5 und 1mM in der Regel notwendig sind. Für die Messung der Amidprotonensignale muss durch die Pufferbedingungen ein leicht saurer pH-Wert erreicht werden (pH 4.5-6.5) und aufgrund des Messverfahrens sind zudem niedrige Salzkonzentrationen (max. 50mM NaCl) erforderlich, da sonst durch die Mikrowellenstrahlung eine zu starke Erwärmung der Proteinprobe erfolgt. Für die Kristallisation von Proteinen sind ebenfalls hohe Konzentrationen in der Regel zwischen 5-10mg/ml notwendig, allerdings soll hier letztlich eine kontrollierte Unlöslichkeit erreicht werden, die zur Kristallisation des Proteins führt. Flexible Bereiche in Proteinen können die Einordnung in ein starres Kristallgitter stören. Die biochemische Analyse der Domänenstruktur zeigt allerdings deutlich, dass Sclerostin flexible Termini besitzt, was sehr wahrscheinlich eine Kristallisation des Proteins verhindern oder zumindest behindern würde (siehe 3.2.3). Aus diesem Grund wurde, nach ersten erfolglosen Kristallisationsversuchen, die NMR-Spektroskopie als Methode gewählt. Obwohl flexible Bereiche für die NMR-Spektroskopie kein grundlegendes Hindernis darstellen, führen ungeordnete Bereiche zu einer starken Überlagerung der Protonensignale, was die Zuordnung der Signale im Rahmen der Auswertung erschwert. Da der Aufwand der Auswertung überproportional mit der Zahl der Signale ansteigt, ist die Anzahl der Atome und damit die Anzahl der Aminosäuren eines Proteins ebenfalls ein limitierender Faktor für die NMR-Spektroskopie. Der reife Teil von Sclerostin umfasst 192 Aminosäuren. Daher wurde nach Prüfung der biologischen Aktivität der Sclerostin-Trunktionsvarianten das kürzeste biologisch aktive Protein mit 113 Aminosäuren für die Strukturaufklärung verwendet.

Die Strukturaufklärung erfolgte mittels Standard-Methoden für Proteine mittlerer Größe. Durch die Markierung des Proteins mit den NMR-aktiven Isotopen ^{15}N und ^{13}C konnten so genannte „Tripleresonanz“-Experimente verwendet werden, die eine Trennung überlagerter Protonensignale ermöglicht und eine schnelle Zuordnung der NMR-Signale aller H-, C- und N-Kerne erlaubt. Die Zuordnung der Hauptkettenatome erfolgte über die „Tripleresonanz“-Spektrenpaare CBCA(CO)NH und CBCA(N)NH. Allerdings war es mittels dieser beiden Spektren nicht möglich, alle Aminosäuren zuzuordnen. Besonders im Bereich des

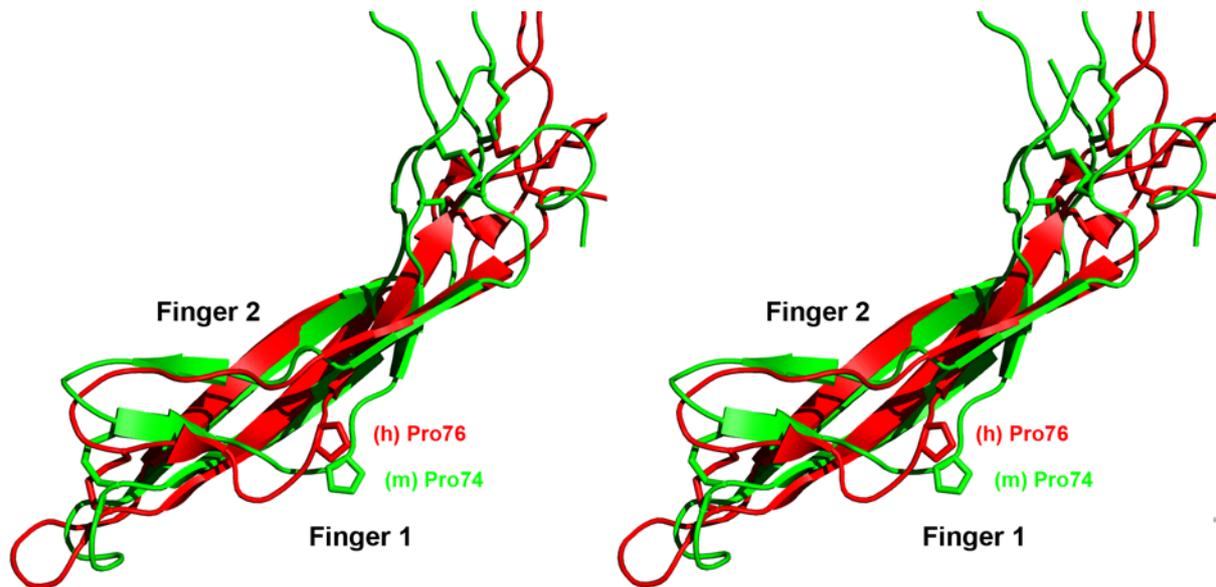
Cystinknotens traten, wahrscheinlich bedingt durch eine langsame Dynamik im μs -Bereich, Signalverbreiterungen auf, weshalb die hiervon betroffenen Aminosäuren nicht identifiziert werden konnten. Zur Überprüfung der Zuordnung und um fehlende Aminosäuren eventuell dennoch identifizieren zu können, wurde ein weiteres „Tripleresonanz“-Spektrumpaar, $\text{HN}(\text{CA})\text{CO}$ und HNCO , benutzt. Die Zuordnung der bisher identifizierten Aminosäuren konnte hierdurch bestätigt werden. Zudem konnten weitere vier Aminosäuren identifiziert werden.

4.2 Vergleich der NMR-Strukturen von murinem und humanem Sclerostin

Die Struktur von murinem Sclerostin- ΔNC gliedert sich in drei Regionen, den zentralen Cystinknoten, den „Loop“-Bereich und die Finger. Sie bestehen aus zwei Schleifen (Finger 1 und Finger 2), die eine definierte β -Faltblattstruktur bilden und durch eine zusätzliche Disulfidbrücke in den Fingerspitzen miteinander verbunden sind. Der „Loop“-Bereich, ebenfalls ein Schleife, welche vom Cystinknoten isoliert in die entgegengesetzte Richtung verläuft, ist flexibel und unstrukturiert (siehe Abb. 37). Zeitgleich mit der Veröffentlichung der Struktur von murinem Sclerostin- ΔNC , wurde die NMR-Struktur des gesamten reifen Teils von humanem Sclerostin ($\text{Gln}^1\text{-Tyr}^{190}$) von Veverka *et al.* publiziert (Veverka, *et al.*, 2009). Das humane Protein weist ebenfalls hoch flexible N- und C-Termini und einen flexiblen „Loop“-Bereich auf, auch die Disulfidverbrückungsmuster beider Proteine sind identisch. Die zwei Finger des humanen Proteins, die sich ebenfalls in den Fingerspitzen überkreuzen, wo sie durch eine weitere Disulfidbrücke verbunden sind, weisen wie im murinem Protein antiparallele β -Faltblattelemente auf. Bei näherer Betrachtung beider Strukturen wird jedoch deutlich, dass die Positionen der $\text{C}\alpha$ -Atome in beiden Strukturen um mehrere Å voneinander abweichen. Die größten Unterschiede treten hierbei in Finger 1 und im Cystinknoten auf (siehe Abb. 48).

Aufgrund der hohen Sequenzhomologie zwischen humanem und murinem Protein (im reifen Teil sind nur 21 Aminosäuren unterschiedlich, siehe Abb. 44) sind die beobachteten strukturellen Differenzen zwischen beiden Proteinen bemerkenswert. Da die Abweichungen mit größter Wahrscheinlichkeit nicht auf Sequenzunterschiede zurückzuführen sind, müssen andere Gründe, insbesondere in der Auswertung der Strukturdaten, gesucht werden.

A



B

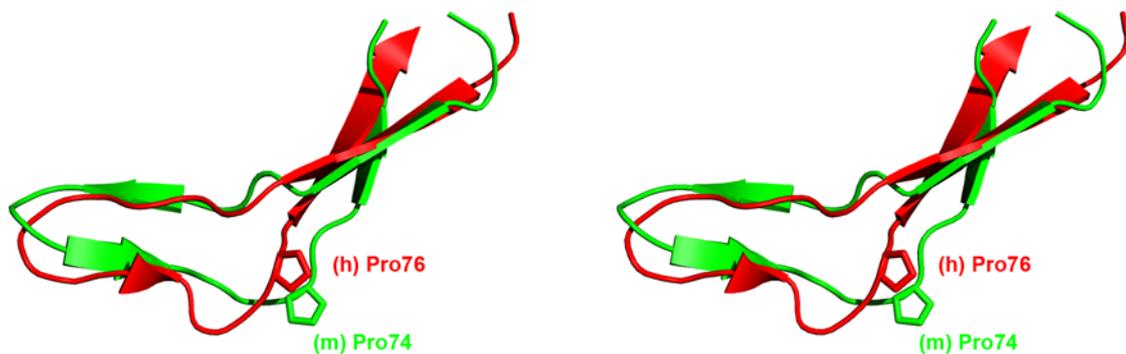


Abbildung 48: A) Überlagerung der Bänderdarstellung (Finger 1 und Finger 2) von humanem (rot, ohne N- und C-Terminus) und murinem (grün) Sclerostin in Stereoansicht. B) Überlagerung der Bänderdarstellung des ersten Fingers von murinem (grün) und humanem (rot) Sclerostin in Stereoansicht.

Im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit verwendeten Ansatz, haben Veverka *et al.*, nach der manuellen Zuordnung der chemischen Verschiebungen die Ermittlung der Abstandsinformation, also die Zuordnung der NOE-Kreuzsignale, automatisch durch das Programm Candid vorgenommen (Herrmann, *et al.*, 2002). Aufgrund der großen Anzahl von Aminosäuren in flexiblen Bereichen hat Sclerostin viele Amidprotonen mit chemischen Verschiebungen in einem eng begrenzten ppm-Bereich (7.5-8.5ppm) (siehe Abb. 30), was zu Signalüberlappungen führt und die Signalzuordnung enorm erschwert. Selbst für die

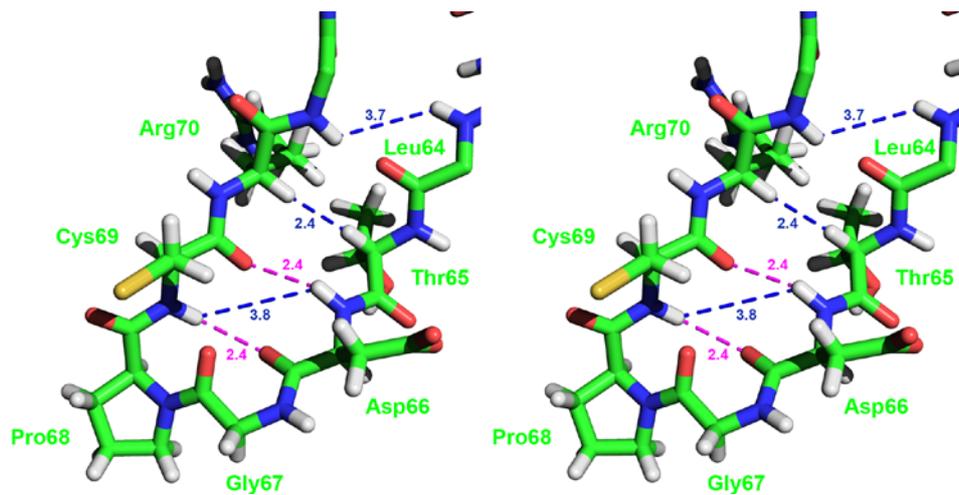
Trunktionsvariante von murinem Sclerostin, mit einer deutlich geringeren Zahl von NOE-Kreuzsignalen im Vergleich zum wildtypischen Sclerostin, war eine vollständige Zuordnung aller NOE-Kreuzsignale nicht möglich. Das wildtypische humane Protein weist, verglichen mit der Trunktionsvariante, durch die beiden flexiblen Termini eine deutlich größere Anzahl an NOE-Kreuzsignalen auf und somit auch deutlich mehr überlappende NOE-Kreuzsignale. Dies erschwert ein automatisches Zuordnungsverfahren der Kreuzsignale und kann unter Umständen zu falschen Abstandsinformationen führen.

Die strukturellen Differenzen konzentrieren sich vor allem auf den Cystinknoten und den ersten Finger. Die im murinen Protein für diesen Finger charakteristischen Elemente wie die β -Schleife in der Fingerspitze, die zwei kurzen β -Faltblattelemente (murines Sclerostin: β 1: Tyr⁵⁹-Thr⁶⁰, β 2: Leu⁶⁵-Asp⁶⁶, β 3: Cys⁶⁹-Ser⁷⁰, β 4: Thr⁷⁷-Glu⁷⁸) und das Kreuzen der beiden Hauptkettenstränge am Aminosäurerest Pro⁷⁴, sind im humanen Protein nur in ähnlicher Form zu finden und werden im Folgenden genauer analysiert (siehe Abb. 48 B).

In Abbildung 49 sind die Fingerspitzen der Finger 1 von murinem Sclerostin (grün, A) und humanem Sclerostin (türkis, B) dargestellt. In murinem Sclerostin bildet die Proteinhauptkette in der Fingerspitze eine β -Schleife aus, die durch zwei Wasserstoffbrücken (magenta) zwischen dem Amidproton von Cys⁶⁹ und dem Carbonylsauerstoff von Asp⁶⁶ sowie zwischen dem Amidproton von Asp⁶⁶ und dem Carbonylsauerstoff von Cys⁶⁹ stabilisiert wird. Hinweise auf die Ausbildung dieser Wasserstoffbrücken (in magenta) geben die NOE-Kreuzsignale zwischen den Amidprotonen von Cys⁶⁹ und Asp⁶⁶, die durch ein NOE-Kreuzsignal mit mittlerer Intensität (Abstand: $3.5\text{\AA}\pm 0.5\text{\AA}$) gekennzeichnet sind und ein NOE-Kreuzsignal mit hoher Intensität (Abstand: $2.5\text{\AA}\pm 0.5\text{\AA}$) zwischen den H α -Protonen von Arg⁷⁰ und Thr⁶⁵.

Die Schleife in der Fingerspitze von humanem Sclerostin weist eine andere Konformation auf. Hier werden keine Wasserstoffbrücken zwischen den Amidprotonen und den Carbonylsauerstoffen von Cys⁷¹ und Asp⁶⁸ ausgebildet, da hier die Abstände, im Vergleich zum murinen Sclerostin, zwischen den beteiligten Atomen um etwa 1\AA länger sind. Die in diesem Bereich für das murine Protein ermittelten Abstandsinformationen (NOE-Kreuzsignale: HN66 – HN69 $3.5\text{\AA}\pm 0.5\text{\AA}$, H α 70 – H α 65 $2.5\text{\AA}\pm 0.5\text{\AA}$, HN64 – HN71 $3.5\text{\AA}\pm 0.5\text{\AA}$) sprechen jedoch gegen die Konformation im humanen Protein und für eine durch Wasserstoffbrücken stabilisierte β -Schleife, wie in der Struktur des murinen Proteins.

A



B

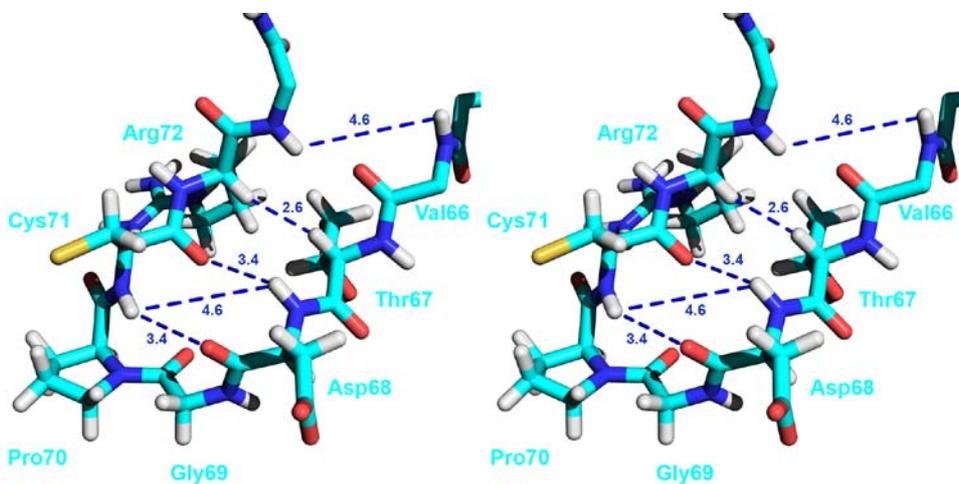


Abbildung 49: A) Stereoansicht der β -Schleife des ersten Fingers von murinem Sclerostin. Wasserstoffbrücken sind in magenta dargestellt. Die gestrichelten Linien und Zahlen repräsentieren die gemessenen Abstände in Å. B) Stereoansicht der Schleifenregion des ersten Fingers von humanem Sclerostin. Die gestrichelten Linien und Zahlen repräsentieren die gemessenen Abstände in Å.

Abbildung 50 zeigt den oberen Abschnitt des ersten Fingers von humanem Sclerostin. In der NMR-Struktur des humanen Proteins bildet dieser Bereich, im Gegensatz zur Struktur des murinen Proteins, ein regelmäßiges antiparalleles β -Faltblatt mit den (in der Abbildung eingezeichneten) charakteristischen Abständen der Amidprotonen gegenüberliegender Aminosäuren zueinander (humanes Sclerostin: Val⁷⁷ NH – Arg⁶⁴ NH 2.6Å, Glu⁷⁹ NH – Phe⁶² NH 2.9Å, Val⁸¹ – Leu⁶⁰ HN 3.1Å). Diesen charakteristischen Abständen müssten NOE-Kreuzsignale mit entsprechenden Intensitäten (Volumina) zuzuordnen sein. Jedoch weder im 3D-NOE-HSQC-NOE Spektrum, welches Amidprotonen, die einen Abstand von kleiner als 5Å zueinander aufweisen, miteinander korreliert, noch im 2D-NOESY- oder 3D-¹⁵N-

NOESY-Spektrum konnten diese charakteristischen NOE-Kreuzsignale beobachtet werden. Für den Abstand humanes Sclerostin Val⁸¹ NH – Leu⁶⁰ NH von 3.1Å (murines Sclerostin: Val⁷⁹ NH – Leu⁵⁸ NH) wird kein NOE-Kreuzsignal beobachtet, für den Abstand humanes Sclerostin Glu⁷⁹ NH – Phe⁶² NH von 2.9Å (murines Sclerostin: Glu⁷⁷ NH – Tyr⁶⁰ NH) wird nur ein NOE-Kreuzsignal mit niedriger Intensität beobachtet, welches somit einem Abstand von 5Å±0.5Å entspricht. Über den Abstand humanes Sclerostin Val⁷⁷ NH – Arg⁶⁴ NH von 2.6Å (murines Sclerostin: Val⁷⁵ NH – Arg⁶² NH) kann keine Aussage getroffen werden, da die chemischen Verschiebungen beider Amidprotonen identisch sind und somit das Kreuzsignal auf der Diagonalen des Spektrums zu liegen kommt. Alleine diese beiden gravierenden Distanzabweichungen sprechen gegen ein regelmäßiges β -Faltblattelement in diesem Bereich der Struktur.

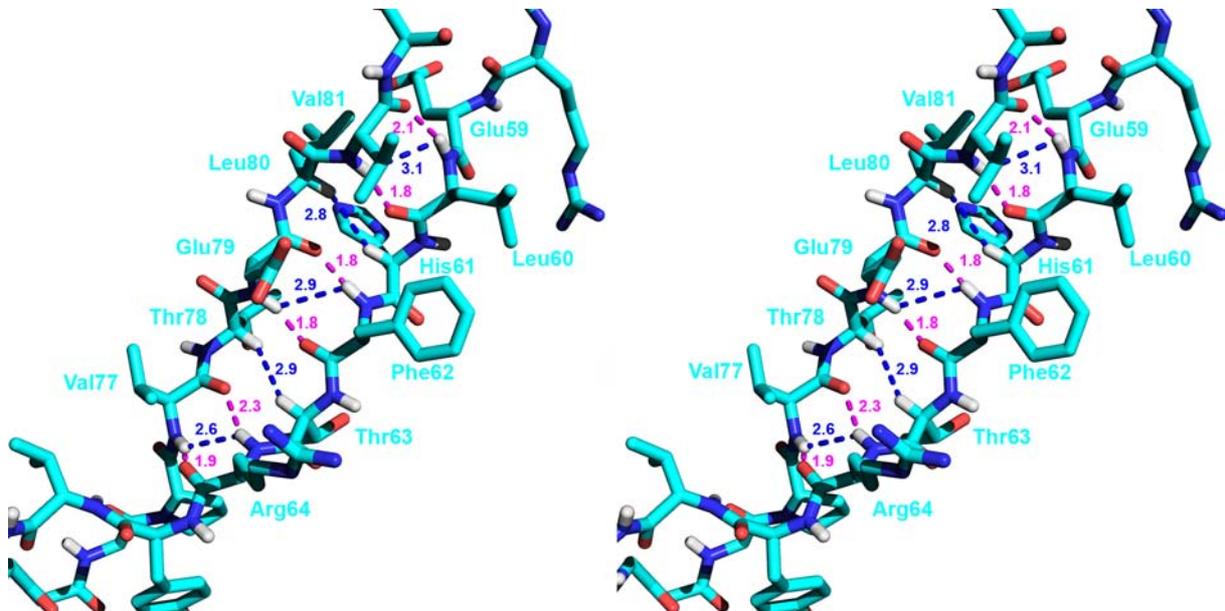


Abbildung 50: Stereoansicht des β -Faltblattelements im ersten Finger von humanem Sclerostin. Die Wasserstoffbrücken sind in magenta dargestellt. Die gestrichelten Linien und Zahlen repräsentieren die gemessenen Abstände in Å.

Eine andere Möglichkeit, Wasserstoffbrücken in einem Protein zu identifizieren, ist die Methode, alle austauschbaren Protonen durch Deuterium zu ersetzen und die entsprechenden Austauschzeiten durch 2D-¹⁵N-HSQC-Spektren mit unterschiedlichen D₂O-Einwirkzeiten zu messen. Amidprotonen von Aminosäuren, die in rigiden Sekundärstrukturelementen lokalisiert sind, werden nur mit langsamen Kinetiken von Deuterium ersetzt und erzeugen auch nach einigen Minuten in D₂O noch ein messbares Protonensignal. Für murines Sclerostin konnte diese Art der Wasserstoffbrückenbestimmung nicht erfolgreich angewendet

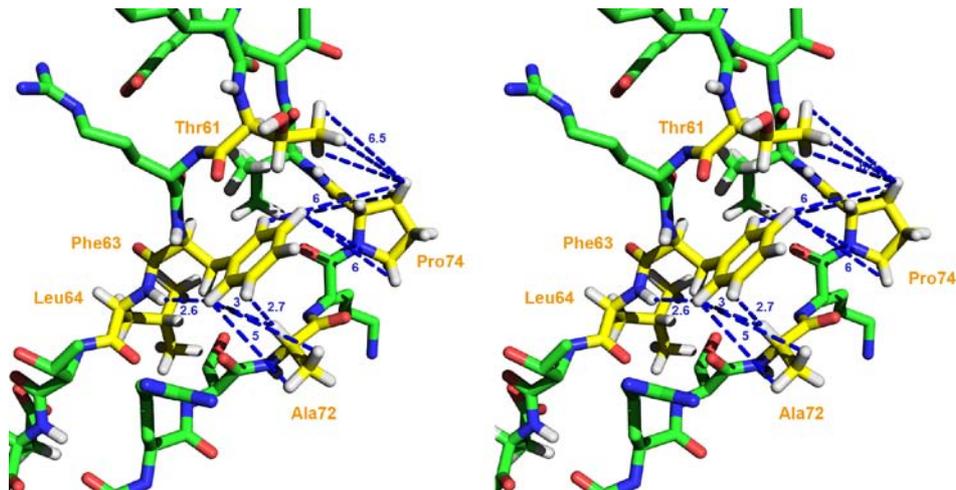
Diskussion

werden. Die Zeit vom Pufferaustausch bis zur ersten Messung reichte aus, alle austauschbaren Protonen gegen Deuterium zu ersetzen. Diese Beobachtung spricht somit gegen eine starre Struktur und lässt eine relativ flexible Faltung des Proteins vermuten.

Durch das regelmäßige β -Faltblattelement im oberen Bereich des ersten Fingers von humanem Sclerostin wird auch der Cystinknoten in der humanen Struktur stabilisiert. Durch die Wasserstoffbrücke in humanem Sclerostin zwischen dem Carbonylsauerstoff von Val⁸¹ und dem Amidproton von Glu⁵⁹ erhält das darauf folgende Cys⁸² eine eindeutige Konformation, wodurch die Disulfidbrücke zwischen Cys⁸² und Cys¹⁴² starrer wird. Ein starrer Cystinknoten kann durch die hier vorgelegten Ergebnisse nicht bestätigt werden. Dieser Bereich liegt im murinen Protein flexibel vor, was durch mehrere Beobachtungen belegt werden kann. Einerseits konnten die Aminosäuren in dieser Region nur partiell zugeordnet werden, da aufgrund der Flexibilität Unterschiede im Relaxationsverhalten dazu führen, dass die Linienbreiten dieser Signale stark zunehmen. Andererseits scheint es auch unwahrscheinlich, dass der Cystinknoten eine starre Konformation aufweist, da er durch keinerlei van der Waals- oder sonstige Wechselwirkungen stabilisiert wird. Außer den Cysteinresten zeigen die Seitenketten aller Reste des Knotens nach außen und können untereinander nur wenige stabilisierende Wechselwirkungen ausbilden. Die Cysteinreste, die nach innen zeigen, weisen in der murinen Struktur alle die stabilste Disulfidkonformation gauche-gauche-gauche, mit Diederwinkeln $C\beta-S-S'-C\beta'$ von etwa $90^\circ \pm 20^\circ$, auf (Nakamura, *et al.*, 1997, Sugeta, *et al.*, 1972). Konformationsänderungen (nach gauche-gauche-trans oder trans-gauche-gauche) der Disulfide tragen möglicherweise ebenfalls zur Destabilisierung des Knotens bei.

Abbildung 51 zeigt die Region um die Aminosäurereste Pro⁷⁴ (murin, grün, A) und Pro⁷⁶ (human, türkis, B) des Fingers 1 von murinem sowie humanem Sclerostin. Damit die beiden Finger von Sclerostin sich im unteren Drittel überkreuzen und ein hydrophobes „Core“ bilden können, müssen sich beide, vom Cystinknoten ausgehende, Hauptkettenstränge des ersten Fingers kreuzen, was durch einen Knick der Proteinhauptkette in der Nähe des Aminosäurerests Pro⁷⁴ (murines Protein) bzw. Pro⁷⁶ (humanes Protein) erreicht wird. Die in diesem Bereich lokalisierten Aminosäuren sind in Abbildung 51 dargestellt.

A



B

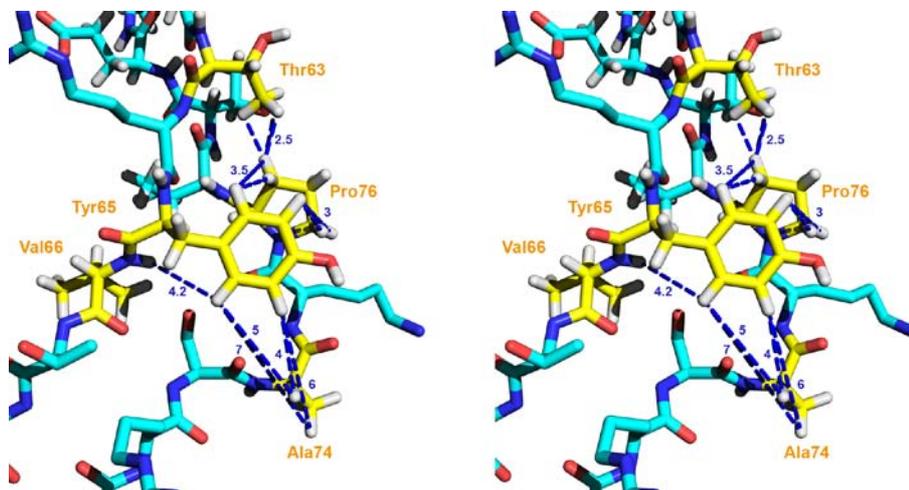


Abbildung 51: A) Stereoansicht der Region um Pro⁷⁴ im ersten Finger von murinem Sclerostin. B) Stereoansicht der Region um Pro⁷⁶ im ersten Finger von humanem Sclerostin. Die gestrichelten Linien und Zahlen repräsentieren die gemessenen Abstände in Å.

Tabelle 22 verdeutlicht, dass die Torsionswinkel Φ und Ψ dieses Bereichs sich für einige Aminosäuren um mehr als 30° unterscheiden (Ser, Ala, Lys, Pro, etc.). Die Unterschiede in der Hauptkettenkonformation bedingen auch Unterschiede in der Orientierung der Seitenketten zueinander. Dies betrifft vor allem die Abstände der Ringprotonen des Aromaten ($H\delta$ und $H\epsilon$ von Phe⁶³ im murinen Protein und Tyr⁶⁵ im humanen Protein) zu den $H\beta$ - und $H\delta$ -Protonen von Pro⁷⁴ bzw. Pro⁷⁶ und dem $H\alpha$ bzw. der Methylgruppe von Ala⁷² im murinen Protein bzw. Ala⁷⁴ im humanen Proteine (siehe Abb. 51). Für die Nähe zwischen der Methylgruppe von Thr⁶⁴ und den $H\beta$ -Protonen von Pro⁷⁶ im humanen Protein von etwa 2.5Å gibt es in unseren Daten kein NOE-Kreuzsignal, ebenso wenig für die Distanz von 3.5Å

Diskussion

zwischen den H β -Protonen von Pro⁷⁶ und den H δ -Protonen des Tyr⁶⁵ im humanen Protein oder den Abstand zwischen H δ -Protonen von Pro⁷⁶ und den H ϵ -Protonen von Tyr⁶⁵. Eindeutige NOE-Kreuzsignale konnten jedoch für die Abstände zwischen H α bzw. der Methylgruppe von Ala⁷² im murinen Protein und den H δ - und H ϵ -Protonen von Phe⁶³ identifiziert werden, was in diesem Fall gegen die Konformation in der humanen Struktur spricht.

Aminosäure murines Sclerostin	Φ [°]	Ψ [°]	Lage im Ramachandran -Diagramm	Aminosäure humanes Sclerostin	Φ [°]	Ψ [°]	Lage im Ramachandran -Diagramm
Ser ⁷¹	-89	160	B	Ser ⁷³	-55	133	B
Ala ⁷²	-147	28	h	Ala ⁷⁴	-72	-24	H
Lys ⁷³	-79	143	B	Lys ⁷⁵	-139	160	B
Pro ⁷⁴	-51	122	B	Pro ⁷⁶	-69	165	B
Val ⁷⁵	-136	145	B	Val ⁷⁷	-188	142	B
Thr ⁷⁶	-119	128	B	Thr ⁷⁸	-92	131	B
Glu ⁷⁷	-143	150	B	Glu ⁷⁹	-123	134	B
Thr ⁶¹	-121	79	b	Thr ⁶³	-130	135	B
Arg ⁶²	-125	124	b	Arg ⁶⁴	-156	155	B
Phe ⁶³	-109	-79	h	Tyr ⁶⁵	-91	125	B
Leu ⁶⁴	-171	137	B	Val ⁶⁶	-94	148	B
Thr ⁶⁵	-133	132	B	Thr ⁶⁷	-147	134	b

Tabelle 22: Torsionswinkel einiger Aminosäuren des ersten Fingers von murinem und humanem Sclerostin. Die vierte und achte Spalte gibt die Lage der Aminosäure aus Spalte eins im Ramachandran-Diagramm an. B steht für β -Faltblattregion, b steht für noch erlaubte β -Faltblattregion, H steht für α -helikalen Bereich und h steht für noch erlaubten α -helikalen Bereich.

4.3 Vergleich der Sclerostin-Struktur mit Strukturen anderer Cystinknotenproteine

Der Vergleich der Sclerostin-Struktur mit anderen Strukturen durch das Programm TOPMATCH (Wiederstein, 2008) ergab nur wenige homologe Strukturen. Eine geringe Ähnlichkeit wurde nur zu anderen Cystinknotenproteinen, wie den monomeren Untereinheiten der BMPs und Activine oder der β -Kette von humanem Choriongonadotropin (hCG) festgestellt, wobei die Unterschiede der $C\alpha$ -Positionen zwischen den Proteinen erheblich sind. Der Grund hierfür ist, dass die Ähnlichkeit dieser Proteingruppe einzig durch die architekturbestimmenden Einschränkungen des Cystinknotens und den dadurch festgelegten Verlauf der Proteinhauptkette bedingt ist.

Werden die beiden Cystinknoten von Sclerostin und BMP-2 im Detail miteinander verglichen, lassen sich auch hier erhebliche Abweichungen der $C\alpha$ -Positionen der involvierten Cysteine als auch der anderen Aminosäuren voneinander erkennen (siehe Abb. 52 C). Der Cystinknoten von Sclerostin scheint im Vergleich zu den Cystinknoten der BMPs weniger starr zu sein. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die ersten Reste C-terminal vom ersten Cysteinrest des Knotens der BMPs in einem regulären β -Faltblatt angeordnet sind (Scheufler, *et al.*, 1999). Auch das β -Faltblatt im zweiten Finger von BMP-2 verläuft bis in den Cystinknoten und enthält die Cysteine Cys⁷⁹, Cys¹¹¹ und Cys¹¹³. Die Cysteine des Cystinknotens von Sclerostin hingegen sind nicht Teil eines Sekundärstrukturelements. Auch wird der Cystinknoten von Sclerostin nicht wie der Knoten der BMPs von der Schleife stabilisiert. Dieser Bereich bildet in den BMPs eine α -Helix ($\alpha 1$) aus, die Teil der Dimerisierungsstelle der beiden Monomere ist (siehe Abb. 52 B, 53). Die Strukturierung in diesem Bereich durch die α -Helix und die weitere Monomeruntereinheit führt dazu, dass der Cystinknoten stabilisiert wird. Der „Loop“-Bereich von Sclerostin ist hingegen stark flexibel. In diesem Bereich ist die Ausbildung von stabilisierten Sekundärstrukturelementen wie β -Faltblatt oder α -Helix nicht möglich, da keine hydrophoben Bereiche, die in der Regel im Inneren von Proteinen anzutreffen sind und durch hydrophobe Interaktionen stabilisiert werden, entstehen können. Da Sclerostin kein Dimer bildet, fehlt eine zweite Monomeruntereinheit wie in den BMPs, bei denen die nach außen zeigenden hydrophoben Reste der Helix durch hydrophobe Interaktionen mit Aminosäuren der zweiten Untereinheit stabilisiert werden.

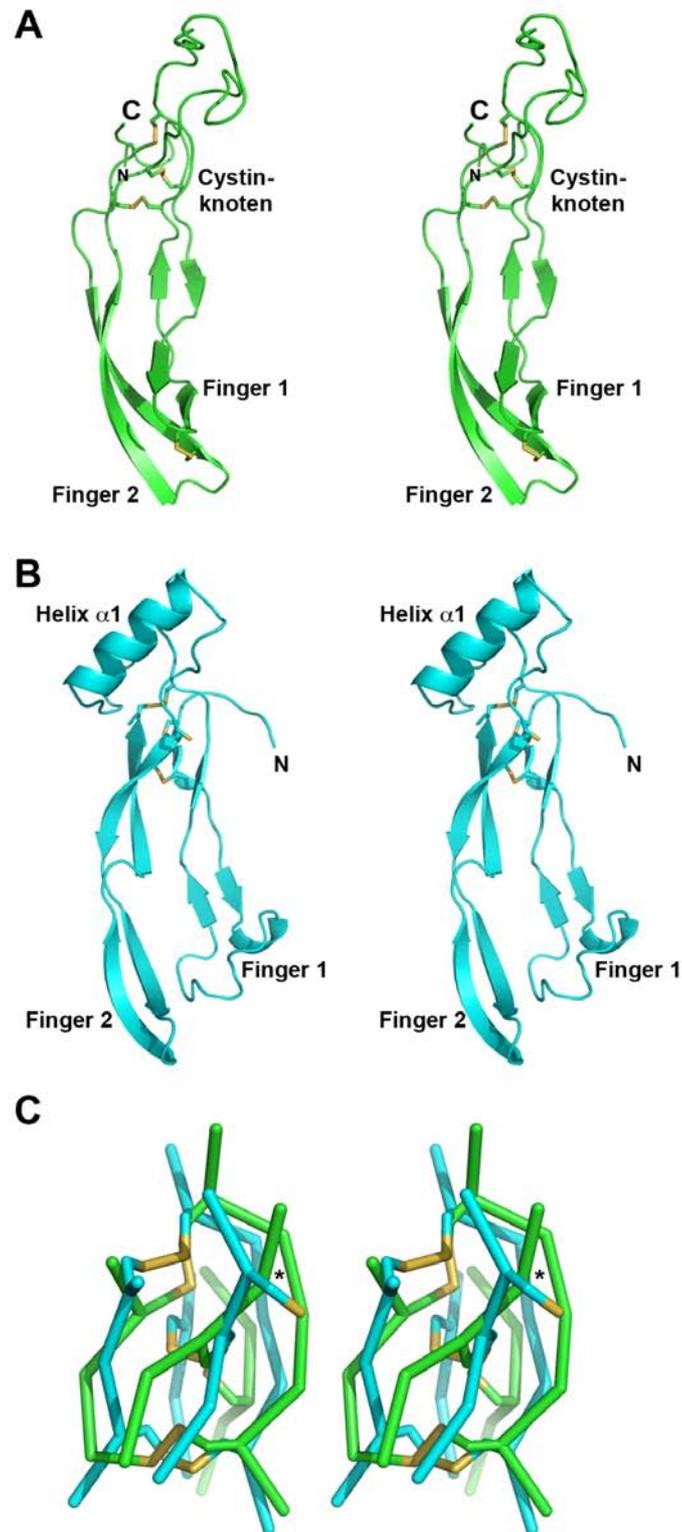


Abbildung 52: A) Stereoansicht der Bänderdarstellung von murinem Sclerostin. B) Stereoansicht der Bänderdarstellung eines reifen Monomers von BMP-2. (Scheufler, *et al.*, 1999) C) Überlagerung der C α -Atome beider Cystinknoten von murinem Sclerostin und BMP-2 in Stereoansicht (Sclerostin in grün, BMP-2 in cyan). (* Cystein welches beide Monomere von BMP-2 kovalent verbrückt.)

Finger 1 und Finger 2 von Sclerostin sind, wie die korrespondierenden Finger der BMPs, hoch strukturiert und bilden β -Faltblätter. Im Gegensatz zu den BMPs ist die Festigkeit beider Finger durch eine, die Flexibilität einschränkende Disulfidbrücke in den Fingerspitzen und durch den zwischen den zwei Fingern entstehenden hydrophoben Bereich bedingt. Den BMPs fehlt im Vergleich dazu diese zusätzliche Disulfidbrücke. Sie wird hier möglicherweise nicht benötigt, weil beide Finger in den BMPs durch die Dimerisierung und die dadurch entstehenden Wechselwirkungen zwischen Resten der Finger des einen Monomers mit Resten der Helix $\alpha 1$ des anderen Monomers fixiert werden.

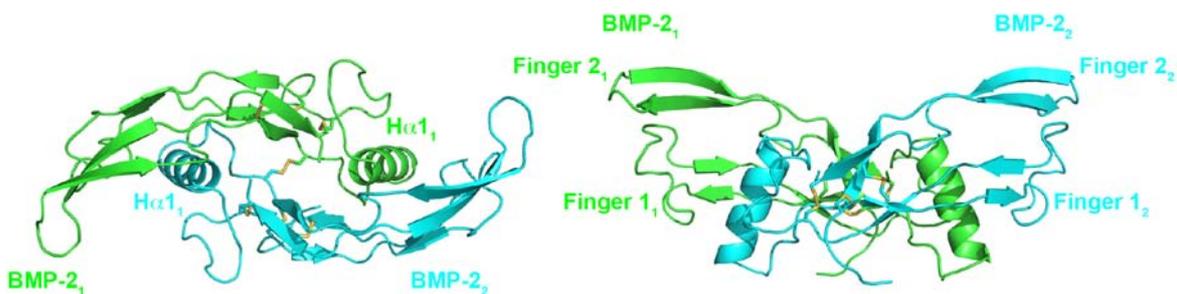


Abbildung 53: Bänderdarstellung des dimeren BMP-2 (rechts um 90° in der X-Achse gedreht) (Scheufler, *et al.*, 1999).

Humanes Choriongonadotropin (hCG), ein Glykoproteinohormon, welches die zellulären und hormonellen Funktionen der Ovarien reguliert, besteht aus zwei Untereinheiten, einer α -Kette und einer β -Kette, deren zentrales strukturgebendes Element ebenfalls ein Cystinknoten ist (Lapthorn, *et al.*, 1994) (siehe Abb. 54). Der Bereich des Cystinknotens beider Untereinheiten ist hoch strukturiert und enthält β -Faltblattelemente, die nach Dimerisierung beider Untereinheiten ein siebenblättriges β -Faltblatt bilden. Die α -Kette hat darüber hinaus noch zwei weitere Disulfidbrücken, welche die beiden kurzen Termini an den Cystinknotenbereich fixieren. Die beiden Finger der α -Kette beinhalten wenige Sekundärstrukturelemente. Der „Loop“-Bereich hingegen weist in der Spitze eine α -Helix auf. Die β -Kette, die gewisse Ähnlichkeit zu Sclerostin zeigt, hat wie Sclerostin eine Disulfidbrücke, die beide Spitzen der Finger verbindet und zwei weitere Disulfidbrücken, die den langen C-Terminus strukturieren und ihn an der Fingerspitze von Finger 1 fixieren. Nach der Dimerisierung fungiert der C-Terminus der β -Kette als Gurt für den „Loop“-Bereich der α -Kette, der zwischen Finger 1 und C-Terminus hindurch ragt.

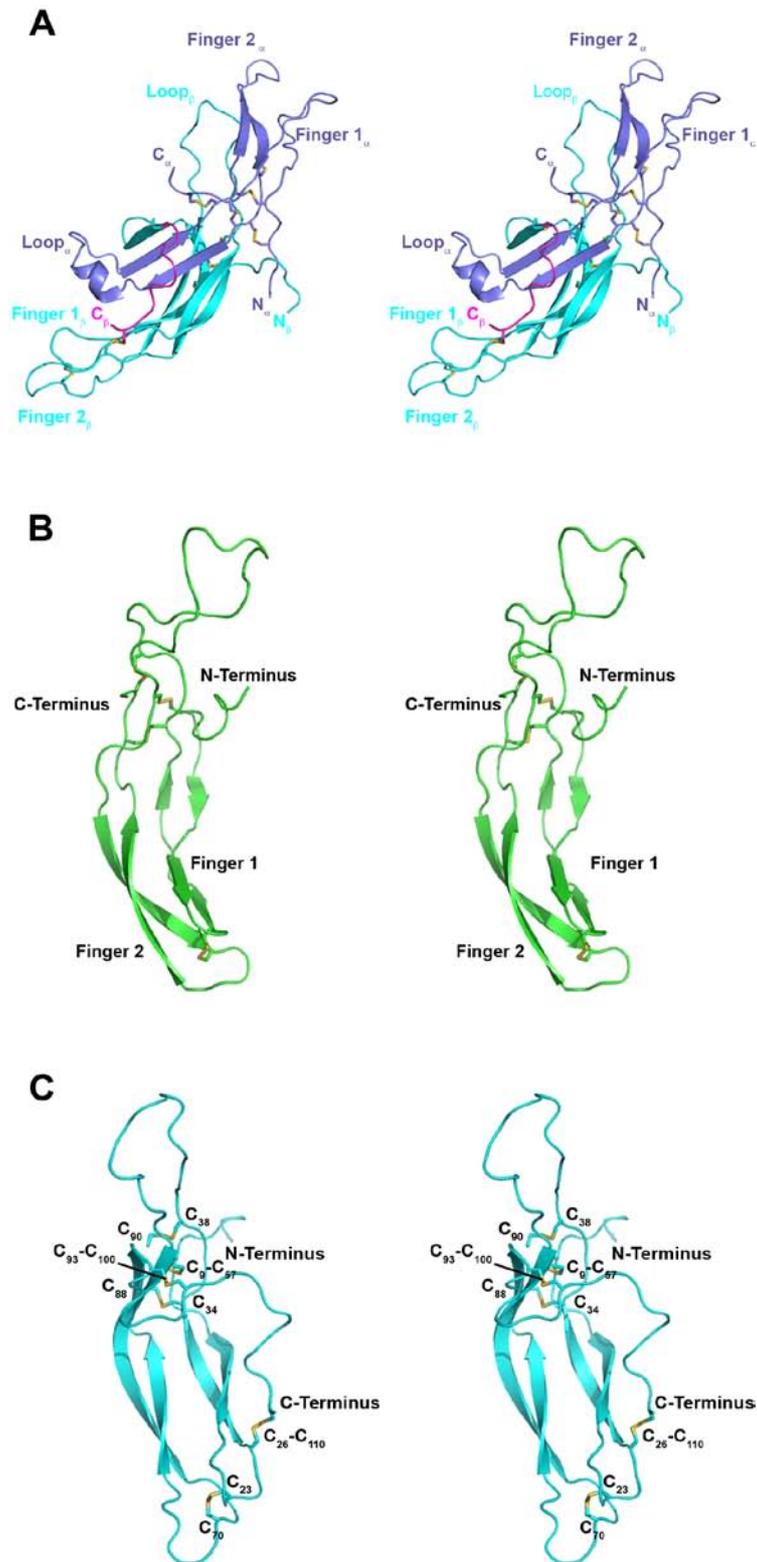


Abbildung 54: A) Stereoansicht der Bänderstruktur von humanem Choriongonadotropin (hCG) bestehend aus α -Kette (lila) und β -Kette (cyan) (Lapthorn, *et al.*, 1994). Der als „Gurt“ fungierende C-Terminus der β -Kette ist in magenta dargestellt. B) Stereoansicht der Bänderdarstellung von murinem Sclerostin. C) Stereoansicht der Bänderdarstellung der β -Kette von humanem Choriongonadotropin.

Auch im Fall von humanem Choriongonadotropin führt die Dimerisierung der α - und β -Kette zu einer relativ globulären Struktur, in der die Sekundärstrukturelemente durch die Dimerisierung stabilisiert werden. Im Gegensatz zu dem reifen Teil von BMP-2 hat Sclerostin lange und flexible Termini. Die β -Kette von humanem Choriongonadotropin hat nur einen langen C-Terminus, der durch eine Disulfidbrücke an Finger 1 fixiert ist und bei der Dimerisierung eine bedeutende Rolle spielt. Der N-Terminus ist ebenfalls nur wenige Aminosäuren lang. Welche Bedeutung die Termini von Sclerostin haben, ist bisher unklar. Sie spielen jedoch nur eine untergeordnete Rolle für die Wnt-Signalweg-inhibierende Funktion des Proteins in den von uns verwendeten Zellverfahren (siehe 3.4.1). Sie könnten allerdings bei der Fixierung des Proteins an der extrazellulären Matrix mitwirken und so verhindern, dass Sclerostin durch Diffusion seinen Wirkort verlässt. Eine Möglichkeit, dies zu testen, wäre das Bindungsverhalten von Sclerostin an eine Heparinsäule zu bestimmen und dieses mit dem Bindungsverhalten der Trunktionsvarianten zu vergleichen. Außerdem könnten die Termini eine Rolle bei der Bindung möglicher Ko-Faktoren spielen oder eventuell nach proteolytischer Prozessierung als Peptidfragmente andere Aufgaben erfüllen.

Nicht nur die langen Termini von Sclerostin sind flexibel, sondern auch der so genannte „Loop“-Bereich liegt unstrukturiert vor, worauf schon die hohe Anzahl von Glycinresten und hydrophilen Aminosäuren dieser Schleife hindeutet (Abb. 55).



Abbildung 55: Aminosäuresequenz des „Loop“-Bereichs von murinem Sclerostin zwischen Cys⁸⁴ und Cys¹⁰⁹.

Der „Loop“-Bereich enthält darüber hinaus vier Prolinreste, die in Abständen von wenigen Aminosäuren in der Sequenz angeordnet sind. Prolinreste sind weder mit einer α -Helix noch mit β -Faltblattelementen vereinbar, da durch das Fehlen des Amidprotons die essentielle Wasserstoffbrücke zum Carbonylsauerstoff des Restes $i-4$ in der α -Helix oder zum Carbonylsauerstoff des gegenüberliegenden Restes in einem β -Faltblattelement nicht möglich ist, was eine Unterbrechung des Sekundärstrukturelements zur Folge hat.

Ein nennenswerter Anteil aller Proteine beinhaltet unstrukturierte Regionen, oder besteht aus vollständig ungefalteten Bereichen, die bei Bindung des Interaktionspartners spontan

Strukturen ausbilden (Dyson, *et al.*, 2005). Diese Möglichkeit könnte auch für den „Loop“-Bereich von Sclerostin in Betracht gezogen werden, der wie die Bindungsstudien mit dem neutralisierenden Fab-Fragment AbD09097 ergaben, die für die Wnt-Signalweg-inhibierende Funktion wichtigen Aminosäuren beinhaltet (siehe Kapitel 3.7.3).

4.4 Vergleich von Sclerostin mit bekannten BMP-Antagonisten

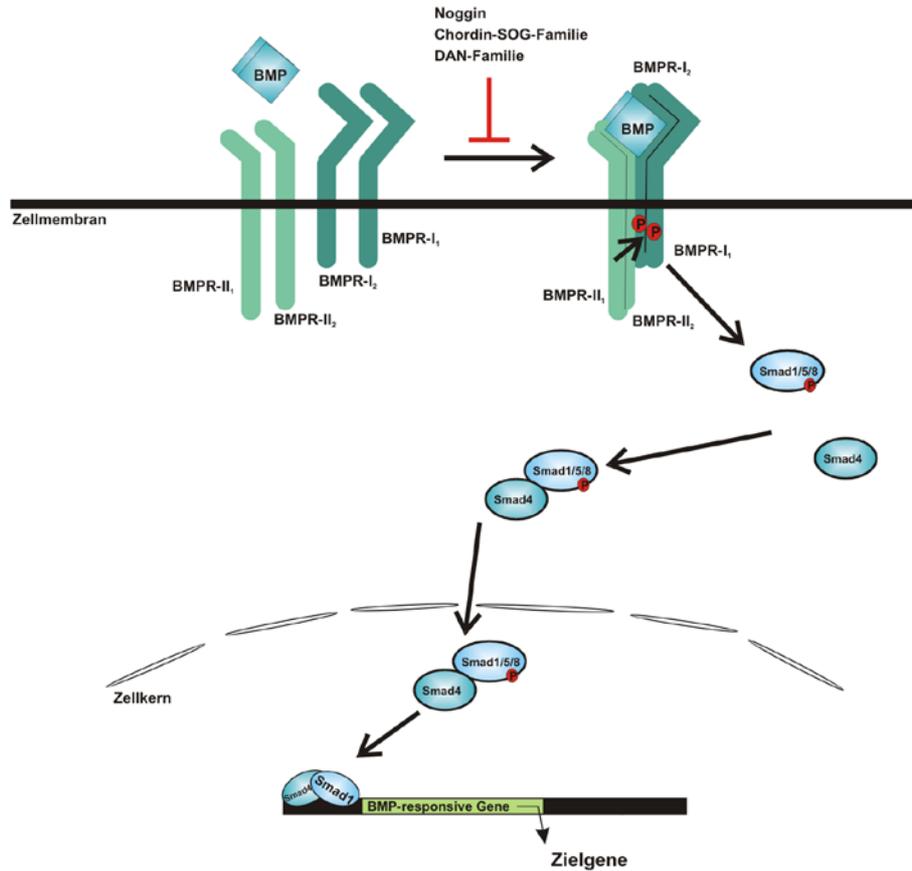
Die BMPs, Mitglieder der TGF- β -Superfamilie, üben nicht ausschließlich eine osteoinduktive Funktion aus, sondern beeinflussen zahlreiche Stadien der Embryogenese, wie die Dorsal/Ventral-Musterbildung, die Organogenese sowie die Entwicklung unterschiedlicher Gewebetypen (Hogan, 1996). Dabei fungieren sie als Signalmoleküle des BMP-Signalwegs (siehe Abb. 56 A). Durch Bindung des homodimeren BMPs an je zwei, als Typ-I und Typ-II bezeichnete, Serin-/Threoninkinase-Rezeptoren wird die Signalkaskade induziert (Abb. 56 B). Im Signalkomplex transphosphoryliert die konstitutiv aktive Serin/Threoninkinase-Domäne des Typ-II-Rezeptors den Typ-I-Rezeptor in der GS-Box, einem Glycin-Serin-haltigen Sequenzbereich, wodurch die Typ-I-Rezeptorkinase aktiviert wird (Massague, 1998, Reddi, 1997, ten Dijke, *et al.*, 2003). Die Typ-I-Rezeptorkinase phosphoryliert anschließend so genannte R-Smad-Proteine („Rezeptor-regulierte-Smads“, Smad: „**S**mall **m**other **a**gainst **d**ecapentaplegic“), die nach Oligomerisierung mit „Common-mediator-Smads“ (Smad-4) in den Zellkern wandern, wo sie mit anderen Proteinen interagieren und als Transkriptionsfaktor die Transkription von BMP-responsiven Genen induzieren (Heldin, *et al.*, 1997, Massague, 1998). Die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie lösen abhängig von ihrer Zugehörigkeit zu den BMP- oder TGF- β /Activin-Untergruppen in der Regel entweder die Smad-2/3- oder Smad-1/5/8-Signalwege aus, indem die Rezeptoren BMPR-IA, BMPR-IB und ActR-I (Activin-Rezeptor I) spezifisch die R-Smads-1, -5 und -8 und ActR-IB, ActR-IC und T β R-1 spezifisch die R-Smads-2 und -3 phosphorylieren (Moustakas, *et al.*, 2001).

Für die Formierung des BMP-Signalkomplexes binden Mitglieder der BMP-Untergruppe (mit Ausnahme von BMP-6 und BMP-7) die Typ-I-Rezeptoren (BMPR-IA, BMPR-IB) hochaffin im so genannten „Wrist“-Epitop (Wrist = Handballen), was durch die α -Helix (α 1) des einen Monomers und der Innenseite der zwei Finger des zweiten Monomers gebildet wird (siehe Abb. 56 C). Dabei wird die Struktur eines BMP-Monomers häufig mit dem Modell der „offenen linken Hand“ beschrieben (Daopin, *et al.*, 1992). Die α -Helix repräsentiert den Daumen und die β -Faltblattstränge bilden die Finger aus. Die Typ-II-Rezeptoren (BMPR-II,

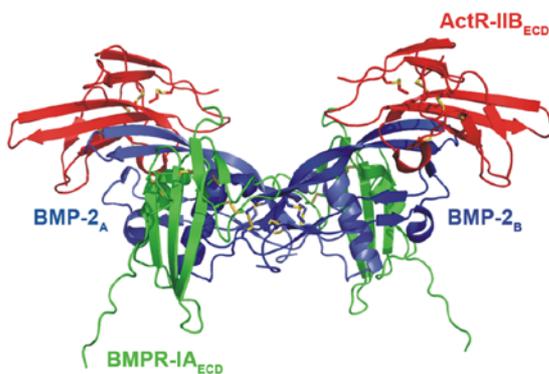
ActR-II und ActR-IIB) binden das „Knuckle“-Epitop mit deutlich niedrigerer Affinität („Knuckle“ = Fingerknöchel), welches der Außenseite der zwei Finger eines Monomers entspricht (Weber, *et al.*, 2007) (siehe Abb. 56 C). Da BMPs homodimere Proteine sind und somit an je zwei Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren binden, spielen Aviditätseffekte bei der Bildung des Signalkomplexes eine große Rolle. Die sequenzielle Bindung von BMP an den Typ-I-Rezeptor erfolgt mit einer Affinität von 30-50nM (1:1-Interaktion) (Heinecke, *et al.*, 2009), die simultane Bindung an zwei Typ-I-Rezeptoren ist mit einer Affinität von etwa 1nM deutlich höher (1:2-Interaktion) (Heinecke, *et al.*, 2009). Dieser Effekt entsteht vor allem durch Änderungen der Dissoziationsgeschwindigkeit, da durch die lokale Nähe der beiden Rezeptoren BMP-2 wesentlich langsamer aus dem Komplex dissoziiert. Die erneute Bindung an den lokalen proximalen Rezeptor erfolgt in diesem Fall schneller als die Dissoziation aus dem noch verbleibenden Ligand-Rezeptor-Komplex.

Die Regulation des BMP-Signalwegs erfolgt auf verschiedenen Ebenen. Innerhalb der Zelle wird das Signal durch inhibitorische Smad-Proteine oder Phosphatasen modelliert (Massague, *et al.*, 2000). Die Rezeptoren bzw. Smad-Proteine können über die Ubiquitin-abhängige Proteolyse abgebaut werden (Zhu, *et al.*, 1999). Weiterhin kann die Transkription durch Repressoren verhindert werden (Wotton, *et al.*, 2001). Auf Ebene der Zellmembran beeinflussen membranständige Pseudorezeptoren (z.B. BAMBI) oder Ko-Rezeptoren (z.B. DRAGON) das Signal (Babitt, *et al.*, 2006, Onichtchouk, *et al.*, 1999), während der Signalweg auf extrazellulärer Ebene durch Modulatorproteine aus mehreren Proteinfamilien reguliert wird. Hierzu gehören unter anderem die Noggin-Familie, die DAN-Familie (DAN, Cerberus, Gremlin, Sclerostin) und die Chordin-Familie (Chordin, Chordin-like-2, Crossveinless-2, etc.) (Massague, *et al.*, 2000). Wie aus den drei bisher bekannten Strukturen von BMP/Modulatorprotein-Komplexen (Noggin/BMP-7, Follistatin/Activin-A, Follistatin-like 3/Activin-A CV-2-VWC1/BMP-2) ersichtlich, weisen die Modulatorproteine strukturell wenig Gemeinsamkeiten auf (Groppe, *et al.*, 2002, Harrington, *et al.*, 2006, Stampler, *et al.*, 2008, Thompson, *et al.*, 2005, Zhang, *et al.*, 2008). Sie unterscheiden sich nicht nur in der Größe, sondern auch stark in ihrem strukturellen Aufbau. Was sie jedoch verbindet, ist die Art und Weise der Signalweginhibition.

A



B



C

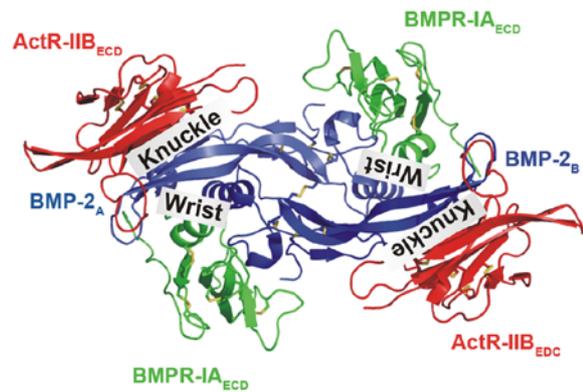


Abbildung 56: A) Schematische Darstellung des BMP-Signalwegs. B) Bänderdarstellung des ternären BMP-Signalkomplexes aus BMP-2, BMP-Rezeptor-IA (extrazellulärer Teil) und Activin-Rezeptor-IIB (extrazellulärer Teil) (Weber, *et al.*, 2007). C) Bänderdarstellung der in der X-Achse um 90° gedrehten Komplexstruktur. Die beiden Typ-I-Rezeptorbindestellen („Wrist“-Epitope) und die Typ-II-Rezeptorbindestellen („Knuckle“-Epitope) sind in die Abbildung eingezeichnet.

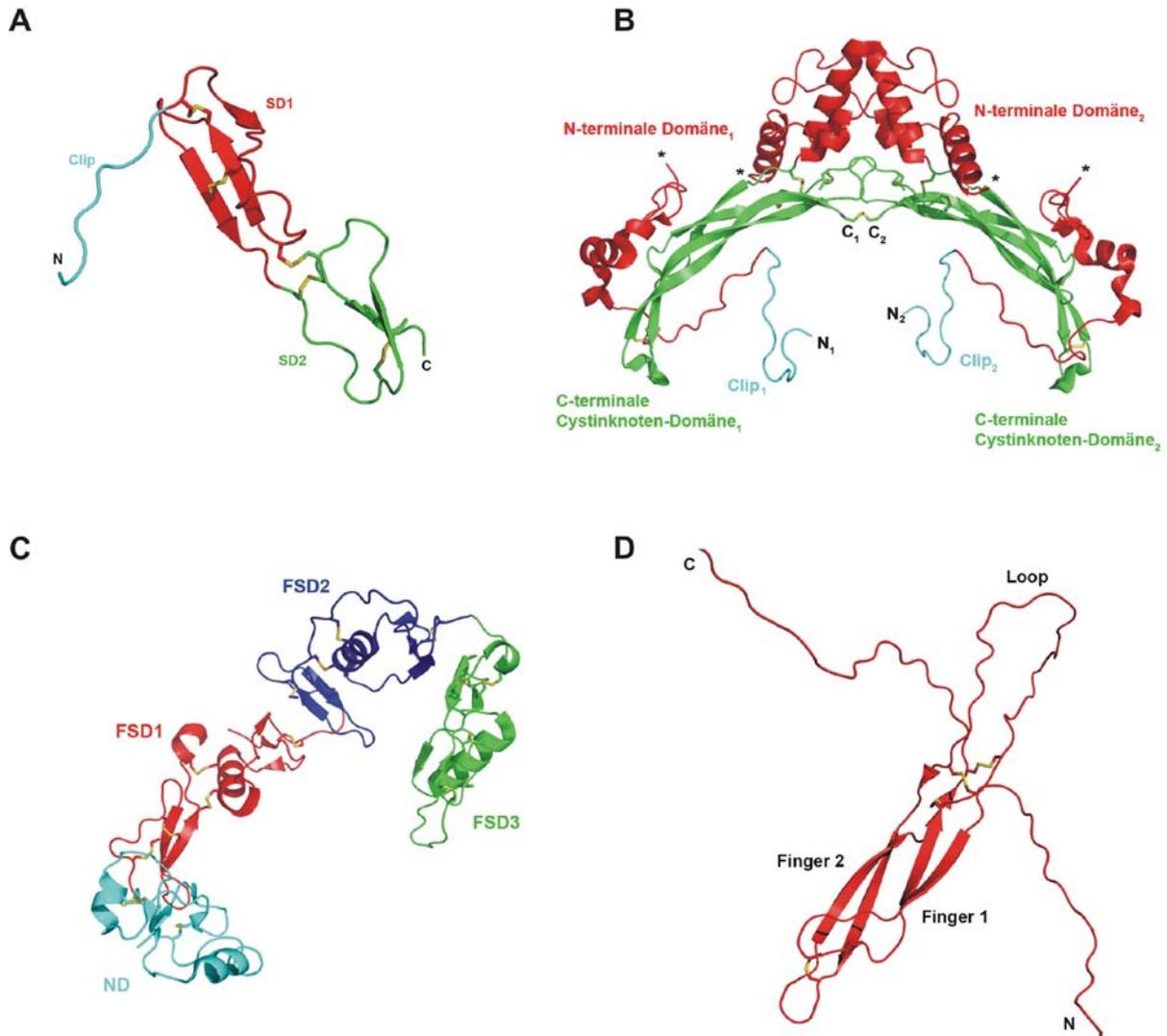


Abbildung 57: Bänderdarstellung von BMP-Antagonisten und humanem Sclerostin. (Die Strukturen der Antagonisten stammen aus den Komplexstrukturen mit BMP-2 oder Activin-A (siehe Abb. 58) A) Von Willebrand Typ C Domäne 1 von Crossveinless-2 (Zhang, *et al.*, 2008), B) Noggin (Groppe, *et al.*, 2002), C) Follistatin (Thompson, *et al.*, 2005) D) humanes Sclerostin (Veverka, *et al.*, 2009).

Als Beispiel für den molekularen Inhibitionsmechanismus der Chordinfamilie soll die Struktur des Komplexes der Von Willebrand Typ C Domäne 1 von Crossveinless-2 (CV-2 VWC-1) und BMP-2 diskutiert werden (Zhang, *et al.*, 2008) (Abb. 57 A). Die Mitglieder der Chordinfamilie sind durch ihren modularen Aufbau charakterisiert. Die dabei am häufigsten anzutreffende Domäne ist die Von Willebrand Typ C Domäne (VWC-Domäne), welche unter anderem BMPs und „Twisted Gastrulation“ (Tsg) binden kann. Dabei können sich die Bindungseigenschaften unterschiedlicher VWC-Domänen innerhalb eines Proteins stark unterscheiden. Im Fall von Crossveinless-2 bindet beispielsweise nur die erste VWC-Domäne von insgesamt fünf VWCs an BMP-2. Außer den fünf aneinander gehängten VWC-Domänen

Diskussion

besteht Crossveinless-2 noch aus einer Von Willebrand Typ D Domäne (VWD-Domäne) und einer Trypsininhibitor-ähnlichen Cystein-reichen Domäne. Über die C-terminale VWD-Domäne bindet Crossveinless-2 an die Heparansulfat-Proteoglykane und ist somit membranassoziiert (Coffinier, *et al.*, 2002, Rentzsch, *et al.*, 2006). Die BMP-bindende Domäne VWC-1 von Crossveinless-2 (Zebrafisch) besteht aus etwa 66 Aminosäuren und kann strukturell in drei Bereiche unterteilt werden, einen N-Terminus (Leu¹-Ser⁸), der als „Clip“ bezeichnet wird, eine N-terminale Subdomäne SD1 (Cys⁹-Lys⁴²) und eine C-terminale Subdomäne SD2 (Cys⁴³-Gly⁶⁶) (siehe Abb. 57 A). Die Subdomäne SD1 besteht aus einem dreisträngigen, antiparallelen β -Faltblatt, mit einem kurzen unregelmäßigen ersten Strang und zwei längeren regelmäßigen weiteren Strängen. Die erste Subdomäne wird durch zwei Disulfidbrücken stabilisiert. Die Subdomäne SD2 weist ein kurzes antiparalleles zweisträngiges β -Faltblatt auf und wird durch drei Disulfidbrücken stabilisiert, von welchen eine die Subdomänen SD1 und SD2 verbindet. Die VWC1-Domäne von Crossveinless-2 weist ähnlich wie Sclerostin keinen globulären Charakter auf und besitzt auch kein hydrophobes „Core“.

Ähnlich wie der Namensgeber der Modulatorproteinfamilie, Chordin, zeigt auch Crossveinless-2 sowohl BMP-inhibierende als auch BMP-aktivierende Aktivität, wobei die Mechanismen dieser Effekte noch nicht im Detail aufgeklärt sind (Serpe, *et al.*, 2008, Wagner, *et al.*, 2002). Es gibt zwei Faktoren, welche die gegensätzliche Aktivität von Crossveinless-2 bezüglich den BMPs beeinflussen, einerseits die Konzentration, andererseits der Ligandentyp. Bei einer Modulation der Crossveinless-2-Konzentration kann ein biphasischer Effekt beobachtet werden. Mit steigenden Konzentrationen von Crossveinless-2 steigt zunächst das BMP-Signal bis zu einem Maximum, um anschließend bei weiter ansteigenden Crossveinless-2-Konzentrationen wieder zu sinken (Kelley, *et al.*, 2009, Serpe, *et al.*, 2008). In *Drosophila*-Zellkultur kann dieser biphasische Crossveinless-2-Konzentrationseffekt für das BMP-7 ähnliche Gbb („Glass bottom boat“) beobachtet werden, wohin gegen ein Dpp-Signal (Dpp: „Decapentaplegic“, BMP-2 Homolog) durch steigende Crossveinless-2-Konzentrationen ausschließlich inhibiert wird. Ein möglicher Mechanismus der zu einer Pro-BMP-Aktivität führt wäre, dass der Crossveinless-2-BMP-Komplex im Gleichgewicht mit einer dritten Komponente, nämlich dem BMP-Typ-I-Rezeptor steht, der ebenfalls an Crossveinless-2 bindet. Dies würde zu einem Austausch von BMPs zwischen Crossveinless-2 und dem Rezeptor führen, welcher abhängig ist von der Crossveinless-2-Konzentration und den Bindungsaffinitäten des gebundenen BMPs. Durch den Austausch

wird BMP entweder dem Rezeptor zugeführt (Pro-BMP-Aktivität) oder vom Rezeptor entfernt (Anti-BMP-Aktivität) (Serpe, *et al.*, 2008). Ein anderer möglicher Mechanismus wäre, dass Crossveinless-2 das BMP-Signal durch Bindung an BMPs inhibiert und dass der Pro-BMP-Effekt unabhängig von der BMP-Bindung erfolgt, durch z.B. Bindung an andere BMP-Modulatorproteine wie Chordin oder „Twisted Gastrulation“ (Ambrosio, *et al.*, 2008, Zakin, *et al.*, 2008, Zhang, *et al.*, 2008).

Für den BMP-inhibierenden Effekt von Crossveinless-2 scheint alleinig die Domäne VWC1 verantwortlich zu sein, wobei die Domäne BMP ähnlich einer Heftklammer bindet und hierbei sowohl die Typ-I- als auch die Typ-II-Rezeptorbindestellen blockiert (siehe Abb. 58 A, D). Pro BMP-Dimer binden zwei Crossveinless-2-Proteine. Hierbei blockiert die Subdomäne SD1 das „Knuckle“-Epitop, also die Bindestelle des Typ-II-Rezeptors und der N-Terminus faltet wie eine Heftklammer über die zwei Finger des BMP-Monomers und bindet im „Wrist“-Epitop, wodurch auch die Bindestelle des Typ-I-Rezeptors abgeschirmt wird (Zhang, *et al.*, 2008).

Die Subdomäne SD1 blockiert nur einen kleinen Teil des Typ-II-Rezeptorepitops durch vorwiegend hydrophobe Interaktionen. Dabei stellen die Disulfidbrücke zwischen Cys²⁹-Cys³⁸ und Ile²¹ die Hauptbindungs determinanten dieser Interaktion dar. Beide Cysteinreste sind in allen VWC-Domänen der Chordin-Familie konserviert und auch Ile²¹ ist in der Regel zumindest durch Aminosäuren mit großen hydrophoben Resten ersetzt. Die umgebenden Reste variieren stark in den unterschiedlichen VWC-Domänen der Chordin-Familie und bieten dadurch die Möglichkeit die Bindungsaffinität der VWC-Domänen an die BMPs zu modulieren (Zhang, *et al.*, 2008).

Die Interaktion zwischen dem N-Terminus von Crossveinless-2 und dem „Wrist“-Epitop von BMP-2 basiert auf fünf Wasserstoffbrücken zwischen Crossveinless-2 und BMP-2, die auf Crossveinless-2-Seite durch Hauptkettenatome gebildet werden. Hierdurch spielt der Seitenkettentyp keine große Rolle für die Interaktion, wodurch eventuell die geringe Sequenzkonservierung der VWCs in der Clipregion erklärt werden kann. Außerdem wird die Interaktion durch die ausschließliche Verwendung von Hauptkettenatomen hoch kooperativ. Die Interaktion umfasst auch hydrophobe Wechselwirkungen, wobei die Seitenkette von Ile² (Crossveinless-2) die „knob-into-hole“-Interaktion des Phe⁸⁵ von BMPR-IA nachahmt (Zhang, *et al.*, 2008).

Diskussion

Die SD1-Domäne von Crossveinless-2 bindet BMP-2 auch ohne die „Clip“-Region, jedoch mit niedriger Affinität. Dies gilt wahrscheinlich ebenso für die „Clip“-Region. Die hohe Affinität der Interaktion von Crossveinless-2 und BMP-2 von 20nM wird somit durch die hohe Kooperativität der Bindung von N-Terminus und SD1 generiert, so dass die einzelnen Regionen nur eine geringe Affinität bewerkstelligen müssen (Zhang, *et al.*, 2008).

Noggin ist ein sekretiertes Glykoprotein, besteht aus 232 Aminosäuren (humanes Noggin) und bildet ein über eine Disulfidbrücke kovalent verbrücktes Homodimer. Es besteht aus einer N-terminalen Hälfte mit einer großen Zahl negativ geladener Aminosäuren (Glu, Asp) und einer Cystein-reichen C-terminalen Hälfte (Groppe, *et al.*, 2002) (siehe Abb. 57 B). Durch die dazwischen angeordnete Heparinbindungsstelle wird Noggin wahrscheinlich an die Zelloberfläche gebunden und dort immobilisiert. Die N-terminale Hälfte besteht aus sich abwechselnden Schleifen- und α -helikalen Sekundärstrukturelementen, wovon Helix α 3 und α 4 Teil der Dimerbindestelle des Homodimers sind. Die C-terminale Hälfte beinhaltet einen Cystinknoten, der anders als bei den Familienmitgliedern der DAN-Familie aus 12 Aminosäuren besteht (CX₅C, CXC, C, C). Auch in diesem Fall wird die Struktur der Cystinknoten-bildenden C-terminalen Hälfte durch die architekturbestimmenden Eigenschaften des Cystinknotens vorgegeben. Zwei der drei von dem Cystinknoten ausgehenden Schleifen (Finger 1 und Finger 2), bilden β -Faltblattelemente aus. Die Fingerspitze von Finger 2 wird durch eine zusätzliche Disulfidbrücke stabilisiert. Die dritte vom Cystinknoten ausgehende Schleife besteht, anders als bei Sclerostin, nur aus sieben Aminosäuren und ist Teil der Dimerbindestelle. Die Dimerisierung der beiden Noggin-Monomere erfolgt in einer so genannten „Kopf-zu-Kopf“-Formation, wobei die beiden Helices α 3 und α 4, kurz vor dem ersten Cysteinrest des Knotens, zur Dimerisierung beitragen. Beide Monomere werden durch eine Disulfidbrücke kovalent verbunden, die aus den letzten C-terminalen Cysteinen des jeweiligen Monomers gebildet wird.

Aus der Komplexstruktur von Noggin und BMP-7 wird deutlich, dass die Inhibitionsmechanismen von Noggin und der VWC1-Domäne von Crossveinless-2 nach ähnlichem Prinzip erfolgen (Zhang, *et al.*, 2008) (siehe Abb. 58 B, E). Da Noggin ein Homodimer bildet, ist die Komplexstöchiometrie von Noggin und BMP-7 1:1. Noggin besetzt wie Crossveinless-2 sowohl die Typ-I- als auch die Typ-II-Rezeptorbindestellen von BMP-7. Wie eine Heftklammer blockieren die ersten zehn Reste des N-Terminus, ebenfalls „Clip“ genannt, das konkave „Wrist“-Epitop (Typ-I-Rezeptorbindestelle), wobei ein Prolinrest von

Noggin die „knob-into-hole“-Wechselwirkung des Phenylalaninrests der Typ-I-Rezeptoren BMPR-IA und BMPR-IB imitiert. Die darauf folgenden Reste des N-Terminus und die beiden Finger der C-terminalen Hälfte binden das konvexe „Knuckle“-Epitop (die Typ-II-Rezeptorbindestelle). Die Noggin-BMP-7-Interaktion weist für beide Bindestellen vorwiegend hydrophoben Charakter auf.

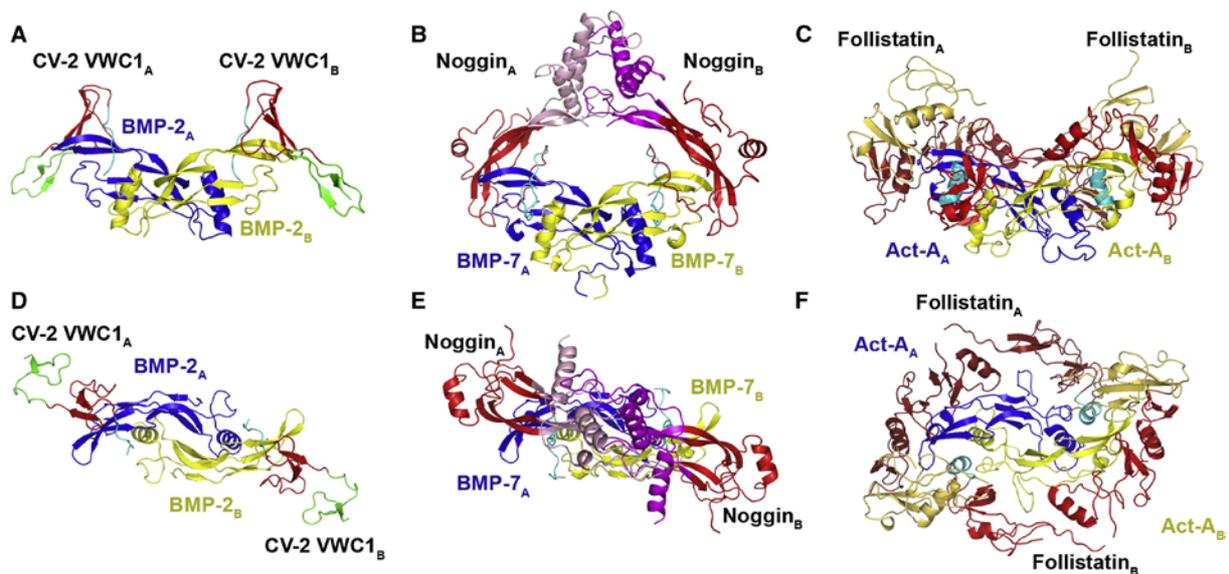


Abbildung 58: Bänderdarstellung der verschiedenen BMP/BMP-Antagonisten-Komplexstrukturen: A) Komplex der VWC-1 von Crossveinless-2 mit BMP-2 (Zhang, *et al.*, 2008). B) Komplex aus Noggin und BMP-7 (Groppe, *et al.*, 2002). Komplex aus Follistatin und Activin-A (Thompson, *et al.*, 2005). Abbildung aus Zhang *et al.*, 2008, 14, *Developmental Cell* übernommen (Zhang, *et al.*, 2008), mit Genehmigung durch Elsevier.

Die Interaktion von Follistatin und Activin A, einem weiteren Mitglied der TGF- β -Familie, zeigt ebenfalls Möglichkeiten der Inhibition von TGF- β - und BMP-Mitgliedern auf. Auch in diesem Fall blockiert das modular aufgebaute Follistatin sowohl die Typ-I- als auch die Typ-II-Rezeptorbindestellen des Activin A-Homodimers (Thompson, *et al.*, 2005) (siehe Abb. 57 C, 58 C, F). Hierbei wird das „Knuckle“-Epitop (die Typ-II-Rezeptorbindestelle) durch die Domänen FSD1 und FSD2 gebunden. Im Gegensatz zu Noggin und Crossveinless-2 wird das „Wrist“-Epitop (Typ-I-Rezeptorbindestelle) hier jedoch von einer globulären N-terminalen Domäne (ND) von Follistatin abgeschirmt.

Neben der Noggin- und Chordin-Familie zählen auch Mitglieder der DAN-Familie zu den BMP-Antagonisten (Hsu, *et al.*, 1998). Bisher gibt es hierfür noch keine Antagonist/BMP-

Diskussion

Komplexstrukturen, die Hinweise bezüglich des Inhibitionsmechanismus dieser Familie liefern würden. Die in dieser Arbeit vorgestellte Struktur von Sclerostin, bietet jedoch erste Einblicke in strukturelle Besonderheiten dieser Familie. Aufgrund der Zugehörigkeit zur DAN-Modulatorproteinfamilie wurde Sclerostin zunächst ebenfalls als BMP-Antagonist eingestuft und die Interaktion zwischen beiden Proteinen durch verschiedene Methoden belegt (Kusu, *et al.*, 2003, Winkler, *et al.*, 2003). Auch unter den von uns gewählten Bedingungen bindet Sclerostin immer noch an BMP-7, BMP6 und BMP-2, wenn auch mit sehr niedrigen Affinitäten im μM -Bereich (siehe 3.4.3). Zudem weisen die SPR-Messkurven der Interaktion einen biphasischen Verlauf auf und aufgrund des stetig ansteigenden Kurvenverlaufs während der Assoziation scheint die Interaktion nicht in ein Gleichgewicht zu münden. Die von Winkler *et al.* veröffentlichten Affinitäten (0.9–3.4nM) konnten von uns nie reproduziert werden (Winkler, *et al.*, 2003).

Sowohl Sclerostin als auch die BMPs erfordern aufgrund ihrer Oberflächenbeschaffenheit spezielle Messbedingungen. Durch die große Zahl von Argininen und Lysininen weist Sclerostin eine positive Oberflächenladung auf, die bei niedrigen Salzkonzentrationen zu unspezifischen ionischen Wechselwirkungen führen kann. Um diese unspezifischen Wechselwirkungen mit der Chipoberfläche zu verhindern, wurden die Messungen unter hohen Salzkonzentrationen durchgeführt. Auch für SPR-Messungen mit BMPs werden normalerweise Hochsalzbedingungen gewählt, um unspezifische Wechselwirkungen der basischen Reste zu vermeiden. Die Wahl der Messbedingungen bedeutet allerdings für die Sclerostin/BMP-Interaktion, dass einerseits auch spezifische ionische Wechselwirkungen unterdrückt und andererseits unspezifische hydrophobe Interaktionen verstärkt werden können. Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, ob die messbaren niederaffinen Interaktionen zwischen Sclerostin und BMP-7 bzw. BMP-2 spezifisch oder unspezifisch sind. Unter physiologischen Bedingungen liegt die Affinität der 1:1-Interaktion von BMP-2 und seinem auf der Zellmembran lokalisierten Typ-I-Rezeptor BMPR-IA bei 30-50nM (Heinecke, *et al.*, 2009). Durch Aviditätseffekte ist die Interaktion mit zwei Typ-I-Rezeptoren, wie im Signalkomplex auf der Zellmembran, durch eine langsamere Dissoziation deutlich affiner (Heinecke, *et al.*, 2009). Die bekannten BMP-Antagonisten verhindern jedoch den ersten Schritt nämlich die Rekrutierung von BMPs an die Zelloberfläche durch den Typ-I-Rezeptor. Um diesen Schritt effektiv zu inhibieren, binden die bekannten Antagonisten BMP-2 mit deutlich höherer Affinität im Vergleich zur Interaktion von BMP-2 mit seinem Typ-I-Rezeptor (Crossveinless-2 $K_D = 22\text{nM}$ (Rentzsch, *et al.*, 2006), Noggin $K_D = 19\text{pM}$

(Zimmerman, *et al.*, 1996), Chordin $K_D = 12\text{nM}$ (Rentzsch, *et al.*, 2006), Follistatin $K_D = 20\text{nM}$ (Amthor, *et al.*, 2002)). Im Gegensatz hierzu ist die Affinität von Sclerostin und den BMPs deutlich niedriger (etwa $1\mu\text{M}$) als die Bindung von BMP-2 an die Typ-I-Rezeptoren und würde unter physiologischen Bedingungen nicht ausreichen, um ein BMP-Signal effizient zu inhibieren. Bei Abschätzung der benötigten lokalen Sclerostinkonzentration für eine effektive Inhibition der BMP-2/Typ-I-Rezeptor-Interaktion durch Sclerostin nach folgender Formel,

$$K_I = IC_{50} / (1 + (L_T / K_D))$$

wären etwa $10\text{-}100\mu\text{M}$ Sclerostin notwendig, um die Interaktion mehr als 90% zu inhibieren ($IC_{50}=1\mu\text{M}$). Für die Berechnung der Konzentration, die für eine halbmaximalen Inhibition benötigt wird (IC_{50}), wird für die Dissoziationskonstante des Inhibitors (K_I) der Sclerostin/BMP-2-Interaktion ein Wert von $1\mu\text{M}$ angenommen, für die Ligandenkonzentration (L_T) von BMP-2 im Gewebe 100pM (Shimmi, *et al.*, 2003) und für die Dissoziationskonstante (K_D) der BMP-2/BMPRI-Interaktion 50nM . Derart hohen Konzentrationen für Inhibitoren im Gewebe sind derzeit jedoch nicht bekannt. Die niedrige Affinität der Sclerostin-BMP-Interaktion deutet somit eher auf eine unspezifische Wechselwirkung beider Proteine hin. Hierfür spricht auch, dass Sclerostin, im Gegensatz zu erwiesenen BMP-Antagonisten (z.B. der Domäne VWC-1 von Crossveinless-2) im BMP-Reporter-gen-Nachweisverfahren ein direktes BMP-Signal nicht zu inhibieren vermag (siehe 3.4.2) (van Bezooijen, *et al.*, 2007), während Sclerostin den Wnt-Signalweg direkt hemmt.

Es stellt sich die Frage, ob auch anhand der nun bekannten Struktur von Sclerostin ein Einfluss des Proteins auf den BMP-Signalweg als direkter Antagonist ausgeschlossen werden kann. Wie erwähnt, zeigen die bekannten Antagonistenstrukturen bisher keinerlei Gemeinsamkeiten, ähneln sich aber in Art und Weise des Inhibitionsmechanismus. Die vorgestellten Antagonisten blockieren sowohl die Typ-I- als auch die Typ-II-Rezeptorbindestellen des BMP-Dimers entweder durch verschiedene Domänen, oder durch die Kombination einer Domäne und des N-Terminus, der in Art einer Heftklammer die Finger überspannt und das „Wrist“-Epitop blockiert.

Aufgrund der Struktur kann Sclerostin zwar nicht als BMP-Antagonist ausgeschlossen werden, da es aber nicht aus verschiedenen Domänen aufgebaut ist, ist ein Inhibitionsmechanismus nach dem Prinzip von Follistatin schwer vorstellbar. Somit bleibt

Diskussion

alternativ ein Crossveinless-2- oder Noggin-ähnlicher Mechanismus nach dem Prinzip einer Heftklammer.

Sclerostin ähnelt strukturell der C-terminalen Hälfte von Noggin, da es sich hier ebenfalls um ein Cystinknotenprotein handelt. So könnte, wie bei Noggin, der Fingerbereich von Sclerostin möglicherweise im „Knuckle“-Epitop von BMPs binden und einer der flexiblen Termini könnte als Clip fungieren und das „Wrist“-Epitop blockieren. Dagegen spricht jedoch, dass die Finger von Sclerostin keine hydrophoben und nach außen gerichteten Aminosäuren aufweisen, die wie im Fall von Noggin und Crossveinless-2 durch hydrophobe Interaktionen das „Knuckle“-Epitop blockieren könnten. Hydrophobe Aminosäuren, die nach außen gerichtet sind, kommen nur im „Loop“-Bereich von Sclerostin vor.

Außerdem zeigen der C-Terminus und der vordere Teil (Gln¹-Glu³⁵) des N-Terminus von Sclerostin keinen Einfluss auf die Bindung an BMP-7, da die Bindung der Trunktationsvarianten von murinem Sclerostin an BMP-7 analog zum wildtypischen Protein verläuft (siehe Kapitel 3.4.3). Sie fungieren somit nicht als „Clip“ und tragen auch nicht durch einen kooperativen Effekt zur Steigerung der Bindungsaffinität bei. Um auszuschließen, dass die Aminosäuren Asn³⁶-Tyr⁵³ die Clip-Funktion übernehmen, müsste Sclerostin weiter N-terminal verkürzt werden und die Interaktion mit BMPs analysiert werden.

Da Sclerostin also nicht über mehrere Domänen verfügt und wahrscheinlich auch keine „Clip“-Region besitzt, kann davon ausgegangen werden, dass Sclerostin eher kein klassischer BMP-Antagonist ist.

Um letzte Zweifel auszuschließen und eindeutig zu klären, ob Sclerostin BMPs in definierten Bindeepitopen bindet, könnten Kompetitionsstudien mit den Fab-Fragmenten der Firma AbD-Serotec durchgeführt werden. Nach Abschluss der Bindeepitop-Charakterisierung der Fab-Fragmente an Sclerostin, müsste für eine spezifische Sclerostin-BMP-Interaktion ein Fab-Fragment identifizierbar sein, welches mit BMPs um die Bindung an Sclerostin konkurriert und somit ein spezifisches Epitop abdeckt. Kann kein einzelnes Fab-Fragment identifiziert werden, oder konkurrieren mehrere Fab-Fragmente mit unterschiedlichen Sclerostin-Bindeepitopen mit den BMPs um die Sclerostinbindung, so kann ein spezifisches Bindeepitop der BMPs auf Sclerostinseite und somit eine spezifische Wechselwirkung von BMPs und Sclerostin ausgeschlossen werden.

4.5 Sclerostin, Mitglied der DAN-Familie?

Die anfängliche Einordnung von Sclerostin in die DAN-Familie führte zu der Annahme, dass Sclerostin wie alle Mitglieder dieser Familie als Antagonist der TGF- β -Familie fungiert (Avsian-Kretchmer, *et al.*, 2004, Biben, *et al.*, 1998, Hsu, *et al.*, 1998). Wie im vorigen Kapitel diskutiert, hat Sclerostin jedoch keinen direkten Einfluss auf den BMP-Signalweg, was bedeutet, dass Sclerostin kein direkter BMP-Antagonist ist. Worauf beruht dann aber die Zuordnung zu dieser Proteinfamilie und macht diese Einordnung noch immer Sinn? Die Sequenzidentität der in Abbildung 59 A analysierten Vertreter der DAN-Familie (DAN, Gremlin, Cerberus, USAG-1 und Sclerostin) beschränkt sich einzig auf die Cysteine des Cystinknotenmotivs und der zwei zusätzlichen Cysteine, die in Sclerostin die beiden Finger über eine Disulfidbrücke kovalent verbinden. Die verbleibende Sequenz weist eine Identität von kleiner 3% auf. Für Sclerostin und USAG-1 hingegen liegt die Sequenzidentität bei 38%. Dies spiegelt sich auch im phylogenetischen Baum der analysierten Proteine wider (siehe Abb. 59 B). Hier teilt sich der Baum in zwei Hauptarme, zum einen Sclerostin und USAG-1 und zum anderen DAN, Gremlin und Cerberus. Die Proteine Sclerostin und USAG-1 unterscheiden sich außerdem von den anderen verwandten Vertretern durch das Fehlen des Cysteins, zwei Aminosäuren vor Cys¹⁰⁹ (Nummerierung bezieht sich auf murines Sclerostin), welches im Fall von Cerberus für die kovalente Verbrückung bei der Dimerisierung verantwortlich ist (Biben, *et al.*, 1998). Auch die isoelektrischen Punkte der Proteine weichen deutlich voneinander ab. Gremlin, Sclerostin und USAG-1 weisen pIs um 9.5 auf, DAN einen pI von 5.5 und Cerberus einen pI von 7.7. Diese Differenzen in der Oberflächenladung weisen auf mögliche Varianzen in der Funktion der Proteine hin. Die Länge der Termini ist ebenfalls sehr uneinheitlich. Der N-terminale Bereich vor dem ersten Cystein variiert zwischen 18 Aminosäuren im Fall von DAN und 144 Aminosäuren im Fall von Cerberus. Da die Termini keinerlei homologe Bereiche enthalten, wurden sie im Sequenzvergleich nicht mit einbezogen.

Da es sich bei allen Vertretern der DAN-Familie um Proteine mit Cystinknotenmotiv handelt, ist es sehr wahrscheinlich, dass sie auch strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen. Wie der Cystinknoten vorgibt, werden drei Schleifen von dem Knotenmotiv ausgehen, wovon zwei Schleifen (Finger 1 und 2) wahrscheinlich β -Faltblattelemente ausbilden.

Der Aminosäuresequenzbereich der Proteine zwischen Cysteinrest C¹ und Cysteinrest C² (Finger 1) zeigt wenig Sequenzhomologie (Abb. 59 A, C). Außer dem konservierten Cysteinrest C', der im murinen Sclerostin die beiden Finger verbindet, sind noch die Aminosäuren Val⁶⁴, Val⁷⁵ und Val⁷⁹ in den verwandten Vertretern durch homologe Aminosäuren (Ile oder Leu) ausgetauscht. Sie sind Teil des hydrophoben Bereichs, der die zwei Finger in murinem Sclerostin durch hydrophobe Kontakte stabilisiert. Der für die Konformation der Hauptkette wichtige Prolinrest Pro⁷⁴ (murines Sclerostin), ist hingegen nur in Sclerostin und USAG-1 konserviert und fehlt in DAN, Gremlin und Cerberus.

Die Anzahl der Aminosäuren der Schleifenbereiche spielt aber eine wichtige Rolle für die Bildung der Disulfidbrücken des Knotens. Wurde der Aminosäuresequenzbereich zwischen den Cysteinen Cys⁵⁵ und Cys⁸⁰ (Finger 1) bzw. Cys¹⁰⁹ und Cys¹⁴⁰ (Finger 2) von murinem Sclerostin durch die entsprechenden Aminosäuren von Gremlin ausgetauscht, konnte das denaturierte Protein nicht rückgefaltet werden. Wurde hingegen der N-Terminus von Sclerostin durch den entsprechenden Aminosäuresequenzbereich von Gremlin ersetzt, konnte das chimäre Protein rückfalten und zeigte biologische Aktivität im Wnt-Reportergen-Nachweisverfahren.

Der Vergleich des „Loop“-Bereichs zwischen den Cysteinresten C³ und C⁴ zeigt, dass in diesem Bereich die größten Unterschiede vorliegen (Abb. 59 A, C). Außer dem Prolinrest (Pro⁹¹ murines Sclerostin), der konserviert ist und Leu⁹⁰, welches homolog ersetzt ist (Ile, Val, Phe), ist keine Sequenzähnlichkeit vorhanden. Die große Anzahl von Prolinresten und Glycinresten, die ein Charakteristikum dieses Sequenzbereichs von Sclerostin darstellen, sind nur in USAG-1 teilweise konserviert und fehlen in DAN, Gremlin und Cerberus vollständig. Auffällig ist zudem die große Varianz der „Loop“-Länge, wobei USAG-1 in diesem Bereich vier Aminosäuren mehr, DAN und Gremlin drei Aminosäuren weniger und Cerberus sogar sechs Aminosäuren weniger aufweisen als Sclerostin.

Wie die Studien mit den Anti-Sclerostin Fab-Fragmenten ergaben, liegt der für die Wnt-Signalweg-inhibitorische Funktion von Sclerostin verantwortliche Sequenzbereich in dieser Region des Proteins. Daraus kann gefolgert werden, dass Gremlin, DAN und Cerberus, aufgrund der großen Unterschiede in diesem Sequenzbereich, wahrscheinlich keine antagonistische Wirkung auf den Wnt-Signalweg ausüben werden.

Ein weiterer Unterschied in diesem Sequenzbereich ist der zusätzliche Cysteinrest drei Aminosäuren vor C⁴, welcher in Sclerostin und USAG-1 fehlt. Er dient entweder wie im Fall von Gremlin und Cerberus dazu, dass je zwei Monomere dimerisieren (Biben, *et al.*, 1998,

Diskussion

oder, wie für DAN angenommen wird, für die Bildung einer zusätzlichen intramolekularen Disulfidbrücke mit einem weiteren Cysteinrest drei Aminosäuren hinter C6 {Avsian-Kretchmer, 2004 #10). Wird für Gremlin und Cerberus von einer Dimerbildung ausgegangen, so wird der „Loop“-Bereich dieser Proteine mit an der Ausbildung der Dimerkontaktstelle beteiligt sein und durch das zweite Monomer strukturell stabilisiert werden. Somit könnte die Ausbildung von einer α -Helix wie in den BMPs oder β -Faltblattelementen für diesen Bereich möglich werden, was einen deutlichen Unterschied zu Sclerostin darstellt.

Der Sequenzbereich der analysierten Proteine zwischen den Cysteinresten C⁴ und C⁵ (Finger 2, Abb. 59 A, C), ist ebenfalls unterschiedlich. Auch hier variiert die Anzahl der Aminosäuren, wobei sich die Unterschiede auf den Schleifenbereich in der Fingerspitze beschränken. Es sind jedoch auch hier die Aminosäurereste Val¹¹⁹, Val¹³⁴ und Val¹³⁷ (murines Sclerostin) homolog ausgetauscht (Ile oder Leu), die mit den hydrophoben Resten des ersten Fingers durch hydrophobe Wechselwirkungen die beiden Finger stabilisieren. Außerdem sind der Cysteinrest Cys¹²³ und der Leucinrest Leu¹²¹ (murines Sclerostin) in allen analysierten Proteinen konserviert. Beide Reste sind essentiell für die Fixierung der sich überkreuzenden Fingerspitzen. Der Cysteinrest C⁴ bildet eine Disulfidbrücke mit C⁵ und Leu¹²¹ ist für hydrophobe Wechselwirkungen mit Val⁶⁴ des ersten Fingers notwendig.

Auffällig ist jedoch, dass der hohe Anteil von Argininen und Lysinen, der in Sclerostin und USAG-1 konserviert ist, in DAN und Cerberus durch andere Aminosäuren ersetzt ist. Gremlin hat in diesem Bereich ebenfalls einen hohen Anteil an Argininen und Lysinen. Diese befinden sich allerdings im Vergleich zu Sclerostin an anderen Positionen. Da diese Arginine und Lysine laut Veverka *et al.* in Sclerostin Teil der Heparinbindungsstelle sind, kann daraus gefolgert werden, dass DAN und Cerberus in diesem Bereich wahrscheinlich keine Heparinbindungsstelle aufweisen. (Veverka, *et al.*, 2009).

Abschließend lässt sich sagen, dass sich die strukturelle Ähnlichkeit zwischen DAN, Cerberus, Gremlin und Sclerostin wahrscheinlich auf wenige Bereiche konzentriert. Diese sind der Cystinknoten und die daraus folgende Schleifenarchitektur. Finger 1 und Finger 2 werden wahrscheinlich Faltblattelemente ausbilden, wobei sich diese Elemente in Länge und Lage von Sclerostin unterscheiden werden. Ähnlichkeiten treten im hydrophoben Bereich zwischen den Fingern auf. Hier sind die meisten hydrophoben Reste konserviert oder homolog ersetzt und bilden daher wahrscheinlich ein ähnliches Interaktionsnetzwerk. Die Fingerspitzen werden sich möglicherweise ebenfalls überkreuzen, da die beiden Cysteine, die

in Sclerostin die Finger kovalent verbinden und die beiden hydrophoben Reste Val⁶⁴ und Leu¹²¹ (murines Sclerostin), die einen hydrophoben Bereich zwischen den Fingerspitzen bilden, konserviert sind. Unterschiede bestehen besonders in der „Loop“-Region und in der Dimerisierung der anderen Vertreter der DAN-Familie (Cerberus und Gremlin). Aufgrund der sehr geringen Sequenzhomologie, der Dimerbildung und der unterschiedlichen Funktionen der Proteine wäre die Einordnung von Sclerostin und USAG-1 in eine eigene Familie oder Unterfamilie somit erforderlich.

4.6 Inhibitionsmechanismen von Wnt-Signalweg-Antagonisten

Der kanonische Wnt- β -Catenin-Signalweg (siehe Kapitel 1.4) wird auf der extrazellulären Ebene durch verschiedene Modulatorproteine reguliert. Wif-1, ein sekretiertes Protein mit konservierter WIF-Domäne und sFRPs („secreted frizzled-related proteins“), lösliche dominant-negative Rezeptoren mit einer N-terminalen Cystein-reichen Domäne (CRD), die hoch homolog und strukturell identisch zu der Liganden-Bindungsdomäne der Frizzled-Rezeptoren ist, regulieren den Wnt-Signalweg durch die direkte Bindung an Wnt, wodurch die Bildung des Signalkomplexes verhindert wird (Hsieh, *et al.*, 1999a, Hsieh, *et al.*, 1999b, Kawano, *et al.*, 2003). Dkk-Proteine (Dickkopf), USAG-1 und Sclerostin hingegen inhibieren den Signalweg durch die Interaktion mit dem Wnt-Ko-Rezeptor LRP5/6. Dkk-Proteine (Dickkopf-1, -2, -4) binden hierbei an den Ko-Rezeptor LRP5/6 und einen weiteren Rezeptor Kremen1/2. Die Bildung dieses ternären Komplexes führt zur Endozytose der Rezeptoren, wodurch die Menge von LRP5/6 auf der Zelloberfläche reguliert, bzw. verringert wird (Mao, *et al.*, 2003, Mao, *et al.*, 2002, Mao, *et al.*, 2001).

Als putative Bindestelle für Dkk-Proteine wurde der dritte YWTD-Typ- β -Propeller zusammen mit der EGF-ähnlichen Domäne von LRP5/6 identifiziert, wobei auch die ersten beiden YWTD-Typ- β -Propeller-Domänen eine schwache Bindung von Dkk-Proteinen zeigten (siehe Abb. 60). Es wird vermutet, dass die EGF-ähnlichen Domänen von LRP5/6 für die Proteinbindung keine Rolle spielen und somit lediglich die YWTD-Typ- β -Propeller-Domänen das Bindeepitop darstellen.

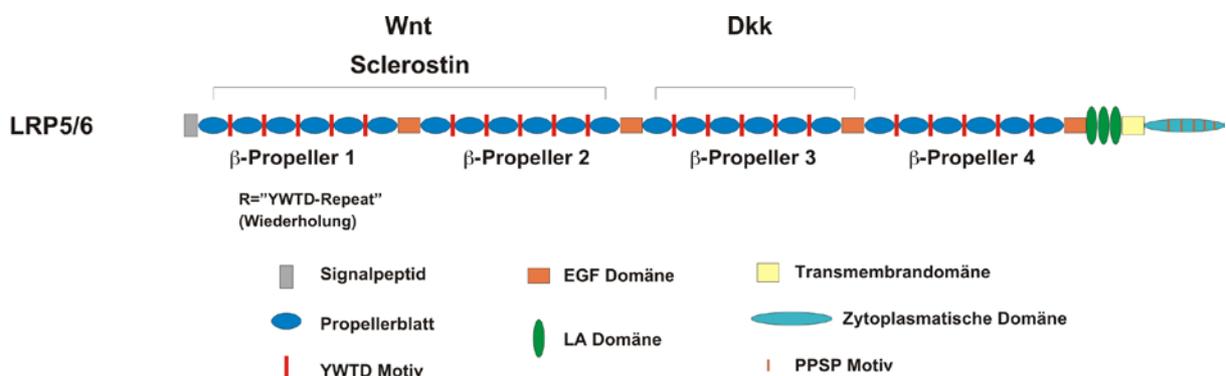
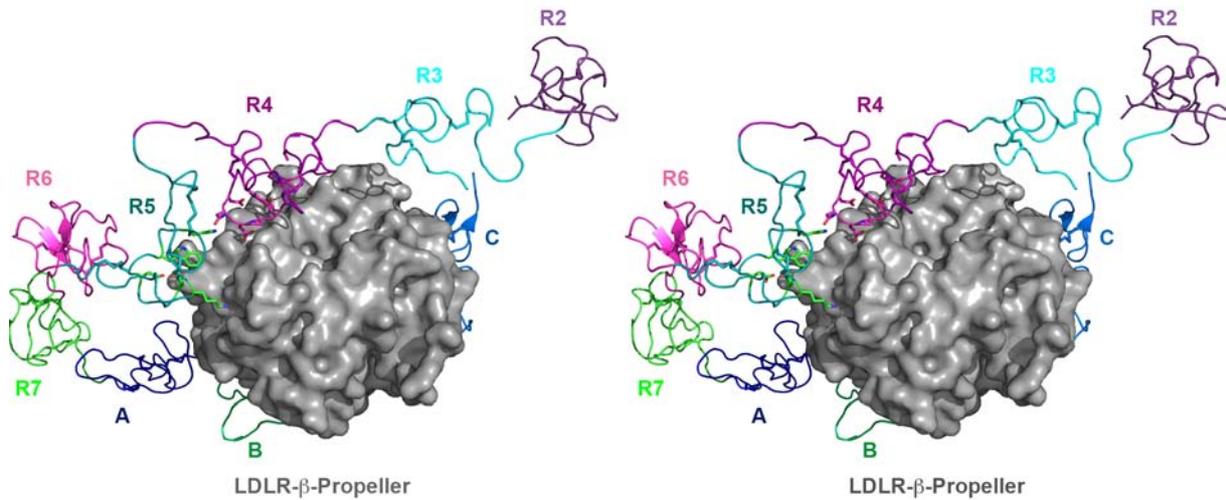


Abbildung 60: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von LRP5/6. Abbildung nach Ai *et al.*, 2005, Mol Cell Biol (Ai, *et al.*, 2005).

A



B

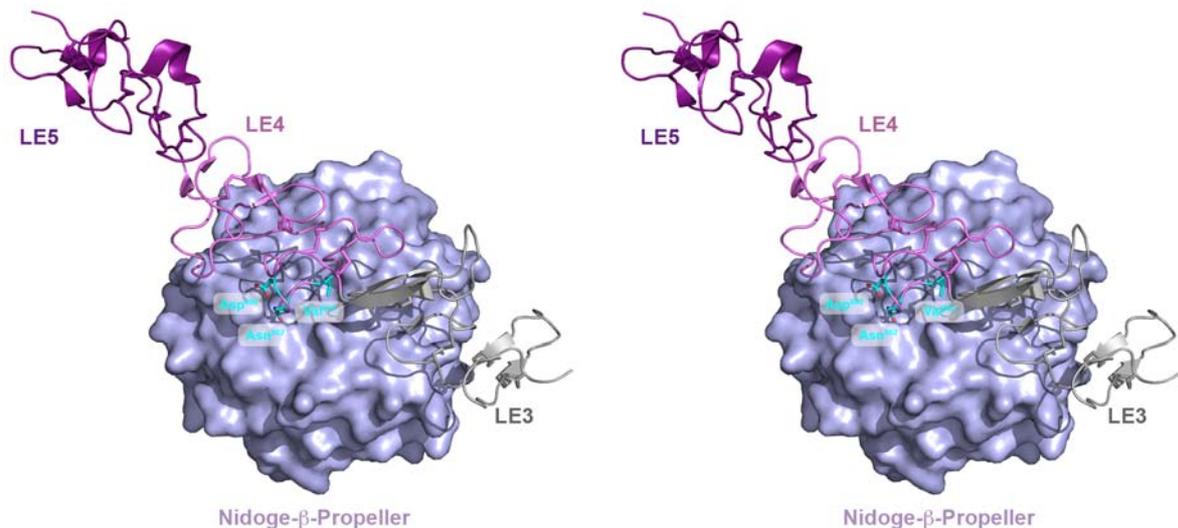


Abbildung 61: Beispiele für die Interaktion eines Proteins mit einer typischen β -Propeller-Domäne. A) Stereoansicht der intramolekularen Interaktion der Domänen R4 und R5 des LDL-Rezeptors mit der β -Propeller-Domäne des LDL-Rezeptors (Rudenko, *et al.*, 2002). B) Stereoansicht der Interaktion der Domänen LE3 und LE4 von Laminin mit der β -Propeller-Domäne von Nidogen (Takagi, *et al.*, 2003).

Für die Interaktion eines Proteins mit einer typischen β -Propeller-Domäne sind derzeit einige wenige Strukturbeispiele bekannt. Eine Variante stellt die intramolekulare Interaktion der vierten LA-Domäne mit der YWTD-Typ- β -Propeller-Domäne des LDL-Rezeptors dar (Rudenko, *et al.*, 2002). Hier bindet die LA-Domäne (R4 und R5) seitlich auf den Propellerblättern (siehe Abb. 61 A). Ein anderes Beispiel repräsentiert die Interaktion von

Diskussion

Laminin mit der YWTD-Typ- β -Propeller-Domäne von Nidogen, beides Proteoglykane der extrazellulären Matrix (Takagi, *et al.*, 2003). Hier bindet Laminin quer über die Mitte des YWTD-Typ- β -Propellers hinweg unter Nutzung der zentralen Mulde des β -Propellers. Eine flexible Schleife („Loop A“) von Laminin füllt die zentrale Mulde des Propellers aus, wobei Val⁸⁰⁴ (Laminin, „Loop A“) hydrophobe Wechselwirkungen zu Ile⁹⁵¹, Ile⁹⁶⁷, Trp¹¹³⁸ und Phe¹¹²⁴ (Nidogen) ausbilden (siehe Abb. 61 B) (Takagi, *et al.*, 2003). Der Aminosäurerest Asn⁸⁰² (Laminin, „Loop A“) bildet zwei komplementäre Wasserstoffbrücken nach Asn¹⁰⁸² aus und Asp⁸⁰⁰ (Laminin, „Loop A“) formt eine Salzbrücke mit Arg¹⁰³⁷ (Nidogen).

Die Bindung von Dkk-Proteinen an die YWTD-Typ- β -Propeller-Domänen von LRP5/6 erfolgt möglicherweise nach einem ähnlichen Prinzip wie die Laminin/Nidogen-Interaktion. Durch Mutagenesestudien in der dritten YWTD-Typ- β -Propeller-Domäne von LRP5 konnten mehrere für die Dkk-Bindung essentielle Aminosäuren identifiziert werden, die alle gleichsam einem Amphitheater um und in der Propellermitte angeordnet sind (siehe Abb. 62). Dabei verringerten die Mutationen E721A und W781A die Bindung von Dkk-1 an LRP5 um mehr als 40% und zeigen somit den größten Effekt (Zhang, *et al.*, 2004).

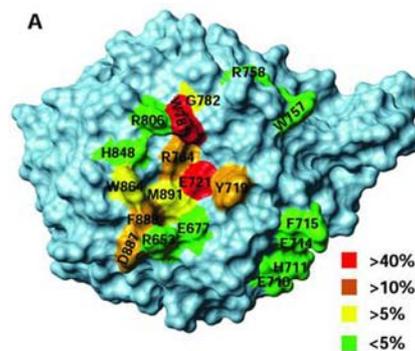


Abbildung 62: Ergebnis der Mutagenesestudie in der dritten YWTD-Typ- β -Propeller-Domäne von LRP5. Die im Modell der dritten YWTD-Typ- β -Propeller-Domäne von LRP5 farblich dargestellten Reste werden für die Dkk-1 Bindung benötigt. Das Modell basiert auf der Kristallstruktur der YWTD-Typ- β -Propeller-Domäne des LDL-Rezeptors (Jeon, *et al.*, 2001). Die Abbildung wurde mit Genehmigung der American Society of Microbiology aus Zhang *et al.*, 2004, *Molecular and Cellular Biology*, 24, p4680 übernommen (Zhang, *et al.*, 2004)

Lijun Chen *et al.* publizierten 2008 die NMR-Struktur der zweiten Cystein-reichen Domäne (CRD2) von murinem Dkk-2 (Chen, *et al.*, 2008) (siehe Abb. 63, 64). Dieser Teil des Proteins

bindet an LRP5 und vermittelt die inhibitorische Funktion von Dkk auf den Wnt-Signalweg (Chen, *et al.*, 2008, Li, *et al.*, 2002). Die Struktur unterteilt sich in zwei Subdomänen mit ähnlicher Topologie. Beide Subdomänen bestehen aus drei antiparallelen β -Faltblättern, die durch flexible Schleifen verbunden sind. Die Struktur erhält ihre Stabilität durch fünf Disulfidbrücken, von denen eine die beiden Subdomänen verbindet.

Durch Mutagenesestudien in der zweiten Cystein-reichen Domäne (CRD2) von murinem Dkk-2 konnten Aminosäuren identifiziert werden, die an der Bindung von Dkk-2 an LRP5 beteiligt sind. Die Auswahl der zu mutierenden Aminosäuren in der Dkk-CRD2-Domäne basierte auf der Annahme, dass die, in der Mutagenesestudie als für die Interaktion wichtig, identifizierte Aminosäure Glu⁷⁸¹ der dritten YWTD-Typ- β -Propeller-Domäne von LRP5 eine Salzbrücke mit einem basischen Rest der Dkk-CRD2-Domäne bilden könnte. Dies würde einem Interaktionsmechanismus wie im Fall von Laminin und Nidogen entsprechen (Takagi, *et al.*, 2003). Der korrespondierende Rest zu Glu⁷⁸¹ (YWTD-Typ- β -Propeller-Domäne von LRP5) im Nidogen-Propeller ist Glu⁹⁹⁴, der mit Lys⁸¹⁶ in Laminin eine Salzbrücke bildet. Aus diesem Grund wurden alle basischen Aminosäuren (Arg, Lys, His) in Dkk-CRD2 durch Glutamat ersetzt. So konnten verschiedene Mutanten identifiziert werden, die eine reduzierte Bindung an LRP6 zeigen und im Reporter-gen-Nachweisverfahren keine inhibierende Funktion mehr besitzen (H210E, K217E, R242E, H267E, K205E) (Chen, *et al.*, 2008).

Basierend auf den Mutagenesestudien in der dritten YWTD-Typ- β -Propeller-Domäne von LRP5 und in der zweiten Cystein-reichen Domäne (CRD2) von murinem Dkk-2 wurden „Docking“-Experimente mit dem Programm HADDOCK durchgeführt, die in einem Modell der Interaktion zwischen Dkk-CRD2 und der dritten YWTD-Typ- β -Propeller-Domäne von LRP5 zusammengefasst sind (siehe Abb. 63 B). Das Interaktionsmodell zeigt, dass die Aminosäure Glu⁷²¹ der dritten YWTD-Typ- β -Propeller-Domäne von LRP5 wahrscheinlich zwei mögliche Salzbrücken zu Trp²¹² und His²¹⁰ der Dkk-CRD2-Domäne bildet. Außerdem bestehen nach diesem Modell hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Trp²¹² und Phe¹⁹⁹ der Dkk-CRD2-Domäne und Trp⁷⁸⁰ und Tyr⁷¹⁹ der dritten YWTD-Typ- β -Propeller-Domäne von LRP5. Weitere Salzbrücken können eventuell zwischen Asp⁸⁸⁷ der dritten YWTD-Typ- β -Propeller-Domäne von LRP5 und Lys²¹⁷ und Arg²⁴² der Dkk-CRD2-Domäne geformt werden (Chen, *et al.*, 2008). Die Aminosäuren der Dkk-CRD2-Domäne, welche an der Interaktion mit LRP5 beteiligt sind, sind vorwiegend in Schleifenregionen lokalisiert.

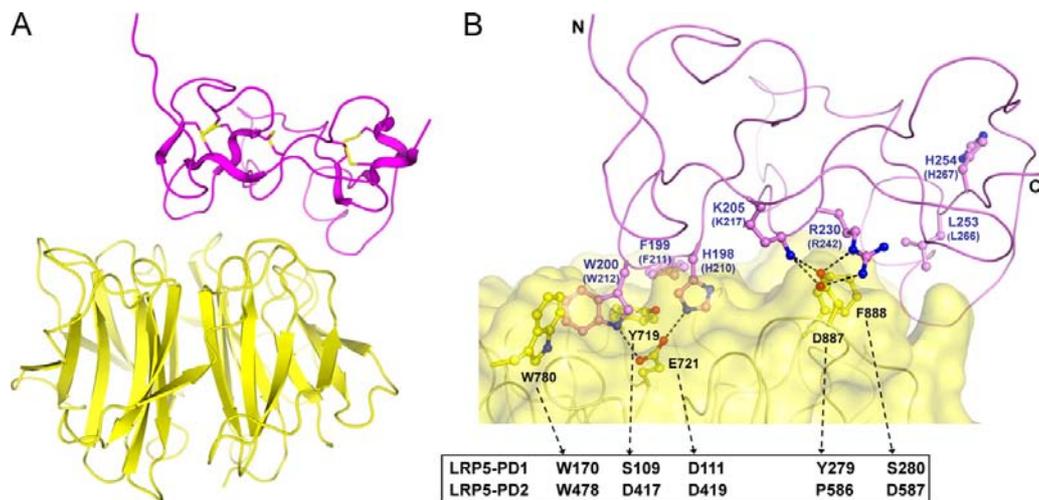


Abbildung 63: Interaktionsmodell der Bindung der CRD2 von Dkk-2 an die dritte YWTD-Typ- β -Propeller-Domäne von LRP5. A) Bänderdarstellung des Komplexes. B) Detailausschnitt der putativen Bindestelle mit möglichen Seitenketteninteraktionen. Die gestrichelten Linien repräsentieren Wasserstoffbrücken. Die nummerierten Aminosäuren in Klammern repräsentieren murines Dkk-2. Die gestrichelten Pfeile verweisen auf die korrespondierenden Reste der ersten beiden YWTD-Typ- β -Propeller-Domänen von LRP5 im unteren Kasten. Die Abbildung wurde mit Genehmigung von JBC aus Chen *et al.*, 2008, JBC, 238, p23369 übernommen (Chen, *et al.*, 2008).

Aufgrund der Sequenzhomologie und strukturellen Ähnlichkeit der ersten drei YWTD-Typ- β -Propeller-Domänen von LRP5/6 passt die Dkk-CRD2-Domäne nach der vorliegenden Modellierung in die Bindetasche aller drei YWTD-Typ- β -Propeller-Domänen, bindet allerdings mit hoher Affinität nur die Bindetasche der dritten YWTD-Typ- β -Propeller-Domäne, da die korrespondierenden Aminosäuren zur Hauptbindungs-determinante Glu⁷²¹ der dritten YWTD-Typ- β -Propeller-Domäne von LRP5 in den beiden anderen YWTD-Typ- β -Propeller-Domänen Aspartatreste sind (Asp¹¹¹ Propeller eins, Asp⁴⁷⁸ Propeller zwei) (siehe Abb. 63 B). Die Seitenkette von Aspartat ist um eine CH₂-Einheit kürzer, weshalb nach diesem Modell keine Salzbrücke zwischen Asp¹¹¹ der ersten YWTD-Typ- β -Propeller-Domäne bzw. Asp⁴⁷⁸ der zweiten YWTD-Typ- β -Propeller-Domäne und Trp²¹² bzw. His²¹⁰ der Dkk-CRD2-Domäne gebildet werden kann, was zur Abschwächung der Bindung führt (Chen, *et al.*, 2008).

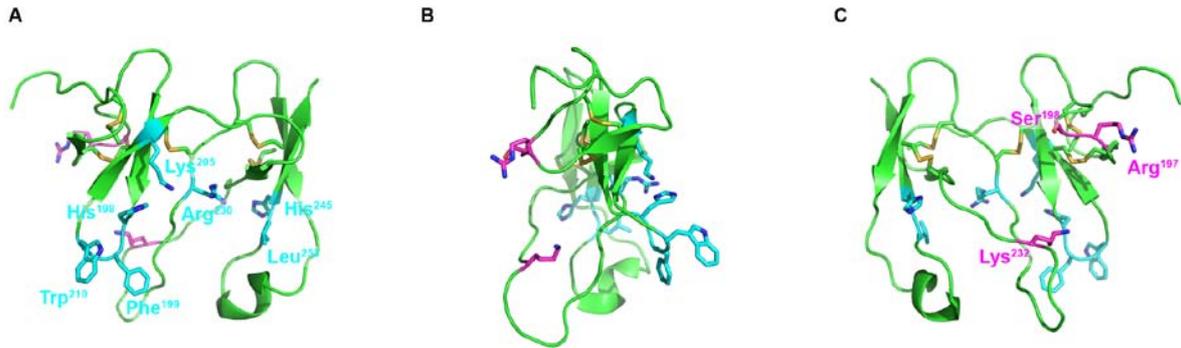


Abbildung 64: A) Bänderdarstellung der zweiten Cystein-reichen Domäne von Dkk-2. B) und C) Bänderdarstellung wurde jeweils um 90° in der Y-Achse rotiert. Die an der Bindung von LRP5 beteiligten Reste sind in Cyan hervorgehoben. Die an der Bindung von Kremen beteiligten Reste sind in magenta dargestellt.

Für die Inhibition des Wnt-Signalwegs durch Dkk-Proteine, spielt außerdem noch die Interaktion mit den membranständigen Kremen-Rezeptoren eine wichtige Rolle, welche zur Internalisierung des LRP5/6-Dkk-Kremen Komplexes führt. Auch Kremen-1/2 bindet Dkk-Proteine in der zweiten Cystein-reichen Domäne (Wang, *et al.*, 2008). Durch Mutagenesestudien in dieser Domäne konnte gezeigt werden, dass das Bindeepitop für die Kremen-Rezeptoren an die CRD2-Domäne von Dkk-1 auf der gegenüberliegenden Seite des Epitops für LRP5/6 lokalisiert ist und unter anderem aus den Aminosäureresten Lys²³², Ser¹⁹⁸ und Arg¹⁹⁷ besteht (siehe Abb. 64) (Wang, *et al.*, 2008).

4.7 Putativer Interaktionsmechanismus von Sclerostin und LRP5/6

Neben den Dkk-Proteinen (Dkk-1, -2, -4) ist auch Sclerostin ein Antagonist des kanonischen Wnt- β -Catenin-Signalwegs. Wie unsere Daten belegen, vermögen sowohl Sclerostin als auch die Trunktionsvarianten Sclerostin- Δ C und Sclerostin- Δ NC das Wnt-Signal in einem Reporter-gen-Nachweisverfahren direkt zu hemmen. Im direkten Vergleich ist Dkk-1 jedoch der bessere Inhibitor und weist eine deutlich niedrigere Konzentration für eine halbmaximale Inhibition (IC₅₀) auf. Über die Gründe dafür kann allerdings keine Aussage getroffen werden, solange die Inhibitionsmechanismen beider Proteine nicht auf molekularer Ebene aufgeklärt sind. Wie die Dkk-Proteine inhibiert Sclerostin den Signalweg ebenfalls durch eine direkte Interaktion mit den Wnt Ko-Rezeptoren LRP5 und LRP6. Hierfür sprechen genetische Aspekte, wie die „High-Bone-Mass“-Mutationen in LRP5, die einen ähnlichen Phänotyp wie

Diskussion

Defekte im *SOST*-Gen auslösen und Ko-Immunopräzipitationsstudien, die eine direkte Interaktion zwischen beiden Proteinen belegen (Li, *et al.*, 2005, Semenov, *et al.*, 2006).

Mittels SPR-Analyse konnten nun erstmals die direkte Interaktion zwischen Sclerostin und der extrazellulären Domäne von LRP6 analysiert und die Parameter der Bindung bestimmt werden. Erstaunlicherweise wurde in den ersten Messungen die Bindung von Sclerostin an die extrazelluläre Domäne von LRP6 unter den gewählten Hochsalzmessbedingungen mit einer Affinität zwischen 500nM und 1µM bestimmt, was für eine funktionell relevante Interaktion relativ niedrig erscheint (siehe 3.4.3). Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Hochsalzmessbedingungen, die gewählt wurden, um unspezifische Interaktionen von Sclerostin mit der Chipoberfläche zu unterdrücken, ebenfalls etwaige spezifische ionische Wechselwirkungen zwischen Sclerostin und LRP6 schwächen. Trotzdem müssten, um mit der berechneten Bindungsaffinität eine adäquate Inhibition zu gewährleisten, die lokalen Konzentrationen von Sclerostin entweder sehr hoch sein, oder die Affinität für LRP5/6 durch zusätzliche Interaktionen mit einem bisher unbekanntem Ko-Rezeptor durch kooperative Effekte erhöht werden. Die Affinität der Dkk-LRP5/6-Interaktion auf transfizierten Zellen liegt hierzu im Vergleich bei 0.5nM und konnte von uns auch mittels SPR-Analyse bestätigt werden (Mao, *et al.*, 2001). Bei diesen, kürzlich durchgeführten SPR-Messungen konnte allerdings beobachtet werden, dass durch die Regeneration der Chipoberfläche die immobilisierte extrazelluläre Domäne von LRP6 denaturiert bzw. destabilisiert wird, und daraufhin Dkk-1 nicht mehr binden konnte. Auch für Sclerostin konnte mit neu auf der Chipoberfläche immobilisiertem LRP6 eine erhöhte Bindungsaffinität (20-100nM) bestimmt werden (unpublizierte Daten, van Pee K., Hellmann T., Weidauer S., Müller T.D.). Die Regeneration der Chipoberfläche zeigte in diesem Fall jedoch nur geringe Auswirkung auf die Bindung von Sclerostin an LRP6. Das Bindeepitop von Dkk-1 ist sensitiv für die Regenerationsprozedur in dem SPR-Messverfahren, daher führt eine einmalige Regeneration zur Zerstörung des Bindeepitops. Für Sclerostin trifft dieses in geringerem Maße zu, so dass nach einem Regenerationszyklus eine Verschlechterung der Bindeaffinität aber kein vollständiger Bindungsverlust wie bei Dkk-1 auftritt. Diese Ergebnisse sind jedoch als vorläufig zu betrachten, da nur ein kleiner Teil der immobilisierten LRP6 Bindungsaktivität zeigte. Die höhere Bindungsaffinität von Sclerostin und LRP6 muss daher in nachfolgenden Experimenten bestätigt werden. Außerdem ist die mögliche Instabilität der extrazellulären Domäne von LRP6 zu berücksichtigen und genauer zu untersuchen.

Bindungsstudien mit verkürzten LRP5-Konstrukten auf ganzen Zellen begrenzten die putativen Bindestellen für Wnt und Sclerostin auf die ersten beiden YWTD-Typ- β -Propeller und EGF-ähnlichen Domänen (Li, *et al.*, 2005, Mao, *et al.*, 2001). Da Wnt und Sclerostin im Bereich der ersten beiden YWTD-Typ- β -Propeller-Domänen mit LRP5/6 wechselwirken, wäre eine direkte Konkurrenz der beiden Proteine um eine Bindestelle ein möglicher Mechanismus der Sclerostininhibition. Die direkte Konkurrenz von Wnt und Sclerostin kann jedoch ausgeschlossen werden, da Wnt-Proteine Sclerostin nicht aus einem Sclerostin/LRP5-Komplex auf ganzen Zellen verdrängen können, während Dkk dies allerdings vermag (Li, *et al.*, 2009).

Auch für Sclerostin wird angenommen, dass die EGF-ähnlichen Domänen von LRP5/6 für die Proteinbindung keine Rolle spielen und die Hauptinteraktion mit den YWTD-Typ- β -Propeller-Domänen von LRP5/6 stattfindet. Dabei sprechen einige Beobachtungen für eine Interaktion zwischen Sclerostin und der ersten YWTD-Typ- β -Propeller-Domäne von LRP5/6 nach ähnlichem Mechanismus analog der Interaktion von Laminin mit der -Propeller-Domäne von Nidogen oder Dkk-2 mit der dritten YWTD-Typ- β -Propeller-Domäne von LRP5/6.

Wie die zuvor beschriebenen Mutagenesestudien und das Interaktionsmodell der Interaktion der zweiten Cystein-reichen Domäne von Dkk-2 mit der dritten YWTD-Typ- β -Propeller-Domäne von LRP5 suggerieren, fungiert die Aminosäure Glu⁷²¹ der dritten YWTD-Typ- β -Propeller-Domäne von LRP5 als eine Hauptbindungs determinante für die Interaktion der zweiten Cystein-reichen Domäne von Dkk-2 mit der dritten YWTD-Typ- β -Propeller-Domäne von LRP5 (Chen, *et al.*, 2008). Der korrespondierende Rest zu Glu⁷²¹ der dritten YWTD-Typ- β -Propeller-Domäne ist die Aminosäure Asp¹¹¹ der ersten YWTD-Typ- β -Propeller-Domäne von LRP5, welche zu den „High-Bone-Mass“-Mutationen des *LRP5*-Gens gehört, die eine Bindung von Sclerostin an LRP5 verhindern (Semenov, *et al.*, 2006). Von den sechs derzeit bekannten „High-Bone-Mass“-Mutationen (G171V, D111Y, G171R, A214T, A242T, T253I) verhindern nach Analyse des Strukturmodells der ersten YWTD-Typ- β -Propeller-Domäne von LRP5 wahrscheinlich nur die ersten drei Mutationen (G171V, D111Y, G171R) direkt die Bindung von Sclerostin an LRP5/6, die anderen drei Mutationen (A214T, A242T, T253I) liegen im Inneren der YWTD-Typ- β -Propeller-Domäne und führen sehr wahrscheinlich zu inaktiven Faltungsvarianten (siehe Abb. 65 B). Die Aminosäure Asp¹¹¹ der ersten YWTD-

Diskussion

Typ- β -Propeller-Domäne von LRP5 könnte somit eine der Hauptbindungs determinanten für die Sclerostin-LRP5 Interaktion darstellen.

Bei genauer Betrachtung der Oberflächenladungsverteilung der beiden Bindepartner Sclerostin und der ersten YWTD-Typ- β -Propeller-Domäne von LRP5 fällt auf, dass die beiden Proteine komplementäre Oberflächenladungspotentiale aufweisen (siehe Abb. 65). Die Fläche oberhalb und um Asp¹¹¹ der ersten YWTD-Typ- β -Propeller-Domäne von LRP5 weist ein stark negatives Ladungspotential auf. Sclerostin hingegen weist zwei Regionen mit stark positivem Oberflächenpotential auf. Die eine Region umfasst Finger 2, die andere Region befindet sich im oberen „Loop“-Bereich des Proteins. Diese Beobachtung deutet auf die Beteiligung von ionischen Wechselwirkungen durch Salzbrücken bei der Interaktion beider Proteine hin.

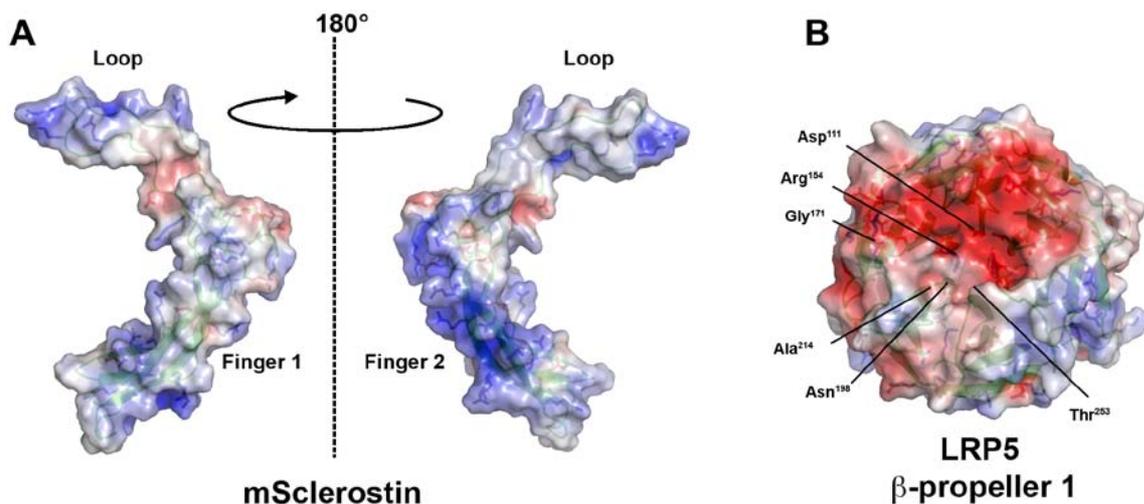


Abbildung 65: A) Elektrostatistisches Potential dargestellt auf der Van-der-Waals-Oberfläche von murinem Sclerostin. Dunkelblaue Areale stellen ein stark positives Oberflächenladungspotential ($5kT/e$) dar, dunkelrote Areale markieren ein stark negatives Oberflächenladungspotential ($-5kT/e$). Die elektrostatistischen Potentiale wurden mit der Software APBS unter Annahme einer Ionenstärke von 150mM NaCl und dem Kraftfeld AMBER 7.0 für die Protonierung, berechnet. B) Elektrostatistisches Potential dargestellt auf der Van-der-Waals-Oberfläche der ersten YWTD-Typ- β -Propeller-Domäne von humanem LRP5. Das Strukturmodell für die erste YWTD-Typ- β -Propeller-Domäne von LRP5 wurde mit Hilfe des Programms Swiss-Model basierend auf der Struktur der β -Propeller-Domäne des LDL-Rezeptors erstellt. Mutationen in der ersten YWTD-Typ- β -Propeller-Domäne von LRP5, die zu einem „High-Bone-Mass“-Phänotyp führen, sind hervorgehoben.

Nach Ausschluss der beiden Termini von Sclerostin, die nach unseren Daten keinen, oder nur geringen Einfluss auf die inhibierende Funktion von Sclerostin auf den Wnt-Signalweg ausüben, kommen aufgrund der komplementären Ladungsverteilung nur der „Loop“-Bereich oder Finger 2 als mögliche Bindeepitope auf Sclerostinseite in Frage. Laut Veverka *et al.*

stellt der Finger 2 von Sclerostin jedoch die Bindestelle für Heparin dar, was dazu führt, dass Sclerostin an der Zelloberfläche verankert wird (Veverka, *et al.*, 2009). Somit verbleibt nur die „Loop“-Region des Proteins als potentielle Bindestelle. Dies steht auch im Einklang mit den bisher bekannten Interaktionsmodellen (Laminin/Nidogen, Dkk/LRP5), wo in beiden Fällen Aminosäuren des Liganden, die in relativ flexiblen Schleifenbereichen lokalisiert sind, die Interaktionen mit den Aminosäuren der Propellermulde des Rezeptors eingehen. Die Analyse der in Kapitel 3.7 beschriebenen Anti-Sclerostin Fab-Fragmente der Firma AbD-Serotec untermauern diese These. Wie wir zeigen konnten, neutralisiert das Fab-Fragment AbD09097 die inhibitorische Wirkung Sclerostins auf den Wnt-Signalweg (siehe Kapitel 3.7.2, 3.7.3). „Peptidmapping“-Experimente der Firma Pepscan (J.W.Back) mit Sclerostin homologen Peptiden und den Fab-Fragmenten, sowie unsere NMR-Bindungsstudien ergaben, dass das Bindeepitop dieses Fab-Fragments im „Loop“-Bereich (Arg96-W100) von Sclerostin lokalisiert ist.

Die Charakterisierung der Bindeepitope der Anti-Sclerostin Fab-Fragmente (AbD09094, AbD09100 und AbD09101) mittels NMR-Bindungsstudien und „Peptidmapping“-Experimenten lokalisiert die Bindestellen der Fab-Fragmente AbD09100 und AbD09101 auf die Fingerregion und das Epitop für AbD09094 auf wenige Aminosäuren des N-Terminus von Sclerostin. Diese drei Fab-Fragmente zeigten darüber hinaus im Wnt-Reportergen-Nachweisverfahren keinen neutralisierenden Effekt auf die inhibitorische Wirkung von Sclerostin auf den Wnt-Signalweg. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass die antagonistische Funktion Sclerostins durch ein definiertes Bindeepitop im „Loop“-Bereich von Sclerostin vermittelt werden muss, und dass sowohl die Termini als auch die Fingerregion von Sclerostin keinen Einfluss darauf haben.

Die bisherigen Ergebnisse führen zu folgendem Modell für die Sclerostin/LRP5-Interaktion. Aminosäuren des oberen „Loop“-Bereichs von Sclerostin (Länge: 50Å, Durchmesser: 20 Å) binden möglicherweise nach Laminin-ähnlichem Prinzip im und um die zentrale Mulde (224Å²) der ersten YWTD-Typ-β-Propeller-Domäne von LRP5 (Oberfläche: 11200Å²). Dieser Bereich weist ein stark negatives Oberflächenpotential auf und stellt somit die putative Bindestelle für Sclerostin mit einer Fläche von etwa 1660Å² dar. (Von dieser Fläche weisen 560Å² einen hydrophoben Charakter und 1100Å² einen hydrophilen oder geladenen Charakter auf.) Dabei könnte die ionischen Interaktion zwischen Asp¹¹¹ der ersten YWTD-Typ-β-Propeller-Domäne von LRP5 und einem Arginin-, Lysin- oder Asparagin-Rest des oberen „Loop“-Bereichs eine der Hauptbindungs determinanten darstellen.

Ob weitere Teile (Finger 1 und Finger 2) noch zusätzliche Interaktionen mit anderen Bereichen von LRP5 eingehen, einen Ko-Rezeptor binden, oder ob die Bindung von Sclerostin an die Zelloberfläche Teil des Inhibitionsmechanismus ist, bleibt weiterhin ungeklärt.

4.8 Ausblick

Langfristiges Ziel ist die Entwicklung eines osteoanabolen Therapeutikums, welches den Wnt-Signalweg durch den Eingriff in die Sclerostin/LRP5/6-Interaktion moduliert. Hierfür ist jedoch die detaillierte Kenntnis des molekularen Mechanismus, wie Sclerostin die Aktivierung durch Wnt inhibiert, von entscheidender Bedeutung. Die Kenntnisse des Inhibitionsmechanismus beschränken sich bis dato auf wenige Details. So ist bisher ungeklärt, wie Sclerostin das Wnt-Signal inhibieren kann, wenn keine direkte Konkurrenz zwischen Wnt und Sclerostin um LRP5/6 beobachtet werden kann. Benutzen Sclerostin und Wnt tatsächlich getrennte Bindeepitope? Führt die Bindung von Sclerostin an LRP5/6 durch allosterische Effekte zu Konformationsänderungen im Rezeptor, wodurch Wnt nicht mehr binden kann, oder handelt es sich um einen Mechanismus, wie für die Dkk-Proteine beschrieben, in dem der LRP5/6-Sclerostinkomplex durch Endozytose von der Zelloberfläche entfernt wird?

Auch wenn in dieser Arbeit erste Hinweise auf die Bindeepitope der Sclerostin/LRP5/6-Interaktion erhalten wurden, bleibt weiterhin offen, welche Aminosäuren im Einzelnen an der Interaktion von Sclerostin und LRP5/6 auf beiden Seiten beteiligt sind. Bindet Sclerostin nur an die erste YWTD-Typ- β -Propeller-Domäne, welche interessanterweise alle bisher bekannten „High-Bone-Mass“-Mutationen enthält, oder sind weitere Regionen z.B. die zweite YWTD-Typ- β -Propeller-Domäne oder die EGF-Domänen ebenfalls an der Interaktion beteiligt?

Außerdem ist fraglich, ob die im Rahmen dieser Arbeit bestimmte Affinität der Sclerostin/LRP6-Interaktion von 100nM-1 μ M unter physiologischen Bedingungen ausreicht, die Inhibition des Wnt-Signalwegs zu erklären. Werden eventuell ein oder mehrere Ko-Rezeptoren benötigt, welche die Affinität der Sclerostinbindung an die Zelloberfläche erhöhen und somit essentiell für die Inhibition des Signalwegs durch Sclerostin sind, oder spielt in diesem Zusammenhang die von Veverka *et al.* beobachtete Heparinbindung eine Rolle (Veverka, *et al.*, 2009)?

Die in dieser Arbeit etablierten Methoden und nun zur Verfügung stehenden Werkzeuge können genutzt werden, um einige dieser Fragen zu beantworten. Sclerostin,

Trunktionsvarianten und Einzelaminosäuremutanten sowie die gegen Sclerostin gerichteten Fab-Fragmente könnten für Signaltransduktionsstudien verwendet werden. Hierzu zählen einerseits die derzeit intensiv betriebene Suche nach einem Sclerostin-Korezeptor und andererseits Studien, die Auskunft über eine mögliche Internalisierung des Sclerostin/LRP5/6-Komplexes in das Zellinnere geben. Die etablierten Expressions- und Aufreinigungsprotokolle für Sclerostin könnten für die Herstellung von Einzelaminosäuremutanten besonders im „Loop“-Bereich von Sclerostin genutzt werden, um das Bindeepitop von Sclerostin an LRP5/6 im Detail zu bestimmen. Außerdem bietet das die Sclerostinaktivität neutralisierende Fab-Antikörperfragment AbD09097 einen ersten hochinteressanten Startpunkt für die Entwicklung eines osteoanabolen Therapeutikums.

5 Zusammenfassung

Die Knochenhomöostase erfolgt durch das Zusammenspiel mehrerer Zelltypen. Während die Osteoblasten für den Knochenaufbau verantwortlich sind, resorbieren die Osteoklasten Knochengewebe. Beide Vorgänge werden durch die Osteozyten streng reguliert. Eine Störung im strikt regulierten Gleichgewicht zwischen Knochenabbau und Knochenaufbau kann daher zu Knochenkrankheiten wie Osteoporose führen. Auf molekularer Ebene erfolgt die Kommunikation zwischen den einzelnen Zelltypen über zwei wichtige Signalwege, den der „Bone Morphogenetic Protein“-Superfamilie (BMPs) und den der Wnt-Proteine. Die Signalübertragung wird hierbei durch sekretierte Faktoren induziert, die an Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden. Deren Aktivierung führt zu einem intrazellulären Signal, welches letztlich die Expression von Zielgenen reguliert. Beide Signalwege werden auf mehreren Ebenen, extrazellulär, membranständig und intrazellulär reguliert. Das 2003 identifizierte Sclerostin ist ein Vertreter der extrazellulären Regulatorproteine und wurde aufgrund seiner Zugehörigkeit zur DAN-Familie zunächst fälschlicherweise als direkter Inhibitor des BMP-Signalwegs eingestuft. Mittlerweile wird allerdings davon ausgegangen, dass Sclerostin den Wnt-Signalweg negativ reguliert, indem es die Wnt Ko-Rezeptoren LRP5 und LRP6 bindet, die beide zu der Familie der „Low-density lipoprotein receptors“ gehören. Über den molekularen Inhibitionsmechanismus von Sclerostin war jedoch zum Startpunkt dieser Dissertationsarbeit wenig bekannt.

Daher wurde Sclerostin im Rahmen dieser Arbeit biophysikalisch und biochemisch charakterisiert. Die Aufklärung mittels NMR-Spektroskopie ergab für Sclerostin eine Struktur, die sich in drei Regionen gliedert: den Cystinknoten, sowie einen „Loop“-Bereich und die Fingerregion. Vom zentralen Cystinknoten gehen drei Peptid-Schleifen in zwei entgegengesetzte Richtungen aus. Schleife eins und drei bilden eine definierte β -Faltblattstruktur und ähneln zwei Fingern einer Hand. Die zweite Schleife, welche vom Cystinknoten isoliert in die entgegengesetzte Richtung verläuft („Loop“), ist wie die beiden langen N- und C-Termini flexibel und unstrukturiert. Die in Zusammenarbeit mit der Firma AbD-Serotec entstandenen Fab-Fragmente ermöglichten die Bestimmung des Bindeepitops der Sclerostin/LRP5-Interaktion im Bereich der unstrukturierten dritten Schleife von Sclerostin.

Die Struktur von Sclerostin und die Identifikation des Bindeepitops auf Sclerostinseite geben nun erste Einblicke in den molekularen Mechanismus der Sclerostin/LRP5-Interaktion. Dieses Kenntnis kann für die Entwicklung von Kleinmolekülinhibitoren mittels rationalem

Drugdesign genutzt werden, welche, wie auch der in Kooperation entwickelte die Sclerostinaktivität neutralisierende Antikörper AbD09097, hochinteressante Ansätze für neuartige anabole Therapien von Krankheiten mit Knochenschwund darstellen.

6 Summary

Different cell types like osteoblasts, osteoclasts and osteocytes maintain bone homeostasis. While osteoblasts build up bone, osteoclasts resorb bone tissue and both actions are tightly regulated by the osteocytes. Imbalance between bone formation and resorption will lead to various bone diseases, e.g. osteoporosis. On a molecular level communication between these cell types occurs through two major signalling pathways, i.e. the bone morphogenetic proteins (BMPs) and the Wnt-factors. In both pathways signal transduction is induced by secreted factors, which bind to cell surface receptors. This activation leads to an intracellular signal that finally regulates expression of target genes. Both pathways are tightly regulated at various cellular levels, extracellular, at the membrane as well as intracellular. Sclerostin, which was identified in 2003, is a member of the extracellular modulator proteins. Initially it was wrongly classified as a direct inhibitor of the BMP-signalling pathway due to its classification as a member of the DAN-family. Meanwhile it became apparent that sclerostin targets the Wnt-pathway by binding to the Wnt co-receptors LRP5 and LRP6, which belong to the family of low-density lipoprotein receptors. At the beginning of this work very little was known about the molecular mechanism how sclerostin inhibits the Wnt-pathway.

The structure analysis of sclerostin employing NMR-spectroscopy revealed in a modular architecture, which can be divided into three regions: the central, characteristic cystine knot, the loop-region and the two fingers. From the cystine knot three loops emanate in two opposite directions. Loop one and loop three form defined β -sheet structures resembling two fingers of a hand. Loop two, which runs into the opposite direction, is unstructured and highly flexible like the long N- and C-termini. Antibody fab-fragments, which were generated in collaboration with AbD-Serotec, facilitated the mapping of the binding-epitop of sclerostin to LRP5/6, highlighting an extended area of the unstructured loop region of sclerostin as the LRP5/6 binding site.

The high-resolution structure of sclerostin and the identification of the LRP5-binding-epitop yield first insights into the molecular mechanism of sclerostin-LRP5 interaction. This knowledge can now be used to develop small-molecule inhibitors by rational drug design, which are, like the sclerostin activity neutralising fab-fragment AbD09097, highly interesting targets for new bone-anabolic therapies of diseases characterised by bone loss.

7 Literaturverzeichnis

- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A. and Kemler, R.: **beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway.** *Embo J* 1997, **16**(13):3797-3804.
- Ai, M., Holmen, S.L., Van Hul, W., Williams, B.O. and Warman, M.L.: **Reduced affinity to and inhibition by DKK1 form a common mechanism by which high bone mass-associated missense mutations in LRP5 affect canonical Wnt signaling.** *Mol Cell Biol* 2005, **25**(12):4946-4955.
- Ambrosio, A.L., Taelman, V.F., Lee, H.X., Metzinger, C.A., Coffinier, C. and De Robertis, E.M.: **Crossveinless-2 Is a BMP feedback inhibitor that binds Chordin/BMP to regulate Xenopus embryonic patterning.** *Dev Cell* 2008, **15**(2):248-260.
- Amthor, H., Christ, B., Rashid-Doubell, F., Kemp, C.F., Lang, E. and Patel, K.: **Follistatin regulates bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) activity to stimulate embryonic muscle growth.** *Dev Biol* 2002, **243**(1):115-127.
- Avsian-Kretchmer, O. and Hsueh, A.J.: **Comparative genomic analysis of the eight-membered ring cystine knot-containing bone morphogenetic protein antagonists.** *Mol Endocrinol* 2004, **18**(1):1-12.
- Babij, P., Zhao, W., Small, C., Kharode, Y., Yaworsky, P.J., Boussein, M.L., Reddy, P.S., Bodine, P.V., Robinson, J.A., Bhat, B., Marzolf, J., Moran, R.A. and Bex, F.: **High bone mass in mice expressing a mutant LRP5 gene.** *J Bone Miner Res* 2003, **18**(6):960-974.
- Babitt, J.L., Huang, F.W., Wrighting, D.M., Xia, Y., Sidis, Y., Samad, T.A., Campagna, J.A., Chung, R.T., Schneyer, A.L., Woolf, C.J., Andrews, N.C. and Lin, H.Y.: **Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression.** *Nat Genet* 2006, **38**(5):531-539.
- Baek, S.H., Kioussi, C., Briata, P., Wang, D., Nguyen, H.D., Ohgi, K.A., Glass, C.K., Wynshaw-Boris, A., Rose, D.W. and Rosenfeld, M.G.: **Regulated subset of G1 growth-control genes in response to derepression by the Wnt pathway.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(6):3245-3250.
- Balemans, W., Ebeling, M., Patel, N., Van Hul, E., Olson, P., Dioszegi, M., Lacza, C., Wuyts, W., Van Den Ende, J., Willems, P., Paes-Alves, A.F., Hill, S., Bueno, M., Ramos, F.J., Tacconi, P., Dikkers, F.G., Stratakis, C., Lindpaintner, K., Vickery, B., Foerzler, D. and Van Hul, W.: **Increased bone density in sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST).** *Hum Mol Genet* 2001, **10**(5):537-543.
- Balemans, W., Patel, N., Ebeling, M., Van Hul, E., Wuyts, W., Lacza, C., Dioszegi, M., Dikkers, F.G., Hilderling, P., Willems, P.J., Verheij, J.B., Lindpaintner, K., Vickery, B., Foerzler, D. and Van Hul, W.: **Identification of a 52 kb deletion downstream of the SOST gene in patients with van Buchem disease.** *J Med Genet* 2002, **39**(2):91-97.
- Balemans, W., Van Den Ende, J., Freire Paes-Alves, A., Dikkers, F.G., Willems, P.J., Vanhoenacker, F., de Almeida-Melo, N., Alves, C.F., Stratakis, C.A., Hill, S.C. and Van Hul, W.: **Localization of the gene for sclerosteosis to the van Buchem disease-gene region on chromosome 17q12-q21.** *Am J Hum Genet* 1999, **64**(6):1661-1669.
- Baron, R. and Rawadi, G.: **Targeting the Wnt/beta-catenin pathway to regulate bone formation in the adult skeleton.** *Endocrinology* 2007, **148**(6):2635-2643.
- Bax, A., Clore, G.M., Driscoll, P.C., Gronenborn, A.M., Ikura, M. and Kay, L.E.: **Practical Aspects of Proton Carbon Carbon Proton 3-Dimensional Correlation Spectroscopy of C-13-Labeled Proteins.** *Journal of Magnetic Resonance* 1990a, **87**(3):620-627.
- Bax, A., Clore, G.M. and Gronenborn, A.M.: **H-1-H-1 Correlation Via Isotropic Mixing of C-13 Magnetization, a New 3-Dimensional Approach for Assigning H-1 and C-13 Spectra of C-13-Enriched Proteins.** *Journal of Magnetic Resonance* 1990b, **88**(2):425-431.
- Behrens, J., Jerchow, B.A., Wurtele, M., Grimm, J., Asbrand, C., Wirtz, R., Kuhl, M., Wedlich, D. and Birchmeier, W.: **Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta.** *Science* 1998, **280**(5363):596-599.

- Behrens, J., von Kries, J.P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R. and Birchmeier, W.: **Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1.** *Nature* 1996, **382**(6592):638-642.
- Beighton, P.: **Genetic disorders in Southern Africa.** *S Afr Med J* 1976, **50**(29):1125-1128.
- Beighton, P., Cremin, B.J. and Hamersma, H.: **The radiology of sclerosteosis.** *Br J Radiol* 1976a, **49**(587):934-939.
- Beighton, P., Davidson, J., Durr, L. and Hamersma, H.: **Sclerosteosis - an autosomal recessive disorder.** *Clin Genet* 1977, **11**(1):1-7.
- Beighton, P., Durr, L. and Hamersma, H.: **The clinical features of sclerosteosis. A review of the manifestations in twenty-five affected individuals.** *Ann Intern Med* 1976b, **84**(4):393-397.
- Bellido, T., Ali, A.A., Plotkin, L.I., Fu, Q., Gubrij, I., Roberson, P.K., Weinstein, R.S., O'Brien, C.A., Manolagas, S.C. and Jilka, R.L.: **Proteasomal degradation of Runx2 shortens parathyroid hormone-induced anti-apoptotic signaling in osteoblasts. A putative explanation for why intermittent administration is needed for bone anabolism.** *J Biol Chem* 2003, **278**(50):50259-50272.
- Bennett, C.N., Longo, K.A., Wright, W.S., Suva, L.J., Lane, T.F., Hankenson, K.D. and MacDougald, O.A.: **Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(9):3324-3329.
- Bhanot, P., Brink, M., Samos, C.H., Hsieh, J.C., Wang, Y., Macke, J.P., Andrew, D., Nathans, J. and Nusse, R.: **A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor.** *Nature* 1996, **382**(6588):225-230.
- Biben, C., Stanley, E., Fabri, L., Kotecha, S., Rhinn, M., Drinkwater, C., Lah, M., Wang, C.C., Nash, A., Hilton, D., Ang, S.L., Mohun, T. and Harvey, R.P.: **Murine cerberus homologue mCer-1: a candidate anterior patterning molecule.** *Dev Biol* 1998, **194**(2):135-151.
- Blair, H.C., Kahn, A.J., Crouch, E.C., Jeffrey, J.J. and Teitelbaum, S.L.: **Isolated osteoclasts resorb the organic and inorganic components of bone.** *J Cell Biol* 1986, **102**(4):1164-1172.
- Blair, H.C., Teitelbaum, S.L., Ghiselli, R. and Gluck, S.: **Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump.** *Science* 1989, **245**(4920):855-857.
- Boland, G.M., Perkins, G., Hall, D.J. and Tuan, R.S.: **Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells.** *J Cell Biochem* 2004, **93**(6):1210-1230.
- Bonewald, L.F.: **Osteocytes as dynamic multifunctional cells.** *Ann N Y Acad Sci* 2007, **1116**:281-290.
- Bonewald, L.F. and Johnson, M.L.: **Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling.** *Bone* 2008, **42**(4):606-615.
- Boyden, L.M., Mao, J., Belsky, J., Mitzner, L., Farhi, A., Mitnick, M.A., Wu, D., Insogna, K. and Lifton, R.P.: **High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5.** *N Engl J Med* 2002, **346**(20):1513-1521.
- Brown, E.M., Gamba, G., Riccardi, D., Lombardi, M., Butters, R., Kifor, O., Sun, A., Hediger, M.A., Lytton, J. and Hebert, S.C.: **Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid.** *Nature* 1993, **366**(6455):575-580.
- Brunger, A.T., Clore, G.M., Gronenborn, A.M. and Karplus, M.: **3-Dimensional Structure of Proteins Determined by Molecular-Dynamics with Interproton Distance Restraints - Application to Crambin.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1986, **83**(11):3801-3805.
- Brunkow, M.E., Gardner, J.C., Van Ness, J., Paepfer, B.W., Kovacevich, B.R., Proll, S., Skonier, J.E., Zhao, L., Sabo, P.J., Fu, Y., Alisch, R.S., Gillett, L., Colbert, T., Tacconi, P., Galas, D., Hamersma, H., Beighton, P. and Mulligan, J.: **Bone dysplasia sclerosteosis results from loss of the SOST gene product, a novel cystine knot-containing protein.** *Am J Hum Genet* 2001, **68**(3):577-589.
- Cavanagh, J., Fairbrother, W.J., Palmer, A.G. and Skelton, N.J.: **Protein NMR Spectroscopy, Principles and Practice.** San Diego: Academic Press, Inc; 1996.

- Chazin, W.J. and Wright, P.E.: **A Modified Strategy for Identification of H-1 Spin Systems in Proteins.** *Biopolymers* 1987, **26**(6):973-977.
- Chen, L., Wang, K., Shao, Y., Huang, J., Li, X., Shan, J., Wu, D. and Zheng, J.J.: **Structural insight into the mechanisms of Wnt signaling antagonism by Dkk.** *J Biol Chem* 2008, **283**(34):23364-23370.
- Clevers, H.: **Wnt/beta-catenin signaling in development and disease.** *Cell* 2006, **127**(3):469-480.
- Coccia, P.F., Krivit, W., Cervenka, J., Clawson, C., Kersey, J.H., Kim, T.H., Nesbit, M.E., Ramsay, N.K., Warkentin, P.I., Teitelbaum, S.L., Kahn, A.J. and Brown, D.M.: **Successful bone-marrow transplantation for infantile malignant osteopetrosis.** *N Engl J Med* 1980, **302**(13):701-708.
- Coffinier, C., Ketpura, N., Tran, U., Geissert, D. and De Robertis, E.M.: **Mouse Crossveinless-2 is the vertebrate homolog of a Drosophila extracellular regulator of BMP signaling.** *Mech Dev* 2002, **119 Suppl 1**:S179-184.
- Cornilescu, G., Delaglio, F. and Bax, A.: **Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology.** *J Biomol NMR* 1999, **13**(3):289-302.
- Daopin, S., Piez, K.A., Ogawa, Y. and Davies, D.R.: **Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily.** *Science* 1992, **257**(5068):369-373.
- Day, T.F., Guo, X., Garrett-Beal, L. and Yang, Y.: **Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis.** *Dev Cell* 2005, **8**(5):739-750.
- Day, T.F. and Yang, Y.: **Wnt and hedgehog signaling pathways in bone development.** *J Bone Joint Surg Am* 2008, **90 Suppl 1**:19-24.
- DeLano, W.L.: **The PyMOL Molecular Graphics System.** on World Wide Web <http://www.pymol.org> 2002.
- Ducy, P., Schinke, T. and Karsenty, G.: **The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance.** *Science* 2000, **289**(5484):1501-1504.
- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A.L. and Karsenty, G.: **Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation.** *Cell* 1997, **89**(5):747-754.
- Dyson, H.J. and Wright, P.E.: **Intrinsically unstructured proteins and their functions.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005, **6**(3):197-208.
- Ellies, D.L., Viviano, B., McCarthy, J., Rey, J.P., Itasaki, N., Saunders, S. and Krumlauf, R.: **Bone density ligand, Sclerostin, directly interacts with LRP5 but not LRP5G171V to modulate Wnt activity.** *J Bone Miner Res* 2006, **21**(11):1738-1749.
- Elliott, S., Egrie, J., Browne, J., Lorenzini, T., Busse, L., Rogers, N. and Ponting, I.: **Control of rHuEPO biological activity: the role of carbohydrate.** *Exp Hematol* 2004, **32**(12):1146-1155.
- Erlebacher, A., Filvaroff, E.H., Gitelman, S.E. and Derynck, R.: **Toward a molecular understanding of skeletal development.** *Cell* 1995, **80**(3):371-378.
- Fox, J.: **Developments in parathyroid hormone and related peptides as bone-formation agents.** *Curr Opin Pharmacol* 2002, **2**(3):338-344.
- Franz-Odenaal, T.A., Hall, B.K. and Witten, P.E.: **Buried alive: how osteoblasts become osteocytes.** *Dev Dyn* 2006, **235**(1):176-190.
- Frattini, A., Orchard, P.J., Sobacchi, C., Giliani, S., Abinun, M., Mattsson, J.P., Keeling, D.J., Andersson, A.K., Wallbrandt, P., Zecca, L., Notarangelo, L.D., Vezzoni, P. and Villa, A.: **Defects in TCIRG1 subunit of the vacuolar proton pump are responsible for a subset of human autosomal recessive osteopetrosis.** *Nat Genet* 2000, **25**(3):343-346.
- Gelb, B.D., Shi, G.P., Chapman, H.A. and Desnick, R.J.: **Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency.** *Science* 1996, **273**(5279):1236-1238.
- Gill, S.C. and von Hippel, P.H.: **Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data.** *Anal Biochem* 1989, **182**(2):319-326.

- Glass, D.A., 2nd, Bialek, P., Ahn, J.D., Starbuck, M., Patel, M.S., Clevers, H., Taketo, M.M., Long, F., McMahon, A.P., Lang, R.A. and Karsenty, G.: **Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation.** *Dev Cell* 2005, **8**(5):751-764.
- Gong, Y., Slee, R.B., Fukai, N., Rawadi, G., Roman-Roman, S., Reginato, A.M., Wang, H., Cundy, T., Glorieux, F.H., Lev, D., Zacharin, M., Oexle, K., Marcelino, J., Suwairi, W., Heeger, S., Sabatakos, G., Apte, S., Adkins, W.N., Allgrove, J., Arslan-Kirchner, M., Batch, J.A., Beighton, P., Black, G.C., Boles, R.G., Boon, L.M., Borrone, C., Brunner, H.G., Carle, G.F., Dallapiccola, B., De Paepe, A., Floege, B., Halfhide, M.L., Hall, B., Hennekam, R.C., Hirose, T., Jans, A., Juppner, H., Kim, C.A., Keppler-Noreuil, K., Kohlschuetter, A., LaCombe, D., Lambert, M., Lemyre, E., Letteboer, T., Peltonen, L., Ramesar, R.S., Romanengo, M., Somer, H., Steichen-Gersdorf, E., Steinmann, B., Sullivan, B., Superti-Furga, A., Swoboda, W., van den Boogaard, M.J., Van Hul, W., Vikkula, M., Votruba, M., Zabel, B., Garcia, T., Baron, R., Olsen, B.R. and Warman, M.L.: **LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development.** *Cell* 2001, **107**(4):513-523.
- Gonzalez, C., Rullmann, J.A.C., Bonvin, A.M.J.J., Boelens, R. and Kaptein, R.: **Toward an Nmr R Factor.** *Journal of Magnetic Resonance* 1991, **91**(3):659-664.
- Griesinger, C., Otting, G., Wuthrich, K. and Ernst, R.R.: **Clean Tocsy for H-1 Spin System-Identification in Macromolecules.** *Journal of the American Chemical Society* 1988, **110**(23):7870-7872.
- Grigoriadis, A.E., Heersche, J.N. and Aubin, J.E.: **Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone.** *J Cell Biol* 1988, **106**(6):2139-2151.
- Grigoriadis, A.E., Heersche, J.N. and Aubin, J.E.: **Continuously growing bipotential and monopotent myogenic, adipogenic, and chondrogenic subclones isolated from the multipotential RCJ 3.1 clonal cell line.** *Dev Biol* 1990, **142**(2):313-318.
- Groppe, J., Greenwald, J., Wiater, E., Rodriguez-Leon, J., Economides, A.N., Kwiatkowski, W., Affolter, M., Vale, W.W., Belmonte, J.C. and Choe, S.: **Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin.** *Nature* 2002, **420**(6916):636-642.
- Grzesiek, S. and Bax, A.: **Amino-Acid Type Determination in the Sequential Assignment Procedure of Uniformly C-13/N-15-Enriched Proteins.** *Journal of Biomolecular Nmr* 1993, **3**(2):185-204.
- Guntert, P., Braun, W., Billeter, M. and Wuthrich, K.: **Automated Stereospecific H-1-Nmr Assignments and Their Impact on the Precision of Protein-Structure Determinations in Solution.** *Journal of the American Chemical Society* 1989, **111**(11):3997-4004.
- Habas, R., Dawid, I.B. and He, X.: **Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation.** *Genes Dev* 2003, **17**(2):295-309.
- Hall, B.K. and Miyake, T.: **The membranous skeleton: the role of cell condensations in vertebrate skeletogenesis.** *Anat Embryol (Berl)* 1992, **186**(2):107-124.
- Hamersma, H., Gardner, J. and Beighton, P.: **The natural history of sclerosteosis.** *Clin Genet* 2003, **63**(3):192-197.
- Harrington, A.E., Morris-Triggs, S.A., Ruotolo, B.T., Robinson, C.V., Ohnuma, S. and Hyvonen, M.: **Structural basis for the inhibition of activin signalling by follistatin.** *Embo J* 2006, **25**(5):1035-1045.
- Hauge, E.M., Qvesel, D., Eriksen, E.F., Mosekilde, L. and Melsen, F.: **Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers.** *J Bone Miner Res* 2001, **16**(9):1575-1582.
- Heinecke, K., Seher, A., Schmitz, W., Mueller, T.D., Sebald, W. and Nickel, J.: **Receptor oligomerization and beyond: a case study in bone morphogenetic proteins.** *BMC Biol* 2009, **7**:59.
- Heldin, C.H., Miyazono, K. and ten Dijke, P.: **TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins.** *Nature* 1997, **390**(6659):465-471.

- Herrmann, T., Guntert, P. and Wuthrich, K.: **Protein NMR structure determination with automated NOE assignment using the new software CANDID and the torsion angle dynamics algorithm DYANA.** *J Mol Biol* 2002, **319**(1):209-227.
- Hodsman, A.B., Hanley, D.A., Ettinger, M.P., Bolognese, M.A., Fox, J., Metcalfe, A.J. and Lindsay, R.: **Efficacy and safety of human parathyroid hormone-(1-84) in increasing bone mineral density in postmenopausal osteoporosis.** *J Clin Endocrinol Metab* 2003, **88**(11):5212-5220.
- Hogan, B.L.: **Bone morphogenetic proteins in development.** *Curr Opin Genet Dev* 1996, **6**(4):432-438.
- Hsieh, J.C., Kodjabachian, L., Rebbert, M.L., Rattner, A., Smallwood, P.M., Samos, C.H., Nusse, R., Dawid, I.B. and Nathans, J.: **A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities.** *Nature* 1999a, **398**(6726):431-436.
- Hsieh, J.C., Rattner, A., Smallwood, P.M. and Nathans, J.: **Biochemical characterization of Wnt-frizzled interactions using a soluble, biologically active vertebrate Wnt protein.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999b, **96**(7):3546-3551.
- Hsu, D.R., Economides, A.N., Wang, X., Eimon, P.M. and Harland, R.M.: **The Xenopus dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities.** *Mol Cell* 1998, **1**(5):673-683.
- Huang, Q.Y., Li, G.H. and Kung, A.W.: **The -9247 T/C polymorphism in the SOST upstream regulatory region that potentially affects C/EBPalpha and FOXA1 binding is associated with osteoporosis.** *Bone* 2009.
- Huang, W., Yang, S., Shao, J. and Li, Y.P.: **Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation.** *Front Biosci* 2007, **12**:3068-3092.
- Ikura, M., Kay, L.E. and Bax, A.: **A Novel-Approach for Sequential Assignment of H-1, C-13, and N-15 Spectra of Larger Proteins - Heteronuclear Triple-Resonance 3-Dimensional Nmr-Spectroscopy - Application to Calmodulin.** *Biochemistry* 1990, **29**(19):4659-4667.
- Itasaki, N., Jones, C.M., Mercurio, S., Rowe, A., Domingos, P.M., Smith, J.C. and Krumlauf, R.: **Wise, a context-dependent activator and inhibitor of Wnt signalling.** *Development* 2003, **130**(18):4295-4305.
- Jeon, H., Meng, W., Takagi, J., Eck, M.J., Springer, T.A. and Blacklow, S.C.: **Implications for familial hypercholesterolemia from the structure of the LDL receptor YWTD-EGF domain pair.** *Nat Struct Biol* 2001, **8**(6):499-504.
- Jilka, R.L., Weinstein, R.S., Bellido, T., Roberson, P., Parfitt, A.M. and Manolagas, S.C.: **Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone.** *J Clin Invest* 1999, **104**(4):439-446.
- Kalajzic, I., Staal, A., Yang, W.P., Wu, Y., Johnson, S.E., Feyen, J.H., Krueger, W., Maye, P., Yu, F., Zhao, Y., Kuo, L., Gupta, R.R., Achenie, L.E., Wang, H.W., Shin, D.G. and Rowe, D.W.: **Expression profile of osteoblast lineage at defined stages of differentiation.** *J Biol Chem* 2005, **280**(26):24618-24626.
- Kamioka, H., Honjo, T. and Takano-Yamamoto, T.: **A three-dimensional distribution of osteocyte processes revealed by the combination of confocal laser scanning microscopy and differential interference contrast microscopy.** *Bone* 2001, **28**(2):145-149.
- Katagiri, T. and Takahashi, N.: **Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation.** *Oral Dis* 2002, **8**(3):147-159.
- Kawano, Y. and Kypta, R.: **Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway.** *J Cell Sci* 2003, **116**(Pt 13):2627-2634.
- Keller, H. and Kneissel, M.: **SOST is a target gene for PTH in bone.** *Bone* 2005, **37**(2):148-158.
- Kelley, R., Ren, R., Pi, X., Wu, Y., Moreno, I., Willis, M., Moser, M., Ross, M., Podkowa, M., Attisano, L. and Patterson, C.: **A concentration-dependent endocytic trap and sink mechanism converts Bmper from an activator to an inhibitor of Bmp signaling.** *J Cell Biol* 2009, **184**(4):597-609.
- Kimble, R.B., Srivastava, S., Ross, F.P., Matayoshi, A. and Pacifici, R.: **Estrogen deficiency increases the ability of stromal cells to support murine osteoclastogenesis via an interleukin-**

1 α and tumor necrosis factor-mediated stimulation of macrophage colony-stimulating factor production. *J Biol Chem* 1996, **271**(46):28890-28897.

Knappik, A., Ge, L., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Wellnhofer, G., Hoess, A., Wolle, J., Pluckthun, A. and Virnekas, B.: **Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides.** *J Mol Biol* 2000, **296**(1):57-86.

Krishnan, V., Moore, T.L., Ma, Y.L., Helvering, L.M., Frolik, C.A., Valasek, K.M., Ducy, P. and Geiser, A.G.: **Parathyroid hormone bone anabolic action requires Cbfa1/Runx2-dependent signaling.** *Mol Endocrinol* 2003, **17**(3):423-435.

Kusu, N., Laurikkala, J., Imanishi, M., Usui, H., Konishi, M., Miyake, A., Thesleff, I. and Itoh, N.: **Sclerostin is a novel secreted osteoclast-derived bone morphogenetic protein antagonist with unique ligand specificity.** *J Biol Chem* 2003, **278**(26):24113-24117.

Lacey, D.L., Timms, E., Tan, H.L., Kelley, M.J., Dunstan, C.R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S., Hsu, H., Sullivan, J., Hawkins, N., Davy, E., Capparelli, C., Eli, A., Qian, Y.X., Kaufman, S., Sarosi, I., Shalhoub, V., Senaldi, G., Guo, J., Delaney, J. and Boyle, W.J.: **Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation.** *Cell* 1998, **93**(2):165-176.

Laemmli, U.K.: **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 1970, **227**(5259):680-685.

Laphorn, A.J., Harris, D.C., Littlejohn, A., Lustbader, J.W., Canfield, R.E., Machin, K.J., Morgan, F.J. and Isaacs, N.W.: **Crystal structure of human chorionic gonadotropin.** *Nature* 1994, **369**(6480):455-461.

Laskowski, R.A., Rullmann, J.A., MacArthur, M.W., Kaptein, R. and Thornton, J.M.: **AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR.** *J Biomol NMR* 1996, **8**(4):477-486.

Lerner, U.H.: **Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis.** *J Dent Res* 2006, **85**(7):584-595.

Li, J., Sarosi, I., Cattley, R.C., Pretorius, J., Asuncion, F., Grisanti, M., Morony, S., Adamu, S., Geng, Z., Qiu, W., Kostenuik, P., Lacey, D.L., Simonet, W.S., Bolon, B., Qian, X., Shalhoub, V., Ominsky, M.S., Zhu Ke, H., Li, X. and Richards, W.G.: **Dkk1-mediated inhibition of Wnt signaling in bone results in osteopenia.** *Bone* 2006, **39**(4):754-766.

Li, L., Mao, J., Sun, L., Liu, W. and Wu, D.: **Second cysteine-rich domain of Dickkopf-2 activates canonical Wnt signaling pathway via LRP-6 independently of dishevelled.** *J Biol Chem* 2002, **277**(8):5977-5981.

Li, X., Ominsky, M.S., Niu, Q.T., Sun, N., Daugherty, B., D'Agostin, D., Kurahara, C., Gao, Y., Cao, J., Gong, J., Asuncion, F., Barrero, M., Warmington, K., Dwyer, D., Stolina, M., Morony, S., Sarosi, I., Kostenuik, P.J., Lacey, D.L., Simonet, W.S., Ke, H.Z. and Paszty, C.: **Targeted deletion of the sclerostin gene in mice results in increased bone formation and bone strength.** *J Bone Miner Res* 2008, **23**(6):860-869.

Li, X., Ominsky, M.S., Warmington, K.S., Morony, S., Gong, J., Cao, J., Gao, Y., Shalhoub, V., Tipton, B., Haldankar, R., Chen, Q., Winters, A., Boone, T., Geng, Z., Niu, Q.T., Ke, H.Z., Kostenuik, P.J., Simonet, W.S., Lacey, D.L. and Paszty, C.: **Sclerostin antibody treatment increases bone formation, bone mass, and bone strength in a rat model of postmenopausal osteoporosis.** *J Bone Miner Res* 2009, **24**(4):578-588.

Li, X., Zhang, Y., Kang, H., Liu, W., Liu, P., Zhang, J., Harris, S.E. and Wu, D.: **Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling.** *J Biol Chem* 2005.

Little, R.D., Carulli, J.P., Del Mastro, R.G., Dupuis, J., Osborne, M., Folz, C., Manning, S.P., Swain, P.M., Zhao, S.C., Eustace, B., Lappe, M.M., Spitzer, L., Zweier, S., Braunschweiger, K., Benchekroun, Y., Hu, X., Adair, R., Chee, L., FitzGerald, M.G., Tulig, C., Caruso, A., Tzellas, N., Bawa, A., Franklin, B., McGuire, S., Nogues, X., Gong, G., Allen, K.M., Anisowicz, A., Morales, A.J., Lomedico, P.T., Recker, S.M., Van Eerdewegh, P., Recker, R.R. and Johnson, M.L.: **A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait.** *Am J Hum Genet* 2002, **70**(1):11-19.

- Loots, G.G., Kneissel, M., Keller, H., Baptist, M., Chang, J., Collette, N.M., Ovcharenko, D., Plajzer-Frick, I. and Rubin, E.M.: **Genomic deletion of a long-range bone enhancer misregulates sclerostin in Van Buchem disease.** *Genome Res* 2005, **15**(7):928-935.
- MacDonald, B.R., Gallagher, J.A. and Russell, R.G.: **Parathyroid hormone stimulates the proliferation of cells derived from human bone.** *Endocrinology* 1986, **118**(6):2445-2449.
- Macura, S. and Ernst, R.R.: **Elucidation of Cross Relaxation in Liquids by Two-Dimensional Nmr-Spectroscopy.** *Molecular Physics* 1980, **41**(1):95-117.
- Mann, M. and Wilm, M.: **Electrospray mass spectrometry for protein characterization.** *Trends Biochem Sci* 1995, **20**(6):219-224.
- Mao, B. and Niehrs, C.: **Kremen2 modulates Dickkopf2 activity during Wnt/LRP6 signaling.** *Gene* 2003, **302**(1-2):179-183.
- Mao, B., Wu, W., Davidson, G., Marhold, J., Li, M., Mechler, B.M., Delius, H., Hoppe, D., Stannek, P., Walter, C., Glinka, A. and Niehrs, C.: **Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling.** *Nature* 2002, **417**(6889):664-667.
- Mao, B., Wu, W., Li, Y., Hoppe, D., Stannek, P., Glinka, A. and Niehrs, C.: **LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins.** *Nature* 2001, **411**(6835):321-325.
- Martino, S., Cauley, J.A., Barrett-Connor, E., Powles, T.J., Mershon, J., Disch, D., Secretst, R.J. and Cummings, S.R.: **Continuing outcomes relevant to Evista: breast cancer incidence in postmenopausal osteoporotic women in a randomized trial of raloxifene.** *J Natl Cancer Inst* 2004, **96**(23):1751-1761.
- Massague, J.: **TGF-beta signal transduction.** *Annu Rev Biochem* 1998, **67**:753-791.
- Massague, J. and Chen, Y.G.: **Controlling TGF-beta signaling.** *Genes Dev* 2000, **14**(6):627-644.
- Miller, P.D., McClung, M.R., Macovei, L., Stakkestad, J.A., Luckey, M., Bonvoisin, B., Reginster, J.Y., Recker, R.R., Hughes, C., Lewiecki, E.M., Felsenberg, D., Delmas, P.D., Kendler, D.L., Bolognese, M.A., Mairon, N. and Cooper, C.: **Monthly oral ibandronate therapy in postmenopausal osteoporosis: 1-year results from the MOBILE study.** *J Bone Miner Res* 2005, **20**(8):1315-1322.
- Morvan, F., Boulukos, K., Clement-Lacroix, P., Roman Roman, S., Suc-Royer, I., Vayssiere, B., Ammann, P., Martin, P., Pinho, S., Pognonec, P., Mollat, P., Niehrs, C., Baron, R. and Rawadi, G.: **Deletion of a single allele of the Dkk1 gene leads to an increase in bone formation and bone mass.** *J Bone Miner Res* 2006, **21**(6):934-945.
- Moustakas, A., Souchelnytskyi, S. and Heldin, C.H.: **Smad regulation in TGF-beta signal transduction.** *J Cell Sci* 2001, **114**(Pt 24):4359-4369.
- Mukhopadhyay, M., Shtrom, S., Rodriguez-Esteban, C., Chen, L., Tsukui, T., Gomer, L., Dorward, D.W., Glinka, A., Grinberg, A., Huang, S.P., Niehrs, C., Belmonte, J.C. and Westphal, H.: **Dickkopf1 is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse.** *Dev Cell* 2001, **1**(3):423-434.
- Mundlos, S. and Olsen, B.R.: **Heritable diseases of the skeleton. Part II: Molecular insights into skeletal development-matrix components and their homeostasis.** *Faseb J* 1997, **11**(4):227-233.
- Nakamura, K., Era, S., Ozaki, Y., Sogami, M., Hayashi, T. and Murakami, M.: **Conformational changes in seventeen cystine disulfide bridges of bovine serum albumin proved by Raman spectroscopy.** *FEBS Lett* 1997, **417**(3):375-378.
- Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R. and de Crombrughe, B.: **The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation.** *Cell* 2002, **108**(1):17-29.
- Nilges, M., Clore, G.M. and Gronenborn, A.M.: **Determination of three-dimensional structures of proteins from interproton distance data by hybrid distance geometry-dynamical simulated annealing calculations.** *FEBS Lett* 1988, **229**(2):317-324.
- Odvina, C.V., Zerwekh, J.E., Rao, D.S., Maalouf, N., Gottschalk, F.A. and Pak, C.Y.: **Severely suppressed bone turnover: a potential complication of alendronate therapy.** *J Clin Endocrinol Metab* 2005, **90**(3):1294-1301.

- Onichtchouk, D., Chen, Y.G., Dosch, R., Gawantka, V., Delius, H., Massague, J. and Niehrs, C.: **Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI.** *Nature* 1999, **401**(6752):480-485.
- Peng, J.W. and Wagner, G.: **Investigation of Protein Motions Via Relaxation Measurements.** *Nuclear Magnetic Resonance, Pt C* 1994, **239**:563-596.
- Piters, E., Boudin, E. and Van Hul, W.: **Wnt signaling: a win for bone.** *Arch Biochem Biophys* 2008, **473**(2):112-116.
- Poole, K.E. and Reeve, J.: **Parathyroid hormone - a bone anabolic and catabolic agent.** *Curr Opin Pharmacol* 2005a, **5**(6):612-617.
- Poole, K.E., van Bezooijen, R.L., Loveridge, N., Hamersma, H., Papapoulos, S.E., Lowik, C.W. and Reeve, J.: **Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation.** *Faseb J* 2005b, **19**(13):1842-1844.
- Rawadi, G., Vayssiere, B., Dunn, F., Baron, R. and Roman-Roman, S.: **BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop.** *J Bone Miner Res* 2003, **18**(10):1842-1853.
- Reddi, A.H.: **Bone morphogenetic proteins: an unconventional approach to isolation of first mammalian morphogens.** *Cytokine Growth Factor Rev* 1997, **8**(1):11-20.
- Rentzsch, F., Zhang, J., Kramer, C., Sebald, W. and Hammerschmidt, M.: **Crossveinless 2 is an essential positive feedback regulator of Bmp signaling during zebrafish gastrulation.** *Development* 2006, **133**(5):801-811.
- Riggs, B.L., Khosla, S. and Melton, L.J., 3rd: **Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton.** *Endocr Rev* 2002, **23**(3):279-302.
- Robey, P.G., Fedarko, N.S., Hefferan, T.E., Bianco, P., Vetter, U.K., Grzesik, W., Friedenstein, A., Van der Pluijm, G., Mintz, K.P., Young, M.F. and et al.: **Structure and molecular regulation of bone matrix proteins.** *J Bone Miner Res* 1993, **8 Suppl 2**:S483-487.
- Robling, A.G., Niziolek, P.J., Baldrige, L.A., Condon, K.W., Allen, M.R., Alam, I., Mantila, S.M., Gluhak-Heinrich, J., Bellido, T.M., Harris, S.E. and Turner, C.H.: **Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin.** *J Biol Chem* 2008, **283**(9):5866-5875.
- Rothe, C., Urlinger, S., Lohning, C., Prassler, J., Stark, Y., Jager, U., Hubner, B., Bardroff, M., Pradel, I., Boss, M., Bittlingmaier, R., Bataa, T., Frisch, C., Brocks, B., Honegger, A. and Urban, M.: **The human combinatorial antibody library HuCAL GOLD combines diversification of all six CDRs according to the natural immune system with a novel display method for efficient selection of high-affinity antibodies.** *J Mol Biol* 2008, **376**(4):1182-1200.
- Rudenko, G., Henry, L., Henderson, K., Ichtchenko, K., Brown, M.S., Goldstein, J.L. and Deisenhofer, J.: **Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH.** *Science* 2002, **298**(5602):2353-2358.
- Rulifson, E.J., Wu, C.H. and Nusse, R.: **Pathway specificity by the bifunctional receptor frizzled is determined by affinity for wingless.** *Mol Cell* 2000, **6**(1):117-126.
- Saremba, S., Nickel, J., Seher, A., Kotzsch, A., Sebald, W. and Mueller, T.D.: **Type I receptor binding of bone morphogenetic protein 6 is dependent on N-glycosylation of the ligand.** *Febs J* 2008, **275**(1):172-183.
- Scheufler, C., Sebald, W. and Hulsmeyer, M.: **Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution.** *J Mol Biol* 1999, **287**(1):103-115.
- Schlesinger, P.H., Blair, H.C., Teitelbaum, S.L. and Edwards, J.C.: **Characterization of the osteoclast ruffled border chloride channel and its role in bone resorption.** *J Biol Chem* 1997, **272**(30):18636-18643.
- Schwieters, C.D., Kuszewski, J.J., Tjandra, N. and Clore, G.M.: **The Xplor-NIH NMR molecular structure determination package.** *Journal of Magnetic Resonance* 2003, **160**(1):65-73.
- Semenov, M., Tamai, K. and He, X.: **SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor.** *J Biol Chem* 2005, **280**(29):26770-26775.
- Semenov, M.V. and He, X.: **LRP5 mutations linked to high bone mass diseases cause reduced LRP5 binding and inhibition by SOST.** *J Biol Chem* 2006, **281**(50):38276-38284.

- Serpe, M., Umulis, D., Ralston, A., Chen, J., Olson, D.J., Avanesov, A., Othmer, H., O'Connor, M.B. and Blair, S.S.: **The BMP-binding protein Crossveinless 2 is a short-range, concentration-dependent, biphasic modulator of BMP signaling in Drosophila.** *Dev Cell* 2008, **14**(6):940-953.
- Shimmi, O. and O'Connor, M.B.: **Physical properties of Tld, Sog, Tsg and Dpp protein interactions are predicted to help create a sharp boundary in Bmp signals during dorsoventral patterning of the Drosophila embryo.** *Development* 2003, **130**(19):4673-4682.
- Shiotani, A., Takami, M., Itoh, K., Shibasaki, Y. and Sasaki, T.: **Regulation of osteoclast differentiation and function by receptor activator of NFkB ligand and osteoprotegerin.** *Anat Rec* 2002, **268**(2):137-146.
- Siegfried, E., Chou, T.B. and Perrimon, N.: **wingless signaling acts through zeste-white 3, the Drosophila homolog of glycogen synthase kinase-3, to regulate engrailed and establish cell fate.** *Cell* 1992, **71**(7):1167-1179.
- Simonet, W.S., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Kelley, M., Chang, M.S., Luthy, R., Nguyen, H.Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H.L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T.M., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., Sander, S., Van, G., Tarpley, J., Derby, P., Lee, R. and Boyle, W.J.: **Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density.** *Cell* 1997, **89**(2):309-319.
- Smith, G.E., Ju, G., Ericson, B.L., Moschera, J., Lahm, H.W., Chizzonite, R. and Summers, M.D.: **Modification and secretion of human interleukin 2 produced in insect cells by a baculovirus expression vector.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985, **82**(24):8404-8408.
- Stamler, R., Keutmann, H.T., Sidis, Y., Kattamuri, C., Schneyer, A. and Thompson, T.B.: **The structure of FSTL3.activin A complex. Differential binding of N-terminal domains influences follistatin-type antagonist specificity.** *J Biol Chem* 2008, **283**(47):32831-32838.
- Steidl, S., Ratsch, O., Brocks, B., Durr, M. and Thomassen-Wolf, E.: **In vitro affinity maturation of human GM-CSF antibodies by targeted CDR-diversification.** *Mol Immunol* 2008, **46**(1):135-144.
- Stein, S.A., Witkop, C., Hill, S., Fallon, M.D., Viernstein, L., Gucer, G., McKeever, P., Long, D., Altman, J., Miller, N.R., Teitelbaum, S.L. and Schlesinger, S.: **Sclerosteosis: neurogenetic and pathophysiological analysis of an American kinship.** *Neurology* 1983, **33**(3):267-277.
- Sugeta, H. and Go, A.: **S-S and C-S Stretching Vibrations and Molecular Conformations of Dialkyl Disulfides and Cystine.** *Chemistry Letters* 1972(1):83-&.
- Sutherland, M.K., Geoghegan, J.C., Yu, C., Turcott, E., Skonier, J.E., Winkler, D.G. and Latham, J.A.: **Sclerostin promotes the apoptosis of human osteoblastic cells: a novel regulation of bone formation.** *Bone* 2004, **35**(4):828-835.
- Takagi, J., Petre, B.M., Walz, T. and Springer, T.A.: **Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling.** *Cell* 2002, **110**(5):599-511.
- Takagi, J., Yang, Y., Liu, J.H., Wang, J.H. and Springer, T.A.: **Complex between nidogen and laminin fragments reveals a paradigmatic beta-propeller interface.** *Nature* 2003, **424**(6951):969-974.
- Tamai, K., Semenov, M., Kato, Y., Spokony, R., Liu, C., Katsuyama, Y., Hess, F., Saint-Jeannet, J.P. and He, X.: **LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction.** *Nature* 2000, **407**(6803):530-535.
- Tamai, K., Zeng, X., Liu, C., Zhang, X., Harada, Y., Chang, Z. and He, X.: **A mechanism for Wnt coreceptor activation.** *Mol Cell* 2004, **13**(1):149-156.
- Teitelbaum, S.L.: **Bone resorption by osteoclasts.** *Science* 2000, **289**(5484):1504-1508.
- Teitelbaum, S.L.: **Osteoclasts: what do they do and how do they do it?** *Am J Pathol* 2007, **170**(2):427-435.
- Teitelbaum, S.L. and Ross, F.P.: **Genetic regulation of osteoclast development and function.** *Nat Rev Genet* 2003, **4**(8):638-649.
- ten Dijke, P., Fu, J., Schaap, P. and Roelen, B.A.: **Signal transduction of bone morphogenetic proteins in osteoblast differentiation.** *J Bone Joint Surg Am* 2003, **85-A Suppl 3**:34-38.

- ten Dijke, P., Krause, C., de Gorter, D.J., Lowik, C.W. and van Bezooijen, R.L.: **Osteocyte-derived sclerostin inhibits bone formation: its role in bone morphogenetic protein and Wnt signaling.** *J Bone Joint Surg Am* 2008, **90 Suppl 1**:31-35.
- Thompson, T.B., Lerch, T.F., Cook, R.W., Woodruff, T.K. and Jandetzky, T.S.: **The structure of the follistatin:activin complex reveals antagonism of both type I and type II receptor binding.** *Dev Cell* 2005, **9(4)**:535-543.
- Udagawa, N., Takahashi, N., Akatsu, T., Tanaka, H., Sasaki, T., Nishihara, T., Koga, T., Martin, T.J. and Suda, T.: **Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, **87(18)**:7260-7264.
- Ulloa-Aguirre, A., Timossi, C., Damian-Matsumura, P. and Dias, J.A.: **Role of glycosylation in function of follicle-stimulating hormone.** *Endocrine* 1999, **11(3)**:205-215.
- Urist, M.R.: **Bone: formation by autoinduction.** *Science* 1965, **150(698)**:893-899.
- Vaes, B.L., Dechering, K.J., van Someren, E.P., Hendriks, J.M., van de Ven, C.J., Feijen, A., Mummery, C.L., Reinders, M.J., Olijve, W., van Zoelen, E.J. and Steegenga, W.T.: **Microarray analysis reveals expression regulation of Wnt antagonists in differentiating osteoblasts.** *Bone* 2005, **36(5)**:803-811.
- van Bezooijen, R.L., Roelen, B.A., Visser, A., van der Wee-Pals, L., de Wilt, E., Karperien, M., Hamersma, H., Papapoulos, S.E., ten Dijke, P. and Lowik, C.W.: **Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist.** *J Exp Med* 2004, **199(6)**:805-814.
- 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. and Lowik, C.W.: **Wnt but not BMP signaling is involved in the inhibitory action of sclerostin on BMP-stimulated bone formation.** *J Bone Miner Res* 2007, **22(1)**:19-28.
- van Bezooijen, R.L., ten Dijke, P., Papapoulos, S.E. and Lowik, C.W.: **SOST/sclerostin, an osteocyte-derived negative regulator of bone formation.** *Cytokine Growth Factor Rev* 2005, **16(3)**:319-327.
- Van Buchem, F.S., Hadders, H.N. and Ubbens, R.: **An uncommon familial systemic disease of the skeleton: hyperostosis corticalis generalisata familiaris.** *Acta Radiol* 1955, **44(2)**:109-120.
- Van Hul, W., Balemans, W., Van Hul, E., Dikkers, F.G., Obee, H., Stokroos, R.J., Hildering, P., Vanhoenacker, F., Van Camp, G. and Willems, P.J.: **Van Buchem disease (hyperostosis corticalis generalisata) maps to chromosome 17q12-q21.** *Am J Hum Genet* 1998, **62(2)**:391-399.
- Van Wesenbeeck, L., Cleiren, E., Gram, J., Beals, R.K., Benichou, O., Scopelliti, D., Key, L., Renton, T., Bartels, C., Gong, Y., Warman, M.L., De Vernejoul, M.C., Bollerslev, J. and Van Hul, W.: **Six novel missense mutations in the LDL receptor-related protein 5 (LRP5) gene in different conditions with an increased bone density.** *Am J Hum Genet* 2003, **72(3)**:763-771.
- Vanhoenacker, F.M., Balemans, W., Tan, G.J., Dikkers, F.G., De Schepper, A.M., Mathysen, D.G., Bernaerts, A. and Hul, W.V.: **Van Buchem disease: lifetime evolution of radioclinical features.** *Skeletal Radiol* 2003, **32(12)**:708-718.
- Vaughn, J.L., Goodwin, R.H., Tompkins, G.J. and McCawley, P.: **The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae).** *In Vitro* 1977, **13(4)**:213-217.
- Veeman, M.T., Slusarski, D.C., Kaykas, A., Louie, S.H. and Moon, R.T.: **Zebrafish prickles, a modulator of noncanonical Wnt/Fz signaling, regulates gastrulation movements.** *Curr Biol* 2003, **13(8)**:680-685.
- Verborgt, O., Tatton, N.A., Majeska, R.J. and Schaffler, M.B.: **Spatial distribution of Bax and Bcl-2 in osteocytes after bone fatigue: complementary roles in bone remodeling regulation?** *J Bone Miner Res* 2002, **17(5)**:907-914.
- Veverka, V., Henry, A.J., Slocombe, P.M., Ventom, A., Mulloy, B., Muskett, F.W., Muzylak, M., Greenslade, K., Moore, A., Zhang, L., Gong, J., Qian, X., Paszty, C., Taylor, R.J., Robinson, M.K. and Carr, M.D.: **Characterization of the structural features and interactions of sclerostin: molecular**

- insight into a key regulator of Wnt-mediated bone formation.** *J Biol Chem* 2009, **284**(16):10890-10900.
- Wagner, D.S. and Mullins, M.C.: **Modulation of BMP activity in dorsal-ventral pattern formation by the chordin and ogon antagonists.** *Dev Biol* 2002, **245**(1):109-123.
- Wang, H.Y. and Malbon, C.C.: **Wnt signaling, Ca²⁺, and cyclic GMP: visualizing Frizzled functions.** *Science* 2003, **300**(5625):1529-1530.
- Wang, K., Zhang, Y., Li, X., Chen, L., Wang, H., Wu, J., Zheng, J. and Wu, D.: **Characterization of the Kremen-binding site on Dkk1 and elucidation of the role of Kremen in Dkk-mediated Wnt antagonism.** *J Biol Chem* 2008, **283**(34):23371-23375.
- Weber, D., Kotzsch, A., Nickel, J., Harth, S., Seher, A., Mueller, U., Sebald, W. and Mueller, T.D.: **A silent H-bond can be mutationally activated for high-affinity interaction of BMP-2 and activin type IIB receptor.** *BMC Struct Biol* 2007, **7**:6.
- Wehrli, M., Dougan, S.T., Caldwell, K., O'Keefe, L., Schwartz, S., Vaizel-Ohayon, D., Schejter, E., Tomlinson, A. and DiNardo, S.: **arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling.** *Nature* 2000, **407**(6803):527-530.
- Wergedal, J.E., Veskovcic, K., Hellan, M., Nyght, C., Balemans, W., Libanati, C., Vanhoenacker, F.M., Tan, J., Baylink, D.J. and Van Hul, W.: **Patients with Van Buchem disease, an osteosclerotic genetic disease, have elevated bone formation markers, higher bone density, and greater derived polar moment of inertia than normal.** *J Clin Endocrinol Metab* 2003, **88**(12):5778-5783.
- Wiederstein, M.J.S.a.M.: **A note on difficult structure alignment problems.** *Bioinformatics* 2008, **24**:426-427.
- 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. and Latham, J.A.: **Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist.** *Embo J* 2003, **22**(23):6267-6276.
- Wishart, D.S., Bigam, C.G., Holm, A., Hodges, R.S. and Sykes, B.D.: **1H, 13C and 15N random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigations of nearest-neighbor effects.** *J Biomol NMR* 1995, **5**(1):67-81.
- Wishart, D.S., Sykes, B.D. and Richards, F.M.: **The chemical shift index: a fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy.** *Biochemistry* 1992, **31**(6):1647-1651.
- Wotton, D. and Massague, J.: **Smad transcriptional corepressors in TGF beta family signaling.** *Curr Top Microbiol Immunol* 2001, **254**:145-164.
- Wozney, J.M., Rosen, V., Celeste, A.J., Mitscock, L.M., Whitters, M.J., Kriz, R.W., Hewick, R.M. and Wang, E.A.: **Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities.** *Science* 1988, **242**(4885):1528-1534.
- Wu, C.H. and Nusse, R.: **Ligand receptor interactions in the Wnt signaling pathway in Drosophila.** *J Biol Chem* 2002, **277**(44):41762-41769.
- Yang-Snyder, J., Miller, J.R., Brown, J.D., Lai, C.J. and Moon, R.T.: **A frizzled homolog functions in a vertebrate Wnt signaling pathway.** *Curr Biol* 1996, **6**(10):1302-1306.
- Yao, W., Cheng, Z., Pham, A., Busse, C., Zimmermann, E.A., Ritchie, R.O. and Lane, N.E.: **Glucocorticoid-induced bone loss in mice can be reversed by the actions of parathyroid hormone and risedronate on different pathways for bone formation and mineralization.** *Arthritis Rheum* 2008, **58**(11):3485-3497.
- Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinoshita, M., Mochizuki, S., Tomoyasu, A., Yanai, K., Goto, M., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T., Higashio, K., Udagawa, N., Takahashi, N. and Suda, T.: **Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**(7):3597-3602.
- Young, M.F., Kerr, J.M., Ibaraki, K., Heegaard, A.M. and Robey, P.G.: **Structure, expression, and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone.** *Clin Orthop Relat Res* 1992(281):275-294.

Literaturverzeichnis

Zakin, L., Metzinger, C.A., Chang, E.Y., Coffinier, C. and De Robertis, E.M.: **Development of the vertebral morphogenetic field in the mouse: interactions between Crossveinless-2 and Twisted Gastrulation.** *Dev Biol* 2008, **323**(1):6-18.

Zhang, J.L., Qiu, L.Y., Kotsch, A., Weidauer, S., Patterson, L., Hammerschmidt, M., Sebald, W. and Mueller, T.D.: **Crystal structure analysis reveals how the Chordin family member crossveinless 2 blocks BMP-2 receptor binding.** *Dev Cell* 2008, **14**(5):739-750.

Zhang, Y., Wang, Y., Li, X., Zhang, J., Mao, J., Li, Z., Zheng, J., Li, L., Harris, S. and Wu, D.: **The LRP5 high-bone-mass G171V mutation disrupts LRP5 interaction with Mesd.** *Mol Cell Biol* 2004, **24**(11):4677-4684.

Zhu, H., Kavsak, P., Abdollah, S., Wrana, J.L. and Thomsen, G.H.: **A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation.** *Nature* 1999, **400**(6745):687-693.

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

8 Anhang

8.1 Aminosäuresequenzen

8.2 *Humanes Sclerostin* (www.uniprot.org/uniprot/Q9BQB4)

MQLPLALCLV CLLVHTAFRV VEGQGWQAFK NDATEIIPEL GEYPEPPPEL
 ENNKTMNRAE NGGRPPHHPF ETKDVSEYSC RELHFTRYVT DGP^CRSAPV
 TELV^CSGQ^CG PARLLPNAIG RGKWWRPSPG DFR^CIPDRYR AQRVQLL^CPG
 GEAPRARKVR LVAS^CK^CKRL TRFHNQSELK DFGTEAARPQ KGRKPRPRAR
 SAKANQAELE NAY

(Die Signalsequenz ist in grün dargestellt.)

8.3 *Murines Sclerostin* (www.uniprot.org/uniprot/Q99P68)

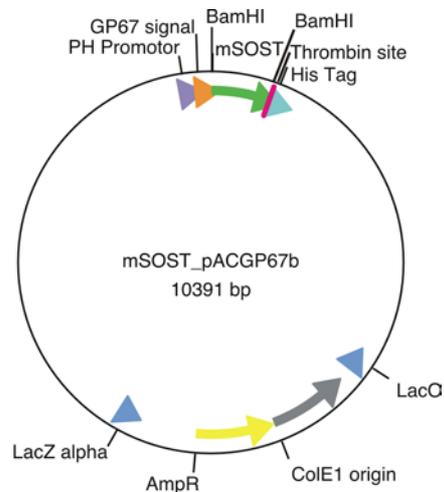
MQPSLAPCLI CLLVHAAFCA VEGQGWQAFR NDATEVIPGL GEYPEPPPEN
 NQTMNRAENG GRPPHHPYDA KGVSEYSCRE LHYTRFLTDG P^CRSAPVTE
 LV^CSGQ^CGPA RLLPNAIGRV KWWRPNGPDF RCIPDRYRAQ RVQLL^CPGGA
 APRSRKVRV AS^CK^CKRLTR FHNQSELKDF GPETARPQKG RKPRPGARGA
 KANQAELENA Y

(Die Signalsequenz ist in grün dargestellt.)

8.4 Sequenzen der Expressionskonstrukte

Im Folgenden sind die cDNA- und Aminosäuresequenzen der in der Arbeit beschriebenen Expressionskonstrukte angegeben. Die Konsensussequenz der Restriktionsendonukleasen ist in rot dargestellt, die Hexahistidinsequenz in blau und die Thrombinschnittstelle in grün. In der angegebenen Aminosäuresequenz sind die Aminosäuren grau dargestellt, die aus dem Vektor resultieren.

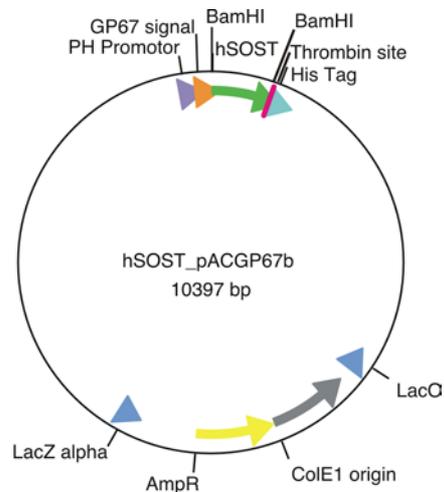
8.4.1 mSOST_pACGP67b



ATGCTACTAGTAAATCAGTCACACCAAGGCTTCAATAAGGAACACACAAGCAAG
 ATGGTAAGCGCTATTGTTTTATATGTGCTTTTGGCGGGCGGGCGGCATTCTGCCTT
 TCGCGCGGATCTTGGATCCGAGGGCCAGGGGTGGCAAGCCTTCAGGAATGATGC
 CACAGAGGTCATCCCAGGGCTTGGAGAGTACCCCGAGCCTCCTCCTGAGAACAA
 CCAGACCATGAACCGGGCGGAGAATGGAGGCAGACCTCCCCACCATCCCTATGA
 CGCCAAAGATGTGTCCGAGTACAGCTGCCGCGAGCTGCACTACACCCGCTTCCTG
 ACAGACGGCCCATGCCGACGCGCCAAGCCGGTCACCGAGTTGGTGTGCTCCGGC
 CAGTGCGGCCCGCGCGGCTGCTGCCCAACGCCATCGGGCGCGTGAAGTGGTGG
 CGCCCGAACGGACCGGATTTCCGCTGCATCCCGGATCGCTACCGCGCGCAGCGGG
 TGCAGCTGCTGTGCCCCGGGGGCGCGGCCGCGCTCGCGCAAGGTGCGTCTGGT
 GGCTCGTGCAAGTGCAAGCGCCTCACCCGCTTCCACAACCAGTCGGAGCTCAAG
 GACTTCGGGCCGGAGACCGCGCGGCCGAGAAAGGGTCGCAAGCCGCGGCCCGGC
 GCCCGGGGAGCCAAAGCCAACCAGGCGGAGCTGGAGAACGCCTACGGATCCTTG
 GTCCCTCGAGGAAGCCATCACCATCACCATCACGGAGCATAATGA

ADLGSEGQGWQAFRNDATEVIPGLGEYPEPPENNQTMNRAENGRPPHPYDAKD
 VSEYSCRELHYTRFLTDGPCRS AKPVTELVCSGQCGRLLPNAIGRVKWWRPNGPD
 FRCIPDRYRAQRVQLLCPGGAAPRSRKVRLVASCKCKRLTRFHNQSELKDFGPETAR
 PQKGRKPRPGARGAKANQAELENAYGSLVPRGSHHHHHHGA

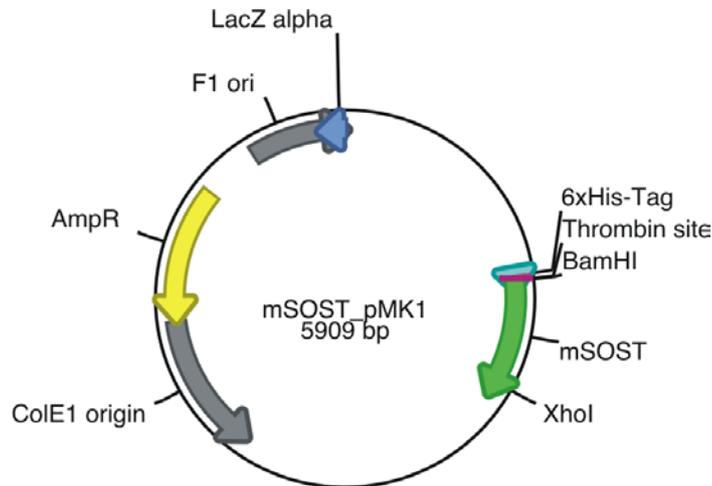
8.4.2 hSOST_pACGP67b



ATGCTACTAGTAAATCAGTCACACCAAGGCTTCAATAAGGAACACACAAGCAAG
 ATGGTAAGCGCTATTGTTTTATATGTGCTTTTGGCGGCGGCGGCGCATTCTGCCTT
 TCGGCGGATCTTGGATCCGAGGGCCAGGGGTGGCAGGCGTTCAAGAATGATGC
 CACGGAAATCATCCCCGAGCTCGGAGAGTACCCCGAGCCTCCACCGGAGCTGGA
 GAACAACAAGACCATGAACCGGGCGGAGAACGGAGGGCGGCCTCCCCACCACCC
 CTTTGAGACCAAAGACGTGTCCGAGTACAGCTGCCGCGAGCTGCACTTCACCCGC
 TACGTGACCGATGGGCCGTGCCGACGCGCCAAGCCGGTCACCGAGCTGGTGTGCT
 CCGGCCAGTGCGGCCCGGCGCGCCTGCTGCCCAACGCCATCGGCCGCGGCAAGT
 GGTGGCGACCTAGTGGGCCCGACTTCCGCTGCATCCCCGACCGCTACCGCGCGCA
 GCGCGTGCAGCTGCTGTGTCCCGTGGTGAGGCGCCGCGCGCGCAAGGTGCG
 CCTGGTGGCCTCGTGCAAGTGCAAGCGCCTCACCCGCTTCCACAACCAGTCGGAG
 CTCAAGGACTTCGGGACCGAGGCCGCTCGGCCGCAGAAGGGCCGGAAGCCGCGG
 CCCC GCGCCCGGAGCGCCAAAGCCAACCAGGCCGAGCTGGAGAACGCCTACGGAT
 TCCTTGGTCCCTCGAGGAAGCCATCACCATCACCATCACGGAGCATAATGA

ADLGSEGQGWQAFKNDATEIPELGEYPEPPPELENNKTMNRAENGGRPPHHPFETK
 DVSEYSCRELHFTRYVTDGPCRSAPVTELVCSGQCGPARLLPNAIGRGKWWRPSGP
 DFRICIPDRYRAQRVQLLCPGGEAPRARKVRLVASCKCKRLTRFHNQSELKDFGTEAA
 RPQKGRKPRPRARSAKANQAELENAYGSLVPRGSHHHHHHGA

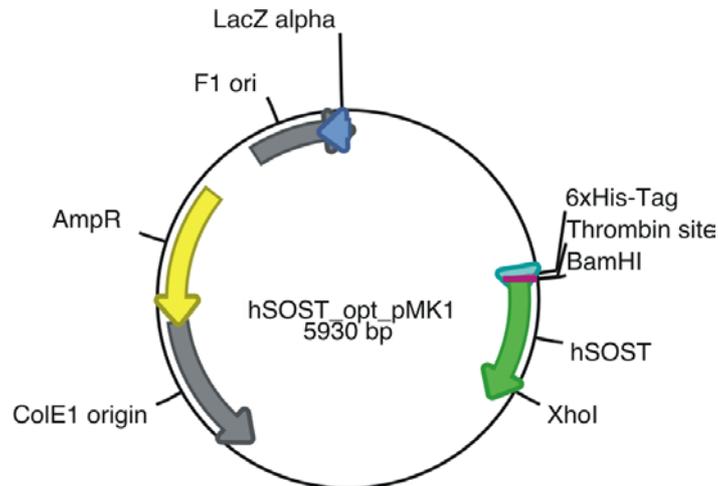
8.4.3 mSOST_pMK1



ATGGTCCATCATCACCACCATCACTCCGCGGGTTTGGTGCCAGAGGATCCGAGG
 GCCAGGGGTGGCAAGCCTTCAGGAATGATGCCACAGAGGTCATCCCAGGGCTTG
 GAGAGTACCCCGAGCCTCCTCCTGAGAACAACCAGACCATGAACCGGGCGGAGA
 ATGGAGGCAGACCTCCCCACCATCCCTATGACGCCAAAGATGTGTCCGAGTACAG
 CTGCCGCGAGCTGCACTACACCCGCTTCCTGACAGACGGCCCATGCCGCAGCGCC
 AAGCCGGTCACCGAGTTGGTGTGCTCCGGCCAGTGCGGGCCCCGCGCGGCTGCTGC
 CCAACGCCATCGGGCGCGTGAAGTGGTGGCGCCCGAACGGACCGGATTTCCGCT
 GCATCCCGGATCGCTACCGCGCGCAGCGGGTGCAGCTGCTGTGCCCCGGGGGCG
 CGGCGCCGCGCTCGCGCAAGGTGCGTCTGGTGGCCTCGTGCAAGTGCAAGCGCCT
 CACCCGCTTCCACAACCAGTCGGAGCTCAAGGACTTCGGGCCGGAGACCGCGCG
 GCCGCAGAAGGGTCGCAAGCCGCGGCCCGGCGCCCCGGGGAGCCAAAGCCAACCA
 GGCGGAGCTGGAGAACGCCTACTGACTCGAG

MVHHHHHSAGLVPRGSEGQGWQAFRNDATEVIPGLGEYPEPPENNQTMNRAEN
 GGRPPHHPYDAKDVSEYSCRELHYTRFLTDGPCRSAKPVTELVCSGQCGRLLPNA
 IGRVKKWWRPNPDFRCIPDRYRAQRVQLLCPGGAAPRSRKVRLVASCKCKRLTRFH
 NQSELKDFGPETARPQKGRKPRPGARGAKANQAELENAY

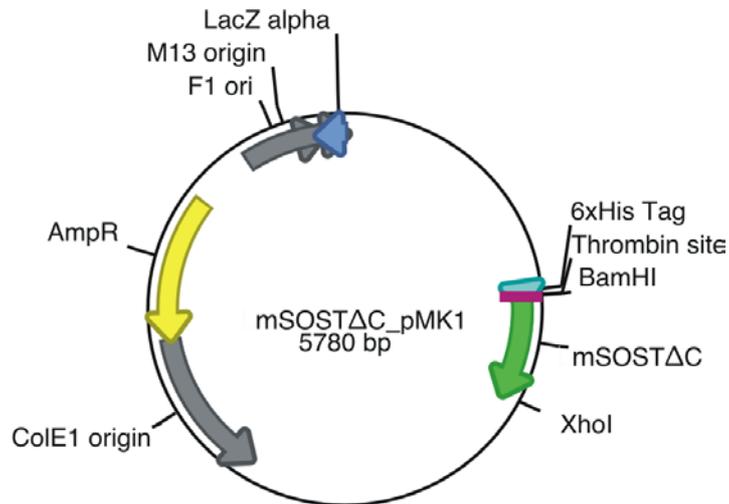
8.4.4 hSOST_opt_pMK1



ATGGTCCATCATCACCACCATCACTCCGCGGGTTTGGTGCCAGAGGATCCAGAT
 CTGAGGGCCAGGGCTGGCAGGCCTTCAAGAACGATGCCACCGAGATCATCCCCG
 AGCTGGGCGAGTACCCCGAGCCCCACCCGAGCTGGAGAACAACAAGACCATGA
 ACCGCGCCGAGAACGGCGGACGCCCACCACACCACCCCTTCGAGACCAAGGATG
 TGAGCGAGTACAGCTGCCGCGAGCTGCACTTCACCCGCTACGTGACCGATGGCCC
 CTGCCGACGCGCAAGCCCGTGACCGAGCTGGTCTGCAGCGGCCAGTGCGGCC
 AGCCCGCCTGCTGCCCAACGCCATCGGACGCGGAAAGTGGTGGCGCCCCAGCGG
 CCCAGATTTCCGCTGCATCCCCGATCGCTACCGCGCCCAGCGCGTGCAGCTGCTG
 TGCCCAGGCGGGCAGGCCCCACGTGCCCGTAAGGTCCGCCTGGTGGCCAGCTGC
 AAGTGCAAGCGCCTGACCCGCTTCCACAACCAGAGCGAGCTGAAGGATTTCCGC
 ACCGAAGCCGCCCCTCCACAGAAGGGCCGCAAGCCACGCCACGCGCCCCGCTCC
 GCCAAGGCCAACCAGGCCGAAGTGGAAAATGCCTACTCTAGATAATAA**CTCGAG**

MV**HHHHHS**AGL**VPRGSR**SEGQGWQAFKNDATEIIPELGEYPEPPPELENNKTMNR
 AENGRPPHHPFETKDVSEYSCRELHFTRYVTDGPCRSAPVTELVCSGQCGPARLL
 PNAIGRGKWWRPSGPDFRCIPDRYRAQRVQLLCPGGEAPRARKVRLVASCKCKRLT
 RFHNQSELKDFGTEAARPQKGRKPRPRARSAKANQAELENAYS

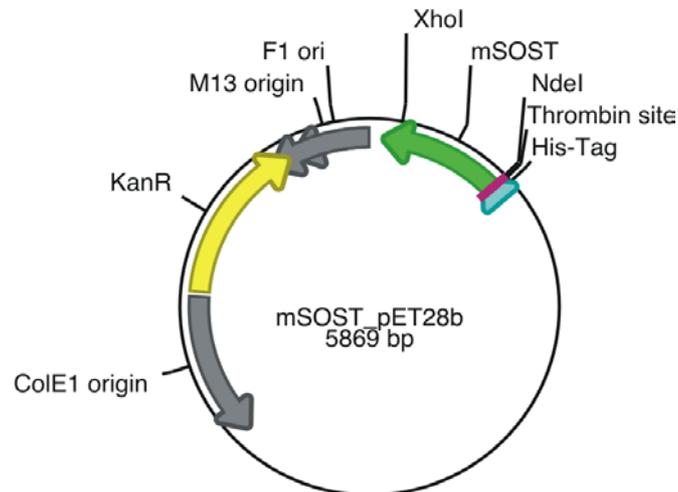
8.4.5 mSOST Δ C_pMK1



ATGGTCCATCATCACCACCATCACTCCGCGGGTTTGGTGCCAGAGGATCCGAGG
 GCCAGGGGTGGCAAGCCTTCAGGAATGATGCCACAGAGGTCATCCCAGGGCTTG
 GAGAGTACCCCGAGCCTCCTCCTGAGAACAACCAGACCATGAACCGGGCGGAGA
 ATGGAGGCAGACCTCCCCACCATCCCTATGACGCCAAAGATGTGTCCGAGTACAG
 CTGCCGCGAGCTGCACTACACCCGCTTCTGACAGACGGCCCATGCCGCAGCGCC
 AAGCCGGTCACCGAGTTGGTGTGCTCCGGCCAGTGCGGCCCCCGCGCGGCTGCTGC
 CCAACGCCATCGGGCGCGTGAAGTGGTGGCGCCCGAACGGACCGGATTTCCGCT
 GCATCCCGGATCGCTACCGCGCGCAGCGGGTGCAGCTGCTGTGCCCCGGGGGCG
 CGGCGCCGCGCTCGCGCAAGGTGCGTCTGGTGGCCTCGTGCAAGTGCAAGCGC
 TAGTAACTCGAG

MVHHHHHSAGLVPRGSEGQGWQAFRNDATEVIPGLGEYPEPPENNQTMNRAEN
 GGRPPHPYDAKDVSEYSCRELHYTRFLTDGPCRSAKPVTELVCSGQCGRLLPNA
 IGRVKWWRPNPDFRCIPDRYRAQRVQLLCPGGAAPRSRKVRLVASCKCKR

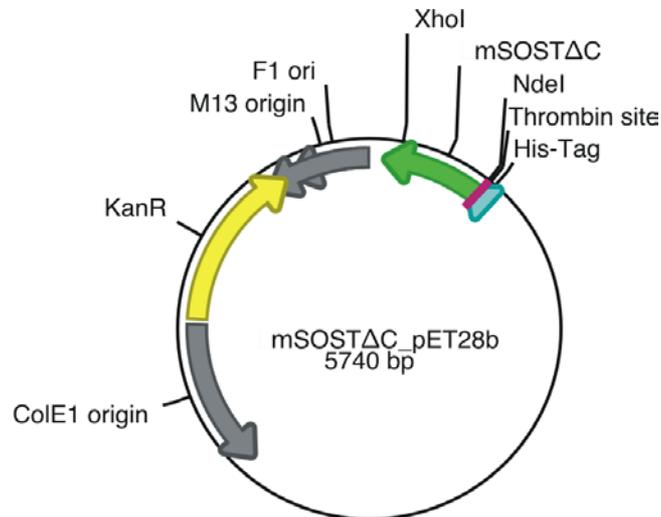
8.4.6 mSOST_pET28b



ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGC
 AGCCATATGGAGGGCCAGGGGTGGCAAGCCTTCAGGAATGATGCCACAGAGGTC
 ATCCCAGGGCTTGGAGAGTACCCCGAGCCTCCTCCTGAGAACAACCAGACCATG
 AACCGGGCGGAGAATGGAGGCAGACCTCCCCACCATCCCTATGACGCCAAAGAT
 GTGTCCGAGTACAGCTGCCGCGAGCTGCACTACACCCGCTTCCTGACAGACGGCC
 CATGCCGCAGCGCCAAGCCGGTCACCGAGTTGGTGTGCTCCGGCCAGTGCGGCCC
 CGCGCGGCTGCTGCCCAACGCCATCGGGCGCGTGAAGTGGTGGCGCCCCGAACGG
 ACCGGATTTCCGCTGCATCCCGGATCGCTACCGCGCGCAGCGGGTGCAGCTGCTG
 TGCCCCGGGGGCGCGGGCGCCGCGCTCGCGCAAGGTGCGTCTGGTGGCCTCGTGCA
 AGTGCAAGCGCCTCACCCGCTTCCACAACCAGTCGGAGCTCAAGGACTTCGGGCC
 GGAGACCGCGCGGCCGCGAAGGGTCGCAAGCCGCGGCCCGGCGCCCCGGGGAG
 CCAAAGCCAACCAGGCGGAGCTGGAGAACGCCTACTGACTCGAG

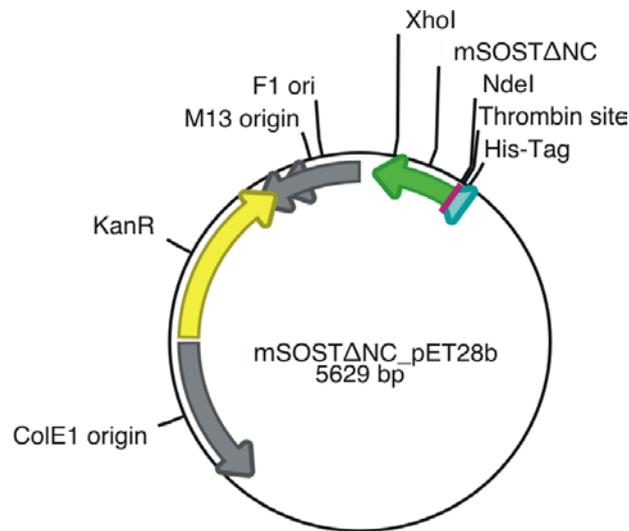
MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMEGQGWQAFRNDATEVIPGLGEYPEPPENNQTMNR
 AENGRPPHHPYDAKDVSEYSRELHYTRFLTDGPCRSAKPVTELVCSGQCGRLL
 PNAIGRVKWWRPNGPDFRCIPDRYRAQRVQLLCPGGAAPRSRKVRLVASCKCKRLT
 RFHNQSELKDFGPETARPQKGRKPRPGARGAKANQAELENAY

8.4.7 mSOST Δ C_pET28b



ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGC
 AGCCATATGAGGGCCAGGGGTGGCAAGCCTTCAGGAATGATGCCACAGAGGTC
 ATCCCAGGGCTTGGAGAGTACCCCGAGCCTCCTCCTGAGAACAACCAGACCATG
 AACCGGGCGGAGAATGGAGGCAGACCTCCCCACCATCCCTATGACGCCAAAGAT
 GTGTCCGAGTACAGCTGCCGCGAGCTGCACTACACCCGCTTCCTGACAGACGGCC
 CATGCCGCAGCGCCAAGCCGGTCACCGAGTTGGTGTGCTCCGGCCAGTGCGGCCC
 CGCGCGGCTGCTGCCAACGCCATCGGGCGCGTGAAGTGGTGGCGCCCGAACGG
 ACCGGATTTCCGCTGCATCCCGGATCGCTACCGCGCGCAGCGGGTGCAGCTGCTG
 TGCCCCGGGGGCGCGGGCGCCGCGCTCGCGCAAGGTGCGTCTGGTGGCCTCGTGCA
 AGTGCAAGCGCTAGTAACTCGAG

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMEGQGWQAFRNDATEVIPGLGEYPEPPPENNTMNR
 AENGRPPHHPYDAKDVSEYSCRELHYTRFLTDGPCRSAKPVTELVCSGQCGRLL
 PNAIGRVKWWRPNGPDFRCIPDRYRAQRVQLLCPGGAAPRSRKVRLVASCKCKR

8.4.8 mSOST Δ NC_pET28b

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGC
 AGCATATGAATGGAGGCAGACCTCCCCACCATCCCTATGACGCCAAAGATGTGT
 CCGAGTACAGCTGCCGCGAGCTGCACTACACCCGCTTCCTGACAGACGGCCCATG
 CCGCAGCGCCAAGCCGGTCACCGAGTTGGTGTGCTCCGGCCAGTGCGGCCCCGCG
 CGGCTGCTGCCCAACGCCATCGGGCGCGTGAAGTGGTGGCGCCCGAACGGACCG
 GATTTCCGCTGCATCCCGGATCGCTACCGCGCGCAGCGGGTGCAGCTGCTGTGCC
 CCGGGGGCGCGGCGCCGCGCTCGCGCAAGGTGCGTCTGGTGGCCTCGTGCAAGT
 GCAAGCGCTAGTAACTCGAG

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMNGGRPPHPYDAKDVSEYSCRELHYTRFLTDGPCR
 SAKPVTELVCSGQCGPARLLPNAIGRVKWWRPNGPDFRCIPDRYRAQRVQLLCPGG
 AAPRSRKVRLVASCKCKR

8.5 NMR-Experimente

Experiment	Referenz	Datenpunkte			Seepwidth (ppm)			Isotopen- markierung	Misch- zeit
		F3	F2	F1	F3	F2	F1		
1D- ¹ H	(Cavanagh, <i>et al.</i> , 1996)	-	-	8192	-	-	16.66	-	
¹⁵ N 2D-HSQC	(Chazin, <i>et al.</i> , 1987)	-	2048	128	-	16.66	49.81	¹⁵ N	
¹⁵ N-NOESY-HSQC	(Cavanagh, <i>et al.</i> , 1996)	1024	100	96	16.66	13.33	49.81	¹⁵ N	80msec
¹⁵ N-TOCSY-HSQC	(Cavanagh, <i>et al.</i> , 1996)	1024	256	128	16.66	13.33	49.81	¹⁵ N	33msec
¹⁵ N-HMQC-NOE-HSQC		1024	160	128	16.68	29.63	29.63	¹⁵ N	
NOESY	(Macura, <i>et al.</i> , 1980)	-	8192	1024	-	16.68	13.89	-	80msec
TOCSY	(Griesinger, <i>et al.</i> , 1988)	-	4096	1024	-	16.68	13.89	-	33msec
¹³ C-NOESY-HSQC	(Cavanagh, <i>et al.</i> , 1996)	1024	96	96	16.993	13.89	69.03	¹⁵ N, ¹³ C	80msec
CBCA(CO)NH	(Guntert, <i>et al.</i> , 1989)	1024	96	96	16.66	66.27	49.53	¹⁵ N, ¹³ C	
CBCA(N)NH	(Gonzalez, <i>et al.</i> , 1991)	1024	96	96	16.66	66.27	49.53	¹⁵ N, ¹³ C	
HNCO	(Ikura, <i>et al.</i> , 1990)	1024	96	96	16.67	4.17	5.02	¹⁵ N, ¹³ C	
HN(CA)CO	(Brunger, <i>et al.</i> , 1986)	1024	96	96	16.67	4.17	5.02	¹⁵ N, ¹³ C	
HBHA(CO)NH	(Grzesiek, <i>et al.</i> , 1993)	1024	96	96	16.66	6.67	5.02	¹⁵ N, ¹³ C	
H(C)(CO)NH-TOCSY		1024	96	96	16.66	6.67	5.02	¹⁵ N	
CC(CO)NH-TOCSY		1024	96	96	16.66	66.27	5.02	¹⁵ N, ¹³ C	
HCCH-TOCSY	(Bax, <i>et al.</i> , 1990b)	1024	128	128	16.66	16.66	6.66	¹⁵ N, ¹³ C	20msec
HCCH-COSY	(Bax, <i>et al.</i> , 1990a)	1024	128	128	16.66	16.66	6.66	¹⁵ N, ¹³ C	
¹⁵ N{ ¹ H}Hetero-NOE	(Peng, <i>et al.</i> , 1994)	-	1024	256	-	16.68	29.62	¹⁵ N	

Tabelle 23: NMR-Experimente

8.6 Chemische Verschiebungen von murinem Sclerostin- Δ NC

AS	HN	H α	H β 1	H β 2	H γ 1	H γ 2	H δ 1	H δ 2	H ϵ 1	H ϵ 2	¹⁵ N	Co	C α	C β	C γ	C δ	C ϵ
Gly-4		3.28										170.22	43.06				
Ser-3	8.61	4.4	3.75								115.49	174.21	58.03	63.65			
His-2	8.46	4.67	3.17								120.33	174.23	55.09	28.82			
Met-1	8.41	4.38	2.01	1.9	2.50	2.44					121.87	174.97	55.19	32.44	31.69		
Asn36	8.07	4.42	2.76	2.63							125.16	176.47	54.77	40.61			
Gly37	8.37	3.87									114.14	175.03	45.34				
Gly38	8.38	3.88									108.53	175.07	44.87				
Arg39	8.06	4.53	1.74		1.6		3.08				121.29	173.84	53.57	29.96			
Pro40																	
Pro41		4.31	2.15	1.66	1.91		3.71	3.56				176.55	62.60	31.84			
His42	8.43	4.51	3.06								118.00	174.06	54.95	28.96			
His43	8.45	4.7	3.03								120.91	172.59	52.96				
Pro44		4.3	2.17	1.76	1.87		3.61	3.43				176.5	63.24	31.8	27.31	50.37	
Tyr45	8.11	4.47	2.94								119.55	175.31	57.6	38.13			
Asp46	8.09	4.46	2.6	2.55							122.84	175.68	53.37	41.16			
Ala47	8.11	4.14	1.32*								124.78	177.87	52.71	18.95			
Lys48	8.25	4.18	1.73		1.34		1.58		2.9		118.97	176.44	56.41	32.44	24.43	28.88	41.88
Asp49	8.15	4.56	2.73	2.62							176.35	54.02	40.09				
Val50	7.96	3.94	2.01		0.79**						119.94	176.29	62.27	32.04	γ 1)20.65		
Ser51	8.26	4.28	3.74								118.20	174.66	58.75	63.41			
Glu52	8.16	4.15	1.78		2.11	2.01					121.49	175.62	56.29	29.74	35.33		
Tyr53	7.86	4.63	2.66								119.55	175.00	56.81	39.00			
Ser54	8.44	4.55	3.73								115.27	173.7	57.81	64.96			
Cys55	8.43	4.56	2.69	2.560							120.52		54.16	43.13			
Arg56	7.97		1.5	1.12	0.77		3.36	3.29			119.94						
Glu57		4.65	1.67		2.12							175.16	55.42	29.68	35.62		
Leu58	8.43	4.52	1.62	1.39	1.41		0.79**				126.13	175.4	53.69	43.83	27.22	δ 1)23.2	
His59	8.51	5.25	2.96	2.83							118.39	173.74	54.39	30.8			
Tyr60	8.9	4.95	2.81								122.26	174.08	56.01	40.63			
Thr61	8.62	5.1	3.73		0.88*						121.87	173.50	61.03	70.00	21.86		
Arg62	8.56	4.68	1.76				2.95	2.68			122.45	174.8	54.24	32.54	25.37		
Phe63	8.85	4.48	2.75								120.33	175.8	59.74	38.99			
Leu64	8.07	4.65	1.54	1.43	1.63		0.87*	0.76*			122.45	176.22	53.44	43.36	27.46	δ 1)26.09 δ 2)23.2	
Thr65	8.4	5.02	4.18			1.07*					112.59	173.91	59.76	71.65	21.45		
Asp66	7.74	4.56	2.38	2.29							120.52	175.96	53.69	42.96			
Gly67	9.02	3.54	4.17								118.59	173.58	44.79				
Pro68		4.6	2.15	1.75	1.95		3.73	3.58				176.11	36.15	32.17	35.36		
Cys69	7.85	5.12	3.49	2.39							119.36	173.22	56.74	48.42			
Arg70	8.75	5.31	1.62		1.73	1.48	2.8	2.73			122.26	175.81	54.46	34.49			
Ser71	9.27	4.72	3.79								122.07	173.39	59.16	63.79			
Ala72	8.83	4.13	1.49*								124.00	177.82	54.49	18.97			
Lys73	7.94	4.69	1.77		1.4		1.6				114.14	174.1	52.33	33.89			
Pro74		4.68	1.86	1.53			3.14	3.02				175.81	61.93	31.39			
Val75	8.58	4.35	1.91		0.87*	0.77*					117.23	174.9	59.85	33.79	γ 1)21.55 γ 2)19.77		
Thr76	8.38	4.84	3.74		0.95*						120.13	172.65	61.54	69.5	21.07		
Glu77	8.71	4.67	1.96		2.24						125.74	174.25	54.07	32.64	35.27		
Leu78	7.82	4.81	1.17		1.3		0.52	0.43			123.04	175.9	53.67	43.43	27.95	δ 1)23.35	
Val79	8.29	4.00	1.71		0.75**						121.10	175.14	60.99	33.93	20.83		
Cys80	8.9	4.9	2.61	2.4							126.91	173.37	51.91	37.55			
Ser81	8.47	4.66	3.53								118.20	173.28	56.77	65.01			
Gly82	8.44	α 1)4.45 α 2)3.76									111.43	173.08	44.23				
Gln83	8.38	4.41	2.01	1.87	2.46						117.42	176.76	55.14	32.88	31.55		
Cys84																	
Gly85																	
Pro86		4.18	1.99	1.72			3.21	3.11				176.65	62.6	31.77	27.09	49.13	
Ala87	8.27	4.08	1.19*								124.58	177.67	52.38	19.03			
Arg88	8.12	4.21	1.66		1.45		3.04				118.39	175.53	55.39	30.6		43.14	
Leu89	8.03	4.28	1.45		1.45		0.73**				122.45	176.68	54.46	42.12	26.86	δ 1)24.73 δ 2)23.34	
Leu90	8.09	4.47	1.51				0.78**				124.2	175.42	52.82	41.63			
Pro91		4.25	2.12	1.8	1.8		3.7	3.54				176.82	63.32	31.66	27.32	50.19	

Anhang

AS	HN	H α	H β 1	H β 2	H γ 1	H γ 2	H δ 1	H δ 2	H ϵ 1	H ϵ 2	¹⁵ N	Co	C α	C β	C γ	C δ	C ϵ
Asn92	8.26	4.52	2.73								116.65	174.92	53.12	38.15			
Ala93	7.96	4.22	1.29*								123.04	177.69	52.44	19.16			
Ile94	7.9	4.03	1.78	γ 1)1.38 γ 2)1.11 γ 2*)0.81				δ 1*) 0.77		118.78	176.86	61.46	38.05	γ 1)27.37 γ 2)17.28 δ 1)13.04			
Gly95	8.32	α 1)3.9 α 2)3.81									111.81	174.06	45.03				
Arg96	7.99	4.24	1.7		1.47		3.01				120.13	176.36	55.92	30.56	43.15		
Val97	7.93	3.97	1.84		γ 1*)0.75 γ 2*)0.71						119.94	176.12	61.97	32.34	γ 1/2)0.77		
Lys98	8.22	4.06	1.49		1.16		1.52		2.81		123.81	175.94	56.37	32.38	24.44	29.05	41.92
Trp99	7.69	4.62	3.16								120.13	175.37	56.5	29.45			
Trp100	7.75	4.42	2.93								122.84	174.89	57.34	29.38			
Arg101	7.6	4.24	1.54		1.38		3.01				124.00	173.2	52.96	30.44			
Pro102	4.06	2.11	1.78			1.8		3.38 3.25				176.52	62.96	31.71	27	50.04	
Asn103	8.35	4.6	2.69								117.81	175.08	52.97	38.58			
Gly104	7.94	3.93									108.72	171.39	44.43				
Pro105	4.27	1.79		1.83		3.47						175.8	62.34	31.53	26.62	49.4	
Asp106	7.91	4.11	2.59								123.76	179.45	54.4	40.21			
Phe107	7.93	5.09	3.35	3.33									174.19	62.63	33.96		
Arg108	8.61	4.4	2.04		2.03		2.83 3.37				122.25	175.83	57.98	38.03			
Cys109	8.47	4.47	2.95								121.03	175.74	60.91	41.06			
Ile110	8.28	4.39	1.7	1.17 0.72*		0.42*						175.96	63.47	32.67	51.06		
Pro111	4.67	1.82		1.7		3.76						174.3	53.46	42.16			
Asp112	8.7	4.72	2.51	2.11							121.87	174.3	53.46	42.16			
Arg113	7.19	4.47	1.66		1.5		3.12				116.07	174.9	54.97	32.38	27.84	43.09	
Tyr114	8.75	5.1	2.66								120.33	175.29	56.88	42.11			
Arg115	9.6	4.76	1.8	1.6	1.42		3.18 3.05				119.94	173.45	53.82	28.65	26.96	42.99	
Ala116	8.65	5.30	1.23*								125.16	177.20	50.27	20.52			
Gln117	8.76	4.53	1.77		2.13						121.68	173.93	54.41	32.97			
Arg118	8.84	4.78	1.67		1.45		3.08				126.52	175.79	55.68	30.31	28.05	43.03	
Val119	9.07	4.36	1.89		0.82**						125.74	174.14	60.3	34.63	γ 1/2)21.14		
Gln120	8.62	4.67	1.92		2.26 2.07						124.78	175.12	54.84	30.17	34.17		
Leu121	9.19	4.36	1.57	0.97	1.366		0.63* 0.47*				126.13	174.54	55.42	32.78	27.79	δ 1)26.2 δ 2)24.59	
Leu122	8.51	4.54	1.81	1.49	1.62		0.94* 0.82*				122.65	177.52	53.69	41.32	27.15	δ 1)25.06 δ 2)22.46	
Cys123	9.22	5.05	3.03	2.43							124.2	171.98	52.05	43.7			
Pro124	4.59	1.94	2.28	1.94		3.69 3.52						178.06	62.88	32.23	27.08	50.5	
Gly125	8.74	α 1)3.9 α 2)3.78									107.75	175.46	46.28				
Gly126	8.57	α 1)3.99 α 2)3.67									108.72	174.12	44.83				
Ala127	7.09	4.18	1.28*								122.84	176.66	51.57	19.31			
Ala128	8.26	4.36	1.31*								124.58	174.91	52.33	18.25			
Pro129	4.68	2.17	1.76	1.93		3.7 3.57						174.23	62.96	32.41	27.15	49.95	
Arg130	8.61	4.67	1.86	1.52	1.69		3.14 3.02				119.74	175.79	54.34	33.11	27.2	43.79	
Ser131	8.62	5.17	3.61	3.65							116.84	174.12	57.23	64.62			
Arg132	8.67	4.61	1.56		1.4		3.09				123.62	173.99	53.9	33.87	43.04		
Lys133	8.68	4.82	1.6		1.26 1.09		1.55		2.8		124.58	175.81	55.45	32.85	25.03	29.32	41.64
Val134	8.85	4.5	1.98		0.8**						122.65	173.88	59.72	34.4	γ 1)21.2 γ 2)19.77		
Arg135	8.48	4.81	1.58		1.32		2.83				124.78	175.20	55.2	31.04	27.65	43.27	
Leu136	9.06	4.84	1.54		1.43		0.76**				126.9	176.31	52.92	44.24	26.36	δ 1/2)23.02	
Val137	9.3	4.84	2.14		γ 1*)0.96 γ 2*) 0.66						124.78	176.05	65.33	31.16	γ 1/2)22.72		
Ala138	9.25	4.47	1.06*								129.03	176.4	51.39	20.7			
Ser139	7.72	4.37	3.88								112.01	172.30	57.46	64.75			
Cys140	8.96	5.42	2.84	2.5							118.78	174.08	53.09	42.56			
Lys141	9.43	4.54	1.68		1.44		1.59		2.94		120.71	173.39	54.87	36.64			
Cys142	8.4	5.12	2.84	2.95							118.97	174.32	54.06	42.71			
Lys143	9.28	4.48	1.84	1.57	1.38		1.58		2.94		126.91	174.27	55.29	35.49	24.16	29.29	42.01
Arg144	8.08	4.06	1.31		1.14		2.76				129.42	181.11	57.59	30.9	26.6	43.19	

Tabelle 24: Chemische Verschiebungen von murinem Sclerostin- Δ NC. Methylgruppenprotonen sind durch ein * gekennzeichnet.

AS	Hδ2	Hε1	Hδ*	Hε*	Hζ	Hδ1	Hε1	Hζ2	HH2	Hζ3	HE3
His42	7.16	8.44									
His43	7.2	8.47									
Tyr45			7.03	6.71							
Tyr53			6.8	6.61							
His59	8.49	6.93									
Tyr60			6.99	6.65							
Phe63			7.28	7.1	7.37						
Trp99						7.16	10.14	7.4	7.13	7.05	7.47
Trp100						7.02	10.04	7.36	7.1	6.96	7.24
Phe109			7.1	7.27							
Tyr114			6.82	6.63							

Tabelle 25: Chemische Verschiebungen der Aromatenprotonen von murinem Sclerostin-ΔNC

8.7 Einträge von Strukturen in die RCSB-Datenbank

Die Atomkoordinaten und die Liste der NOE-Distanzeinschränkungen für die NMR-Struktur von murinem Sclerostin-ΔNC wurden unter dem Zugangscode **2KD3** in der Proteindatenbank (Protein Data Bank, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, Rutgers University, New Brunswick, NJ; <http://www.rcsb.org>) hinterlegt.

8.8 Publikationen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Weidauer, S.E., Schmieder, P., Beerbaum, M., Schmitz, W., Oschkinat, H., Mueller, T.D., *NMR structure of the Wnt modulator protein Sclerostin*. *BBRC* **380** (2009) 160-165.

Zhang, J.L., Qiu, L.Y., Kotzsch, A., **Weidauer, S.E.**, Patterson, L., Hammerschmidt, M., Sebald, W., Mueller, T.D. *Crystal structure analysis reveals how the Cordin family member crossveinless 2 blocks BMP-2 receptor binding*. *Dev Cell* **14** (2008) 739-50.

8.9 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ActR-I	Activin-Rezeptor-I
ALP	Alkalische Phosphatase
Amp	Ampicillin
APC	“Adenomatous polyposis coli”
BMD	“Bone mineral density” Knochendichte
BMP	“Bone morphogenetic protein”
BMPR-I	“Bone morphogenetic protein receptor I”
BSP	“Bone sialoprotein”
CAM	Chloramphenicol
DAN	“Differential screening-selected gene aberrant in neuroblastoma”
cDNA	kodierende DNA
Col1	Kollagen 1
COSY	Correlation Spektroskopie
CRD	Cystein-reiche Domäne
Da	Dalton
dH ₂ O	destilliertes Wasser
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
Dkk	Dickkopf-Proteine
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	“Epidermal growth factor”
FCS	fötale Kälberserum
FID	“Free Induction Decay”
GSH	Glutathion reduziert
GSK-3	Glycogen Synthase Kinase 3
GSSG	Glutathion oxidiert
hCG	humanes Choriongonadotropin
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure

HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
HSQC	„Heteronuclear single quantum coherence“
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
LB	Luria Broth
LEF	“Lymphoid enhancer factor”
LRP5/6	“Low density lipoprotein receptor related protein 5/6”
M-CSF	„Macrophage colony stimulating factor“
MOI	“Multiplicity of infection”
MOPS	3-N-(Morpholino)-Propansulfonsäure
MTT	3-(4,5-Dimethyldiazol-2yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid-tetrazolium
M_w	Molekulargewicht
MyoD	„Myogenic differentiation factor“
NMR	Kernspinresonanz-Spektroskopie
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600nm
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid
OPG	Osteoprotegerin
OPN	Osteopontin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pfu	„Plaque forming Units“
PTH	Parathyroid Hormon
PU-1	Transkriptionsfaktor
PPAR γ	„Peroxisome proliferator-activated receptor γ “
RANK	receptor activator of nuclear factor κ B
RANKL	receptor activator of nuclear factor κ B ligand
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RU	„resonance units“
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>Sf9</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i> (Klon9)

Anhang

sFRP	“Secreted frizzled- related protein”
Smad	“Small mother of decapentaplegic”
SOX	“(Sex determining region Y)-box”
TB	Terrific Broth
TβR-I	„transforming growth factor-β receptor I“
TCF	“T-cell factor”
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TGF-β	“transforming growth factor-β”
TNF	tumor necrosis factor
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
Tris	Tris(-hydroxymethyl)-aminomethan
Tsg	“Twisted gastrulation”
USAG-1	“Uterine sensitization-associated gene”
VA	Virusamplifikation
VWC	Von Willebrand Typ C-Domäne
Wif	„Wnt inhibitory factor“
Wnt	„Wingless“ und „Int-1“
wt	wildtypisch
YWTD	Tyrosin, Tryptophan, Threonin und Asparaginsäure

Die Ein- und Dreibuchstabenabkürzungen der Aminosäuren entsprechen den Empfehlungen der IUPAC-IUB Kommission für biochemische Nomenklatur.

8.10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Differenzierungsprozesse zu verschiedenen Knochenzellen	7
Abbildung 2:	Die Differenzierung zu Osteoklasten und deren Funktionsprinzip	10
Abbildung 3:	Knochenarchitektur eines Rückenwirbels mit und ohne Osteoporose	12
Abbildung 4:	Osteoanabole Wirkung von PTH	14
Abbildung 5:	Knochenphänotyp von Patienten mit Sclerosteose und Van Buchem Krankheit	16
Abbildung 6:	Aminosäuresequenzvergleich einiger Vertreter der DAN-Familie	19
Abbildung 7:	Einfluss von Sclerostin auf die verschiedenen Stadien der Osteoblasten-differenzierung	21
Abbildung 8:	Zusammenspiel des BMP- und des Wnt- β -Catenin-Signalwegs zur Bildung von alkalischer Phosphatase (ALP) in Osteoblasten	22
Abbildung 9:	Der kanonische Wnt- β -Catenin-Signalweg	24
Abbildung 10:	Erhöhte Knochendichte in <i>SOST</i> (-/-) Mäusen	26
Abbildung 11:	Domänenstruktur von LRP5/6	29
Abbildung 12:	Western-Blot von murinem und humanem Sclerostin aus <i>Sf9</i> -Zellkultur	77
Abbildung 13:	Metallchelat-Affinitätschromatographie Sclerostins aus <i>Sf9</i> -Zellkultur	78
Abbildung 14:	Kationenaustauschchromatographie Sclerostins aus <i>Sf9</i> -Zellkultur	79
Abbildung 15:	PAS-Färbung von Sclerostin	81
Abbildung 16:	Disulfidverbrückungsmuster von Sclerostin	85
Abbildung 17:	Analyse der Domänenstruktur mittels Proteolyse	87
Abbildung 18:	Aufreinigung von murinem Sclerostin- Δ C aus <i>Sf9</i> -Zellkultur	89
Abbildung 19:	Herstellung von murinem Sclerostin- Δ NC durch präparativen Proteolyse mit GluC	90
Abbildung 20:	Schematische Darstellung der verschiedenen Sclerostinvarianten	91
Abbildung 21:	Wnt-Reportergen-Nachweisverfahren mit Sclerostin und Dickkopf-1	93
Abbildung 22:	BMP-Reportergen-Nachweisverfahren mit Sclerostin und CV2-VWC1	95
Abbildung 23:	SPR-Analyse der Interaktion von Sclerostin mit seinen putativen Interaktionspartnern BMP und LRP	99
Abbildung 24:	Vektorkarten der Sclerostinkonstrukte für die <i>E.coli</i> -Expression	102
Abbildung 25:	Expressionskontrolle (SDS-PAGE) von Sclerostin und Varianten in <i>E.coli</i>	102
Abbildung 26:	SDS-PAGE-Analyse der Metallchelat-Affinitätschromatographie von Sclerostin und Varianten aus <i>E.coli</i> -Expression	103
Abbildung 27:	Analyse der Kationenaustauschchromatographie von Sclerostin und Trunktionsvarianten aus <i>E.coli</i> -Expression	104
Abbildung 28:	RP-HPLC von Sclerostin und Varianten aus <i>E.coli</i> -Expression	105
Abbildung 29:	Entfernung der Hexahistidinsequenz von murinem Sclerostin- Δ NC durch enzymatische Proteolyse mit Thrombin	108
Abbildung 30:	$^1\text{H}^{15}\text{N}$ 2D-HSQC Spektren von murinem Sclerostin und murinem Sclerostin- Δ NC	110
Abbildung 31:	Sequenzielle Zuordnung	112
Abbildung 32:	Editiertes $^1\text{H}^{15}\text{N}$ 2D-HSQC-Spektrum von murinem Sclerostin- Δ NC	114

Abbildung 33:	Schematische Darstellung der β -Faltblätter in den Fingern 1 und 2 von murinem Sclerostin- Δ NC	116
Abbildung 34:	Sekundärstrukturanalyse nach Wishart	117
Abbildung 35:	Darstellung der aus NOE-Kreuzsignale ermittelten Abstandsinformationen in der finalen Sclerostinstruktur	119
Abbildung 36:	Ramachandran-Diagramm	121
Abbildung 37:	NMR-Struktur von murinem Sclerostin- Δ NC	123
Abbildung 38:	Vergrößerte Ausschnitte des Cystinknotens, des Bereichs um Pro74 und der β -Schleife von murinem Sclerostin- Δ NC	124
Abbildung 39:	Hydrophober Bereiche zwischen den Fingern 1 und 2 von murinem Sclerostin- Δ NC	125
Abbildung 40:	Hydrophober Bereich zwischen den Fingerspitzen von Fingern 1 und 2 des murinen Sclerostins- Δ NC	126
Abbildung 41:	Überlagerung der 15 Sclerostin-Strukturen im Schleifenbereich „Loop“	126
Abbildung 42:	Ladungsverteilung von murinem Sclerostin- Δ NC.	128
Abbildung 43:	$^{15}\text{N} \{^1\text{H}\}$ Hetero-NOE-Experiment	130
Abbildung 44:	Aminosäuresequenzvergleich von humanem und murinem Sclerostin	132
Abbildung 45:	Wnt-Reportergen-Nachweisverfahren für die Fab-Fragmente AbD09097 und AbD09101 der Firma AbD-Serotec	134
Abbildung 46:	Überlagerung der beiden $^1\text{H}^{15}\text{N}$ 2D-HSQC-Spektren von ^{15}N -markiertem Sclerostin- Δ NC isoliert und im Komplex mit dem Fab-Fragment AbD09097.	136
Abbildung 47:	Bindeepitop des Fab-Fragments AbD09097	137
Abbildung 48:	Überlagerung der Bänderdarstellung (Finger 1 und Finger 2) von humanem und murinem Sclerostin	144
Abbildung 49:	β -Schleife des ersten Fingers von murinem und humanem Sclerostin	146
Abbildung 50:	β -Faltblattelement im ersten Finger von humanem Sclerostin	147
Abbildung 51:	Region um Pro ⁷⁴ im ersten Finger von murinem und humanem Sclerostin	149
Abbildung 52:	Vergleich der Strukturen von Sclerostin und BMP-2 (Monomer)	152
Abbildung 53:	Struktur des BMP-2 Dimers	153
Abbildung 54:	Vergleich der Strukturen von Sclerostin und hCG	154
Abbildung 55:	Aminosäuresequenz des „Loop“-Bereichs von murinem Sclerostin zwischen Cys ⁸⁴ und Cys ¹⁰⁹	155
Abbildung 56:	BMP-Signalweg	158
Abbildung 57:	Strukturen von BMP-Antagonisten	159
Abbildung 58:	BMP/BMP-Antagonisten-Komplexstrukturen	163
Abbildung 59:	Sequenzvergleich einiger Vertreter der DAN-Familie	168
Abbildung 60:	Schematische Darstellung der Domänenstruktur von LRP5/6	172
Abbildung 61:	Beispiele für die Interaktion eines Proteins mit einer typischen β -Propeller-Domäne	173
Abbildung 62:	An der Dkk-Bindung beteiligte Aminosäuren der dritten YWTD-Typ- β -Propeller-Domäne von LRP5	174

Abbildung 63:	Interaktionsmodell der Bindung der CRD2 von Dkk-2 an die dritte YWTD-Typ- β -Propeller-Domäne von LRP5	176
Abbildung 64:	CRD2 von Dkk-2 mit an der Bindung von LRP5 und Kremen beteiligten Aminosäureresten	177
Abbildung 65:	Elektrostatistisches Potential von murinem Sclerostin dargestellt auf der Van-der-Waals-Oberfläche	180

8.11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Vektoren	35
Tabelle 2:	Kulturmedien	36
Tabelle 3:	Bakterienstämme	37
Tabelle 4:	PCR-Reaktion	38
Tabelle 5:	Restriktionsreaktion	39
Tabelle 6:	Ligationsreaktion	40
Tabelle 7:	Sclerostin-Expressionskonstrukte	42
Tabelle 8:	Pipettierschema für zwei Sammelgele und zwei Trenngele für die SDS-PAGE	50
Tabelle 9:	Molekulargewichte, Extinktionskoeffizienten und isoelektrische Punkte der Sclerostinvarianten	54
Tabelle 10:	RP-HPLC, dreistufiger Gradient zur Elution der Sclerostinvarianten	60
Tabelle 11:	Charakteristische NOE-Kreuzsignale in den Sekundärstrukturelementen β -Faltblatt und α -Helix.	71
Tabelle 12:	Ausbeuten von murinem und humanem Sclerostin aus <i>Sf9</i> -Insektenzellkultur	76
Tabelle 13:	Ausbeute von murinem und humanem Sclerostin aus <i>Sf9</i> - Insektenzellkultur II	78
Tabelle 14:	Auswertung der Proteolyse von murinem Sclerostin mit Trypsin mit vorheriger Deglykosylierung.	82
Tabelle 15:	Liste einiger massenspektrometrisch detektierter Peptide der Proteolyse von murinem Sclerostin- Δ C mit GluC und Trypsin	84
Tabelle 16:	Gewinnung von rekombinantem murinen Sclerostin, humanem Sclerostin und murinem Sclerostin- Δ C aus <i>Sf9</i> -Zellkulturüberstand	89
Tabelle 17:	Kinetikparameter (k_a , k_d , $K_{D(kin)}$, $K_{D(eq)}$) der Bindung von Sclerostin und Trunkationsvarianten an LRP6, BMP7	98
Tabelle 18:	Aufreinigung von Sclerostin und dessen Trunkationsvarianten aus <i>E.coli</i> -Expression	106
Tabelle 19:	Experimentelle Daten für die Strukturberechnung	119
Tabelle 20:	Statistische Daten der Strukturanalyse	122
Tabelle 21:	Kinetikparameter (k_a , k_d , $K_{D(kin)}$, $K_{D(eq)}$) der Bindung einzelner Fab-Fragmente an die verschiedenen Sclerostinvarianten.	133
Tabelle 22:	Torsionswinkel einiger Aminosäuren des ersten Fingers von murinem und humanem Sclerostin	150
Tabelle 23:	NMR-Experimente	208
Tabelle 24:	Chemische Verschiebungen von murinem Sclerostin- Δ NC	209
Tabelle 25:	Chemische Verschiebungen der Aromatenprotonen von murinem Sclerostin- Δ NC	211

9 Danksagung

Im besonderen Maße möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Müller für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit bedanken. Seine Diskussionsbereitschaft, die immer paraten Lösungsvorschläge für auftretende Probleme und den Glauben an mich und das Projekt, auch in nicht so aussichtsreichen Zeiten, haben mich stets motiviert und waren mir immer Ansporn diese Arbeit zu einem gelungenen Abschluss zu bringen.

Prof. Dr. Walter Sebald danke ich für die Überlassung des Forschungsthemas.

Prof. Dr. Utz Fischer danke ich für die Vertretung dieser Arbeit vor der Fakultät für Chemie.

Prof. Dr. Peter ten Dijke möchte ich für die gute Zusammenarbeit, die Bereitstellung diverser Materialien und den Kurzaufenthalt in seinem Labor in Leiden danken. Carola Krause danke ich für die gemeinsame Zeit und Arbeit in Leiden, die anregenden Diskussionen und die seelische Unterstützung. Es heißt ja nicht umsonst: „Geteiltes Leid ist halbes Leid!“ Dr. David de Gorter, Dr. Christian Frisch und Dr. Jaap Willem Back sowie allen Mitgliedern des Talos Projekts danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Ein besonderes Dankeschön geht an Dr. Joachim Nickel für seine Hilfe und Diskussionsbereitschaft bei diversen SPR-Messungen und für die Durchsicht der Arbeit.

Tina Hellman danke ich für ihre Freundschaft und Unterstützung im Laboralltag und im Besonderen bei einigen SPR-Messungen. Meinen Kollegen Maike Gottermeier, Edwin Patino, Michael Kraich, Stefan Saremba, Alexander Kotzsch, Julia Frank, Tina Hellmann, Juliane Fiebig, Markus Bauer, Markos Pechlivanis, Mathias Kottmair, Jens Lautenschläger, Simone Zapf, Alice Schaaf, Ramona Derr, Eva Muth, Eva Wirth sowie allen Mitarbeitern der Physiologischen Chemie II und der Botanik I danke ich für die gute Zusammenarbeit, das gute Arbeitsklima und für eine schöne Zeit!

Meinen Eltern und meinen Schwiegereltern danke ich für die Unterstützung in allen Lebenslagen und den mir sehr wichtigen Rückhalt in der Familie. Meinem Mann Toni Weidauer gilt besonderer Dank für den Glauben an mich, die Motivation und Unterstützung und dafür, dass er mir immer eine Hilfe war, das Wesentliche im Leben nicht zu vergessen.