

**Aus dem Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften (Biozentrum)
der Universität Würzburg
Lehrstuhl für Physiologische Chemie II
Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. W. Sebald**

**Klonierung, Expression und Charakterisierung von
Mutanten des Bone Morphogenetic Protein-2**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Friederike Vogel
aus Ulm**

Würzburg, Dezember 2002

Inhaltsverzeichnis

<u>1</u>	<u>EINLEITUNG</u>	1
<u>1.1</u>	<u>Die osteoinduktive Aktivität der BMPs</u>	10
<u>1.2</u>	<u>Aufbau und Entstehung von Knochengewebe</u>	12
<u>1.3</u>	<u>BMPs sind an der Entstehung und Ausbildung zahlreicher Organe beteiligt</u>	17
<u>1.4</u>	<u>Die eng verwandten Proteine BMP-2/4 und Dpp spielen ähnliche Rollen in Fliege, Frosch und Wirbeltieren</u>	20
<u>1.5</u>	<u>Die Rolle der BMPs in der Gliedmaßenentwicklung</u>	26
<u>1.6</u>	<u>Die Extrazelluläre Matrix – Aufbau und mögliche Funktionen</u>	28
<u>1.7</u>	<u>Ziel der Arbeit</u>	34
<u>2</u>	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	36
<u>2.1</u>	<u>Abkürzungen</u>	36
<u>2.2</u>	<u>Chemikalien und Enzyme</u>	39
<u>2.3</u>	<u>Lösungen, Medien und Puffer</u>	39
<u>2.4</u>	<u>Bakterienstämme</u>	40
<u>2.5</u>	<u>Oligonukleotide</u>	41
<u>2.6</u>	<u>Vektoren</u>	42

<u>2.7</u>	<u>Mikrobiologische Methoden</u>	45
<u>2.7.1</u>	<u>Nährmedien</u>	45
<u>2.7.2</u>	<u>Sterilisieren</u>	45
<u>2.7.3</u>	<u>Kulturbedingungen</u>	46
<u>2.7.4</u>	<u>Konservieren von Bakterienkulturen</u>	46
<u>2.7.4.1</u>	<u>Kurzzeitige Konservierung</u>	46
<u>2.7.4.2</u>	<u>Langfristige Konservierung</u>	46
<u>2.7.5</u>	<u>Herstellung kompetenter Zellen</u>	47
<u>2.7.5.1</u>	<u>Herstellung elektrisch kompetenter Zellen</u>	47
<u>2.7.5.2</u>	<u>Herstellung chemisch kompetenter Zellen</u>	47
<u>2.7.6</u>	<u>Transformation kompetenter Zellen</u>	48
<u>2.7.6.1</u>	<u>Transformation elektrisch kompetenter Zellen</u>	48
<u>2.7.6.2</u>	<u>Transformation chemisch kompetenter Zellen</u>	49
<u>2.8</u>	<u>Molekularbiologische Methoden</u>	49
<u>2.8.1.1</u>	<u>Absorptionsmessung von Nukleinsäuren</u>	49
<u>2.8.1.2</u>	<u>Absorptionsmessung von Proteinlösungen</u>	50
<u>2.8.2</u>	<u>Enzymatische Behandlung von DNA</u>	50
<u>2.8.2.1</u>	<u>Einzelstrangphosphorylierung der Oligonukleotide</u>	50
<u>2.8.2.2</u>	<u>Der enzymatische Verdau des Vektors</u>	51
<u>2.8.2.3</u>	<u>Ligation von Vektor und Oligonukleotid</u>	51
<u>2.8.3</u>	<u>Elektrophoretische Auftrennung von DNA</u>	52
<u>2.8.3.1</u>	<u>Analytisches Gel</u>	52
<u>2.8.3.2</u>	<u>Präparatives LMP-Agarose-Gel</u>	53
<u>2.8.4</u>	<u>Analytische Plasmidpräparation – die Miniprep</u>	54
<u>2.8.5</u>	<u>Präparative Plasmidpräparation – die Maxiprep</u>	56
<u>2.8.6</u>	<u>DNA-Sequenzierung</u>	57

<u>2.9</u>	<u>Expression von rekombinanten Proteinen in E.coli</u>	57
2.9.1	<u>Analytische Proteinexpression</u>	57
2.9.2	<u>Präparative Proteinexpression</u>	58
2.9.3	<u>Präparation der „inclusion bodies“</u>	58
2.9.4	<u>Chromatographische Reinigung von Proteinen</u>	60
2.9.4.1	<u>Sephacryl-S300 Gelfiltrationschromatographie</u>	60
2.9.4.2	<u>CM-Sepharose-Chromatographie</u>	61
2.9.4.3	<u>Fractogel EMD Chromatographie – die FPLC-Säule</u>	62
2.9.5	<u>Renaturierung der Proteine</u>	63
2.9.6	<u>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</u>	64
<u>2.10</u>	<u>Zellkultur</u>	66
2.10.1	<u>Sterilisieren</u>	66
2.10.2	<u>Kultivierung der adhärenent wachsenden C2C12-Zellen</u>	66
2.10.2.1	<u>Auftauen von Zellen</u>	66
2.10.2.2	<u>Kulturbedingungen der C2C12-Zellen</u>	66
2.10.3	<u>Der Limb Bud Test</u>	70
2.10.3.1	<u>Präparation von embryonalen Zellen der Hühnergliedmaßenknospen</u>	70
2.10.3.2	<u>Messung der Proteoglycansynthese von embryonalen Zellen der Hühnergliedmaßenknospe</u>	71
2.10.4	<u>Messung der physikalischen Bindungseigenschaften am Biosensor..</u>	72
<u>3</u>	<u>RESULTATE</u>	73
3.1	<u>Kurzbeschreibung des Projektes und Klonierungsstrategie</u>	73

<u>3.2</u>	<u>Klonierung der BMP-2-Mutanten durch Kassettenmutagenese</u>	75
3.2.1	<u>Klonierung in den Expressionsvektor RBSIIP N25/ BMP-2</u>	76
3.2.1.1	<u>Die Primer</u>	76
3.2.1.2	<u>Der Vektor</u>	77
3.2.1.3	<u>Die Klonierung im Vektor RBSIIP N25/BMP2</u>	78
3.2.2	<u>Klonierung in den pET3d-Expressionsvektor</u>	81
<u>3.3</u>	<u>Expression der BMP-2-Mutanten</u>	82
3.3.1	<u>Das Expressionssystem RBSIIP N25/ BMP-2</u>	82
3.3.2	<u>Das Expressionssystem pET3d/ BMP-2</u>	83
3.3.3	<u>Die analytische Proteinexpression</u>	83
3.3.4	<u>Die präparative Proteinexpression</u>	85
<u>3.4</u>	<u>Die Proteinaufreinigung</u>	86
3.4.1	<u>Inclusion bodies</u>	86
3.4.2	<u>Renaturierung der BMP-2-Mutanten</u>	88
3.4.3	<u>Reinigung durch Kationenaustauschchromatographie</u>	88
3.4.4	<u>Starke Kationenaustauschchromatographie (FPLC-Säule)</u>	89
<u>3.5</u>	<u>Berechnung des Absorptionskoeffizienten von BMP-2</u>	91
<u>3.6</u>	<u>Darstellung der physikalischen und biologischen Aktivität der BMP-2-Mutanten T3 und T4</u>	91
3.6.1	<u>Messung der physikalischen Interaktion der BMP-2-Varianten T3 und T4 mit Heparin und ALK-3</u>	92
3.6.2	<u>Biologische Aktivität der BMP-2-Varianten T3 und T4</u>	95
3.6.2.1	<u>Biologische Aktivität der BMP-2-Varianten in embryonalen Zellen der Hühnergliedmaßenknospe</u>	95
3.6.3	<u>Biologische Aktivität der BMP-2-Varianten in den C2C12-Zellen</u>	97
<u>4</u>	<u>DISKUSSION</u>	100

<u>4.1</u>	<u>Proteinexpression</u>	100
<u>4.2</u>	<u>Renaturierung und Aufreinigung der BMP-2-Varianten T3 und T4</u>	102
<u>4.3</u>	<u>Die biologische Funktion der Bindung des BMP-2 an die extrazelluläre Matrix</u>	103
<u>5</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	112
<u>6</u>	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	114

1 Einleitung

Die Kommunikation zwischen Zellen und Gewebsverbänden in genetischer, biochemischer und zellbiologischer Hinsicht aufzuklären, stellt bis zum heutigen Tag eine der größten Herausforderungen der medizinischen und biochemischen Forschung dar. Nicht nur für die Ausbildung der unterschiedlichsten Gewebstypen aus gemeinsamen Vorläuferzellen, sondern auch für die Entwicklung einer einzelnen Eizelle zum hochdifferenzierten Organismus spielt die Kommunikation zwischen Zellen eine entscheidende Rolle. Besonders bei der Fehlsteuerung von Zellproliferation und -differenzierung im Rahmen von Tumorprozessen kommt der Zell-Zell-Interaktion eine große Bedeutung zu. Gesteuert wird sie durch verschiedene Hormone, Wachstums- und Differenzierungsfaktoren; hierbei handelt es sich meist um sezernierte Moleküle, die durch Bindung an spezifische Rezeptoren ihrer Zielzellen eine Signaltransduktionskaskade auslösen und damit schließlich eine Änderung des Genexpressionsmusters in der Zielzelle herbeiführen.

Die Transforming Growth Factor- β Superfamilie, die nach dem Prototypen der Familie Transforming Growth Factor- β 1 benannt ist, stellt eine große Gruppe eng verwandter sezernierter Moleküle dar, deren Mitglieder aufgrund starker Homologien in der Proteinstruktur, Ähnlichkeiten in Prozessierung und Teilen der Signaltransduktionskaskade der Familie zugeordnet werden (Assoian et al. 1983). Die Vielfalt ihrer biologischen Aktivitäten umfasst so unterschiedliche Prozesse wie Zellwachstum und -differenzierung, Kontrolle der Knorpel- und Knochenbildung, Modulation von Immunantworten und Beteiligung an Entzündungsreaktionen. Auch sind sie maßgeblich an der Morphogenese von Säugern, Fröschen und Fliegen in deren Embryonalentwicklung beteiligt.

Auffallend ist die große Ähnlichkeit in der dreidimensionalen Proteinstruktur der Mitglieder der TGF- β Superfamilie. Der überwiegende Teil dieser Zytokine stellt ein aus zwei identischen Untereinheiten aufgebautes Homodimer dar, seltener

ein Heterodimer aus zwei unterschiedlichen Monomeren. Charakteristisch für diese Proteine ist der sogenannte Cysteinknoten, der durch sechs hochkonservierte Cysteine definiert ist, die im Zentrum des Moleküls sehr nahe zusammenliegen, (McDonald, N. Q., Hendrickson, W. A., 1993). Neben den durch sie gebildeten drei intramolekularen Disulfidbrücken, die für die hohe Stabilität des Proteins verantwortlich sind, ist noch ein siebter Cysteinrest Bestandteil des Cysteinknotens, der eine intermolekulare Disulfidbrücke zwischen den beiden Monomeren des Moleküls und damit einen Teil der Dimerisierungsachse bildet (Daopin, S., Davies, D. R., 1993). Während die genaue Struktur von TGF- β 2 und BMP-7 schon seit einiger Zeit bekannt ist (Daopin, et al., 1992, Griffith et al, 1996), konnte vor kurzem ebenfalls durch Röntgenstrukturanalyse auch die Struktur des BMP-2 aufgeklärt werden.

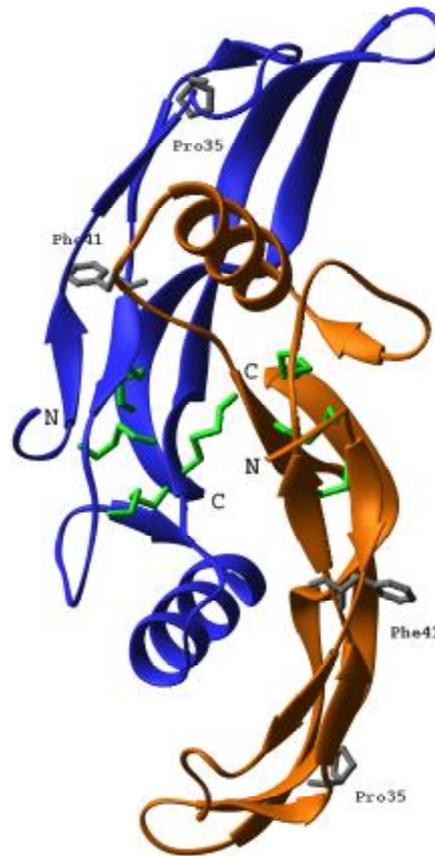


Abbildung 1-1 Die Faltungsstruktur des nativen BMP-2-Dimers

Die beiden Monomere sind orange bzw. blau unterlegt. Alpha-Helices sind als Spirale, β -Faltblattstruktur als Pfeile und die Disulfidbrücken als grüne Striche dargestellt. Nach Ribbons (Carson und Bugg, 1986) entworfen (Scheufler, C. et al., 1999).

Alle Mitglieder der TGF- β Superfamilie werden als Vorläufermolekül mit einem Signalpeptid und einer 50 -450 Aminosäuren langen Prodomäne am aminoterminalen Ende synthetisiert (Roberts, A. B. und Sporn, M. B., 1988).

Einleitung

Der carboxyterminale Bereich dieses Moleküls stellt das reife, biologisch aktive Protein dar; es entsteht durch Abspaltung der Prodomäne durch Furinproteasen an der Erkennungssequenz RXXR vor dem ersten invarianten Cystein (Gentry et al. 1988, Celeste, A. J. et al., 1990). Im Gegensatz zum Bereich des reifen Proteins mit dem Cysteinknoten ist die Prodomäne der Mitglieder der TGF- β Superfamilie nur wenig konserviert und spielt v.a. eine Rolle für die Faltung und Prozessierung des Moleküls.

	HU TGF-β2	HU TGF-β3	HU BMP-5	HU BMP-7	HU BMP-6	HU OP-2	DR 60A	HU BMP-2	HU BMP-4	DR DPP	MU GDF-3	HU GDF-1	HU BMP-3	MU GDF-9	
81	71	40	40	41	38	42	39	38	39	41	44	40	27	TGF-β1	
	82	43	42	44	42	43	42	41	41	38	43	40	28	TGF-β2	
		43	44	45	40	49	43	42	41	37	39	43	29	TGF-β3	
			92	91	71	68	67	66	63	51	50	55	34	BMP-5	
				88	70	64	68	67	63	51	52	54	33	BMP-7	
					72	64	67	67	64	54	50	54	34	BMP-6	
						68	54	55	50	63	56	47	33	OP-2	
							55	54	52	55	51	44	29	60A	
								95	81	55	51	58	35	BMP-2	
									82	55	52	57	35	BMP-4	
										51	48	55	31	DPP	
											59	44	37	GDF-3	
												43	36	GDF-1	
													31	BMP-3	

Tabelle 1-1 Aminosäuresequenzhomologien einiger Mitglieder der TGF β Superfamilie

Dargestellt ist die Homologie der prozessierten Proteine vom ersten konservierten Cystein an im Vergleich der Spezies Mensch (HU), Maus (MU) und Drosophila (DR) (nach Burt und Law, 1994)

Aufgrund der unterschiedlich hohen Sequenzhomologien innerhalb der TGF-β Superfamilie wird diese in drei Unterfamilien eingeteilt (Burt und Law, 1994): die TGF-βs, die Activine und die bone morphogenetic proteins (BMPs).

	Unterfamilie	Mitglieder		Unterfamilie	Mitglieder
1	BMP-2/4	BMP-2 BMP-4 DPP (Drosophila)	5	diverse Mitglieder	BMP-9/GDF-2 BMP-10 BMP-15 Dorsalin-1 (Huhn) Screw (Drosophila) Nodal (Maus) Vg-1 (Xenopus) Univin (Seeigel)
2	BMP-7	BMP-7/OP-1 BMP-8/OP-2 BMP-8b (Maus) BMP-5 BMP-6/Vgr-1 60A (Drosophila)	6	GDFs	GDF-1 GDF-3/Vgr-2 GDF-8 GDF-9 GDF-11/BMP-11 GDF-12 GDF-14
3	GDF-5	GDF-5/BMP-14 GDF-6/BMP-13 GDF-7/BMP-12			
4	BMP-3	BMP-3/Osteogenin GDF-10/BMP-3b			

Tabelle 1-2 Einteilung der Mitglieder der BMP-Unterfamilie

(nach Reddi 1997)

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen über die Speziesgrenzen hinweg zeigt eine auffallend hohe Homologie zwischen BMP-2 und BMP-4 einerseits und BMP-2/4 und decapentaplegic (dpp) in Drosophila andererseits. Da BMP-4 und dpp auch funktionell vollständig austauschbar sind, liegt der Schluss nahe, dass es sich entwicklungs-geschichtlich gesehen um identische Proteine handelt (Burt, D. W. und Law, A. S., 1994 , King et al., 1994).

BMP-2 QAKHKQ RKRL KSSCKRH
BMP-4 SPKHHSQRA RKKN NKNCRRH
DPP DVSGGEGGGKGRNKRHARRPTRRKN HDDTCRRH

Abbildung 1-2 Homologie basischer Aminosäuren (rot unterlegt) in den N-Termini von BMP-2, -4 und DPP

In den letzten Jahren war besonders die Charakterisierung der Rezeptoren von TGF- β und seiner verwandten Faktoren einschließlich der genauen Beschreibung der Komponenten der Signaltransduktionskaskade Ziel intensiver Forschung. Die Rezeptoren beinahe aller bisher bekannten Mitglieder der TGF- β Superfamilie sind Serin/Threonin-Proteinkinasen, die aufgrund ihrer strukturellen und funktionellen Eigenschaften in zwei Unterfamilien eingeteilt werden können: die Typ I Rezeptoren, die bei Vertebraten nochmals in drei verschiedene Typen untergliedert werden und die Typ II Rezeptoren. Nur bei TGF β wurde noch ein dritter Rezeptortyp gefunden, der Typ III Rezeptor Betaglycan. Sie alle sind Transmembranrezeptoren mit einer relativ kurzen, ca. 150 Aminosäuren langen cysteinreichen extrazellulären Domäne und einer großen cytoplasmatischen Kinasedomäne. Charakteristisch für den Typ I Rezeptor ist die sogenannte GS-Box, ein cytoplasmatisch gelegener hochkonservierter Bereich, der direkt auf die Transmembranregion folgt und durch eine bestimmte Abfolge von Glycinen und Serinen gekennzeichnet ist (Kingsley 1994, Attisano et al. 1994, ten Dijke et al. 1994a, Wrana et al. 1994). Durch Phosphorylierung dieser Serine durch den Typ II Rezeptor wird die Kinasedomäne des Typ I Rezeptors aktiviert, wodurch die GS-Box zur Schlüsselregion für die Interaktion mit den Substraten und damit für die Signalweiterleitung wird. Beide Rezeptortypen liegen an der Zelloberfläche bereits als Homo- oder Heterodimere vor (Henis et al. 1994, ten Dijke et al.

Einleitung

1996). Sie lagern sich nach Bindung des Liganden dann zu einem Komplex aneinander. Der Typ III-Rezeptor Betaglycan, ein Transmembran-Proteoglycan mit einer relativ kurzen cytoplasmatischen Domäne, bindet wahrscheinlich den Liganden zunächst mit niedriger Affinität, um ihn dem Typ I und dem Typ II-Rezeptor zu präsentieren.

Erst seit kurzer Zeit sind nähere Informationen über die „downstream“-Komponenten der Signaltransduktionskaskade bekannt. Diese Proteine, die z.T. als Substrate der Rezeptorkinase dienen, gehen auf das Drosophila-Genprodukt Mad als erstes Mitglied dieser Familie zurück und werden daher Smads genannt. Manche von ihnen besitzen die Fähigkeit, Änderungen der Genexpression auszulösen, andere sind nur für die Aufnahme in den Kern verantwortlich, und wieder andere haben inhibitorische Funktionen (Hoodless und Wrana 1997, Massague et al. 1997). TGF β und Activin werden durch sequentielle Bindung zunächst an den Typ II Rezeptor gebunden und anschließend wird der Typ I Rezeptor hinzugezogen, das bedeutet, dass der Typ I Rezeptor den Liganden nur in Verbindung mit dem Typ II Rezeptor erkennt, während die BMPs durch kooperative Bindung zugleich an Typ I und Typ II Rezeptor binden (Massague, J., 1998). BMP-2, -4, -7 und GDF-5 binden an zwei verschiedene Typ I Rezeptoren, den BMPR-IA und den BMPR-IB, die auch als ALK-3 und ALK-6 bezeichnet werden.

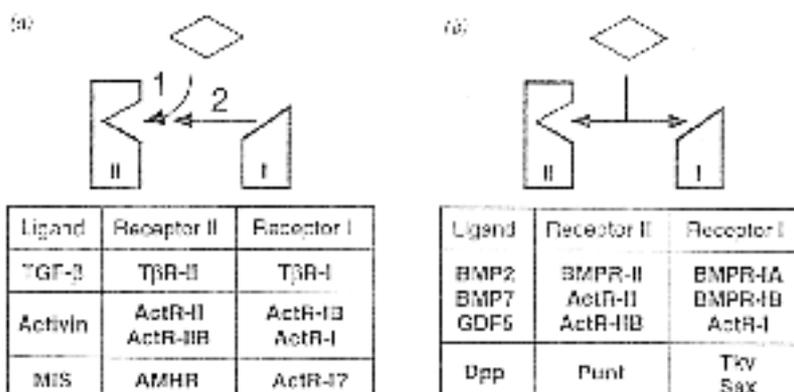


Abbildung 1-3 Das sequentielle Bindungsmodell (a) und das kooperative Bindungsmodell (b) mit seinen Liganden in schematischer Skizzierung (Massague, J., 1998)

Der BMPR-II phosphoryliert nun die BMPR-Ia und -Ib an deren GS-Box. In der weiter „stromabwärts“ gelegenen Signalkaskade werden bei der kooperativen Bindung andere Smads verwendet als bei der sequentiellen Bindung. Weitere Transkriptionsaktivatoren sind Fast-1, TAK-1 und TAB-1 (Heldin et al., 1997, Massague et al., 1997).

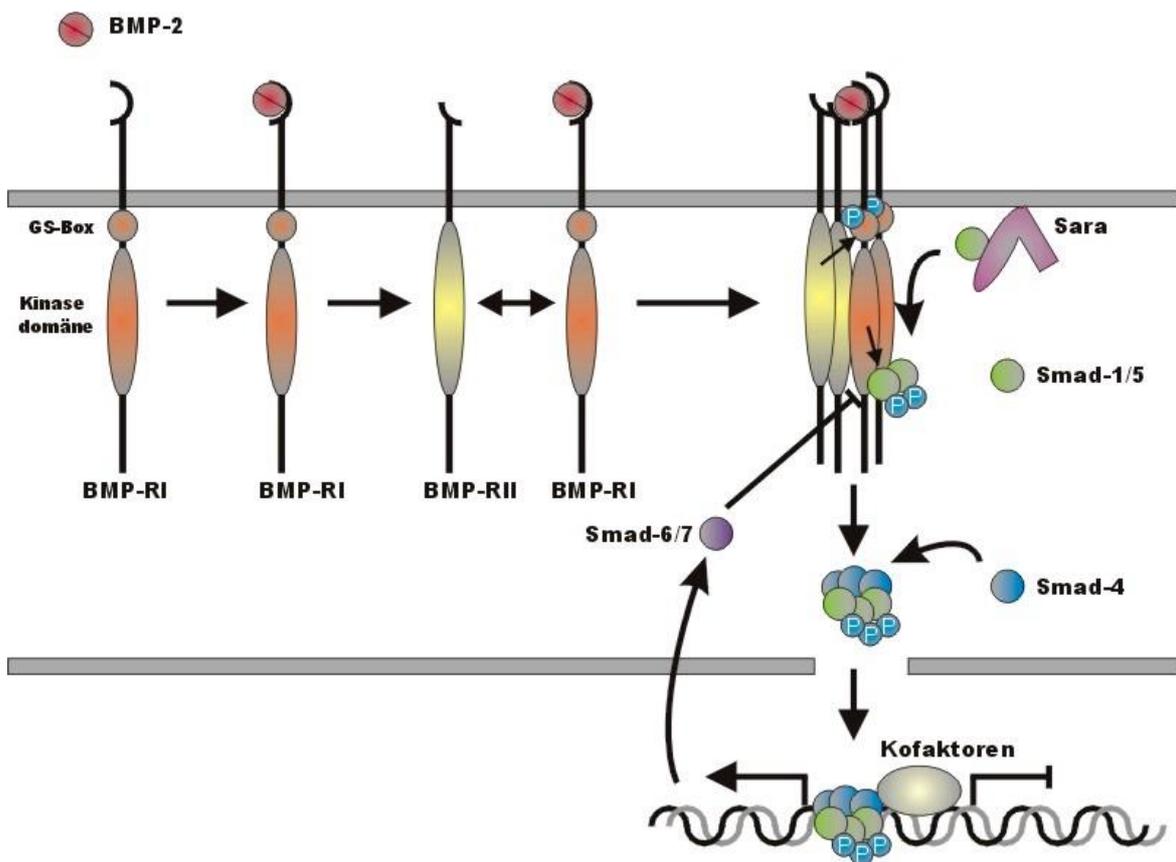


Abbildung 1-4 Schematische Darstellung der Ligandenbindung und Signaltransduktionskaskade im BMP-2 Signalweg

1.1 Die osteoinduktive Aktivität der BMPs

In der Knochenchirurgie werden bereits seit vielen Jahren Knochentransplantate eingesetzt, um besonders schwierige Heilungsverläufe komplizierter Knochenverletzungen zu unterstützen. Schon lange bekannt ist die einzigartige Fähigkeit des Knochens zur Selbstregeneration und –reparatur. Die Faktoren, die für die Bildung von neuem Knochen verantwortlich sind, wurden erstmals 1945 von La Croix als „Osteogenine“ beschrieben (La Croix,

P., 1945). 1965 bestätigte Urist diese Hypothese durch die entscheidende Entdeckung, dass demineralisierte, lyophilisierte Knochenmatrix nach subkutaner Implantation in nicht knochenhaltiges Gewebe der Ratte de novo Knochenbildung hervorruft, ein Prozess, der ähnlich der embryonalen endochondralen Knochenbildung verläuft (Reddi, A. H. und Huggins, C., 1972, Reddi, A. H. und Huggins, C., 1975, Reddi, A. H., 1981). Urist bezeichnete den de novo-knochenbildenden Faktor in der Knochenmatrix als „Bone Morphogenetic Protein“. Später konnte ein Proteingemisch mit osteoinduktiver Aktivität mit Hilfe von denaturierenden Reagenzien aus demineralisierter Matrix isoliert werden (Sampath, T. K. und Reddi, A. H., 1981; Hanamura, H. et al., 1980a; Hanamura, H. et al., 1980b). Diese Proteine wurden mit demineralisierter, vollkommen inaktiverter Knochenmatrix als Träger ektopisch in das subkutane Gewebe von Ratten implantiert, wo dann histologisch und durch Messung knochentypischer Marker eine Osteoinduktion nachgewiesen werden konnte (sog. in vivo ektopische Knochenbildung) (Wang et al., 1988). Aus diesen Proteinen konnten mittels Oligonukleotidsonden zunächst vier humane cDNAs von BMP-1, BMP-2, BMP-3 und BMP-4 kloniert werden (Wozney, J. M., 1988). Bis heute konnten über 15 verschiedene BMPs isoliert werden. Besondere Aufmerksamkeit richtete sich bis jetzt auf die spezifische in vivo- und in vitro-Charakterisierung der beiden eng verwandten Proteine BMP-2 und BMP-4, die durch die rekombinante Synthese von BMP-2 (Wang et al., 1990, Israel et al., 1992) bzw. BMP-4 (TenDijke, P. et al., 1994) in CHO-Zellen und in E. coli (Ruppert, R. et al., 1996; Moser, M, 1994) vorangetrieben wurde. Nicht alle BMPs werden der TGF β Superfamilie zugerechnet, BMP-1 gehört z.B. zur Astazin-Metallo-Endopeptidase Familie (Massague, J., 1990; Wozney, J. M. et al., 1988).

1.2 Aufbau und Entstehung von Knochengewebe

Zum besseren Verständnis der am längsten bekannten und auch namengebenden biologischen Funktion der BMPs, der Knorpel- und Knochenbildung, sollen diese beiden Gewebstypen zunächst näher beschrieben werden.

Da Knochen zum Bindegewebe gehört, besitzt er auch den für Bindegewebe charakteristischen Aufbau aus gewebstypischen Zellen und Interzellulärsubstanz. Die Knochenmatrix ist zu 65 % aus anorganischen Substanzen aufgebaut, die Hauptbestandteile sind Phosphat (ca. 50 %) und Calcium (ca. 35 %), das v.a. in Form von Hydroxylapatitkristallen ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) vorkommt. Fast das gesamte körpereigene Calcium liegt im Knochen als Teil dieser Hydroxylapatitkristalle vor, die durch die Verbindung mit den Kollagenfibrillen für die Härte des Knochens verantwortlich sind. Die organischen Bestandteile setzen sich zu 90 % aus Kollagen (v.a. Typ I) und zu 10 % aus nichtkollagenen Proteinen und Lipiden. Die nichtkollagenen Proteine teilen sich auf in 23 % Osteonectin, 15 % Osteocalcin, 9 % Sialoprotein, 9 % Phosphoproteine, 5 % α -HS-Glycoproteine, 4 % Proteoglycane, 3 % Albumin und weitere Proteine in geringeren Anteilen. Charakteristisch für die Proteoglycane des Knochens sind die Glycosaminoglycanseitenketten Chondroitin-4-sulfat, Chondroitin-6-sulfat und Keratansulfat sowie ein Fehlen von Hydroxyprolin im Kernprotein des Proteoglycans im Unterschied zu Kollagen.

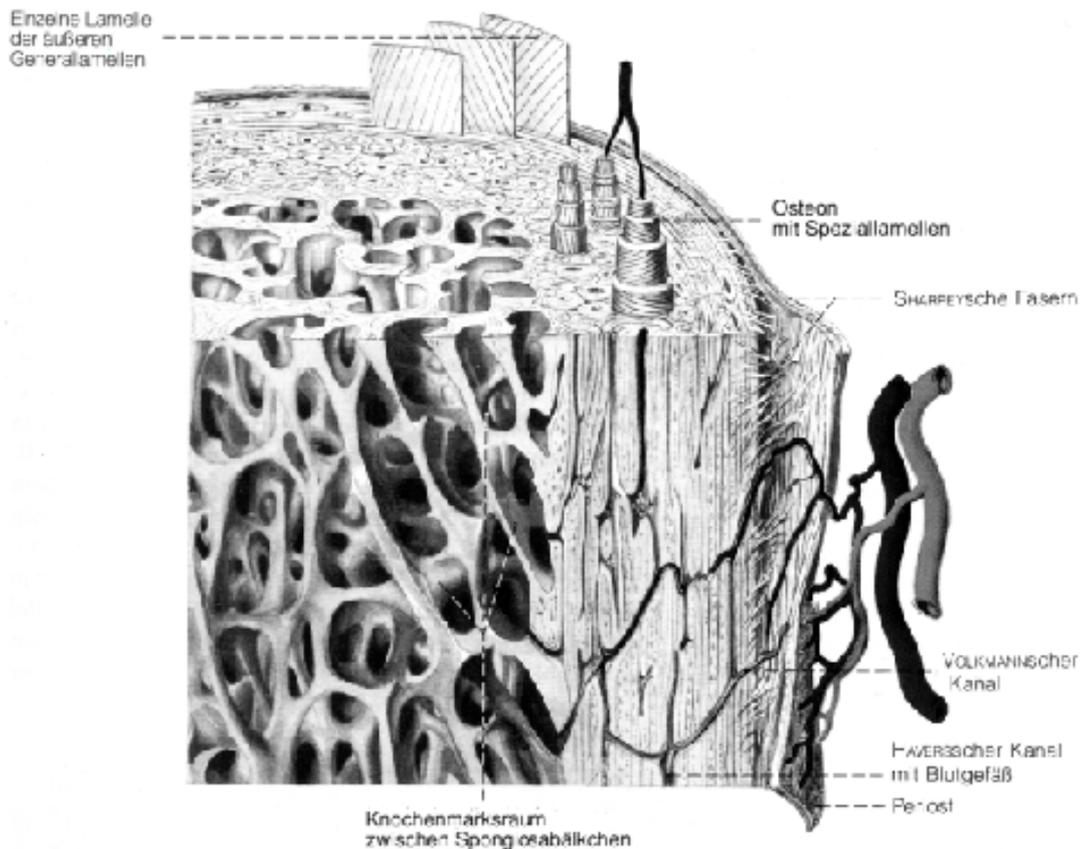


Abbildung 1-6 Schema des Knochenaufbaus mit Spongiosabälkchen und Kompakta (Benninghoff, A., 1994)

Die knochenspezifischen Zellen werden in drei verschiedene Typen unterteilt. Die für die Bildung von Knochen verantwortlichen Osteoblasten bilden durch Sekretion von Kollagen und einer glycoproteinhaltigen Grundsubstanz das sogenannte Osteoid des Knochens. Auch die Verkalkung des Osteoids wird durch die Osteoblasten gesteuert, indem sie vorher aufgenommenes Calcium in das Osteoid abgeben, wo es in Calcium-Phosphatsalze eingebaut wird. Die Osteoblasten werden zu Osteozyten, wenn sie vollständig von Knochengrundsubstanz umgeben sind. Diese Zellen sind für die Erhaltung des einmal gebildeten Knochens verantwortlich. Durch ihre große Kontaktfläche

zum umgebenden Gewebe sind sie u.a. für die Mobilisation des Calciums aus dem Knochen verantwortlich.

Während die Osteoblasten aus Mesenchymzellen hervorgehen, sind die Osteoklasten Abkömmlinge des hämatopoietischen Systems. Diese vielkernigen Riesenzellen sind für die Knochenresorption verantwortlich, indem sie im Bereich des Resorptionssaumes durch Säureproduktion (H⁺-Pumpe) den Apatit auflösen. Die anorganischen Bestandteile werden von den Osteoklasten aufgenommen, während die organische Grundsubstanz enzymatisch aufgelöst wird.

Auch Knorpel besitzt als Bindegewebe wie Knochen den typischen Aufbau aus gewebsspezifischen Zellen und Interzellulärsubstanz. Die Chondroblasten, die ähnlich den Osteoblasten, zu reifen Chondrozyten werden, gehen ebenfalls aus Mesenchymzellen hervor.

Der Hauptbestandteil des Knorpels ist Wasser (70 %), er besteht nur zu 4 % aus Mineralsubstanzen. Aufgrund unterschiedlicher Fasertypen in der Knorpelmatrix und der quantitativen Verteilung von Zellen und Interzellulärsubstanz lassen sich drei verschiedene Knorpeltypen unterscheiden. Am häufigsten ist der hyaline Knorpel, seltener Faserknorpel und nur an wenigen Stellen tritt der elastische Knorpel auf.

Charakteristisch für Knorpelgewebe ist das Proteoglycan Aggrecan mit den Glycosaminoglycanketten Chondroitin-4-Sulfat, Chondroitin-6-Sulfat und Keratansulfat. Die Aggrecanmoleküle können sich mittels bestimmter Bindeproteine an das nicht sulfatierte Glycosaminoglycan Hyaluronsäure anlagern. Die Proteoglycane sind in das fibrillenbildende Typ-II-Kollagen, das Hauptkollagen des Knorpels, eingebettet (Benninghoff, A., 1994).

Bei der Entstehung von Knochengewebe wird nach dem direkten Vorläufergewebe zwischen desmaler und chondraler Ossifikation unterschieden.

Die desmale Knochenbildung beginnt mit einer Anhäufung mesenchymaler Zellen, die sich dann direkt zu Osteoblasten differenzieren. Diese bilden Knochengrundsubstanz und werden dadurch zu Osteozyten. Durch Apatiteinlagerung entsteht dadurch Faserknochen.

Bei der chondralen Knochenbildung wird zunächst Knorpel aus den Mesenchymzellen gebildet, der dann in einem zweiten Schritt in Knochen umgebildet wird.

Es werden zwei Arten der chondralen Knochenbildung unterschieden. Durch perichondrale Ossifikation entstehen vor allem lange Röhrenknochen, während kurze Knochen und neugebildeter Knochen nach Frakturen durch enchondrale Ossifikation gebildet werden.

Bei dieser Art der Ossifikation wandern mesenchymale Zellen zu den Orten, an denen sich später der Knochen befindet; die Zellen kondensieren und lagern sich dicht zusammen, um knorpeltypische Matrixbestandteile wie z.B. Aggrecan zu sezernieren. Auf die Knorpelzellen lagern sich fibroblastenähnliche Zellen auf. Die Knorpelzellen im Innern des Kondensates hypertrophieren und ihre Matrix wird mineralisiert

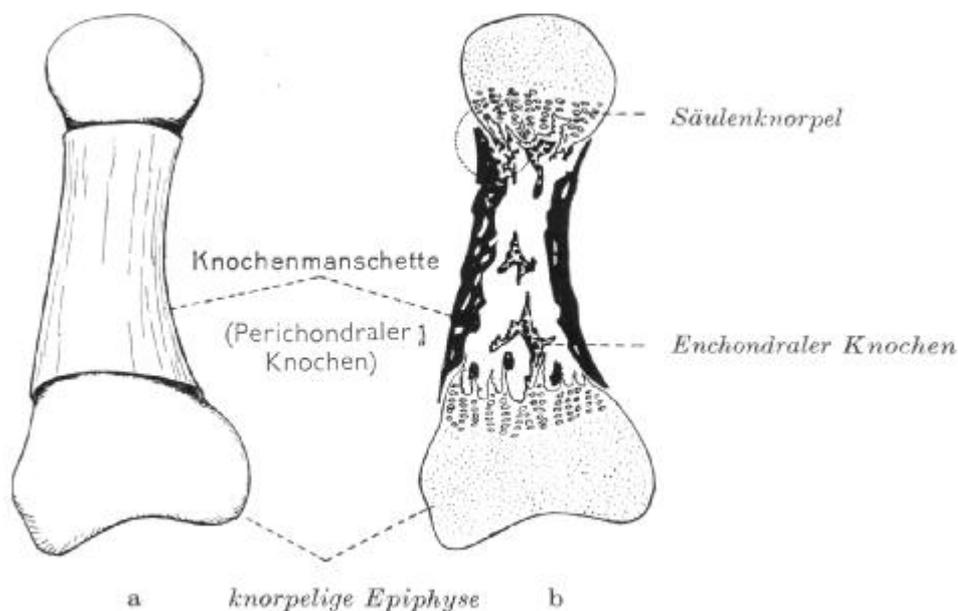


Abbildung 1-7 Aufsicht und Schnitt durch einen Röhrenknochen zur Darstellung der chondralen Ossifikation

Dies verhindert eine weitere Versorgung durch bereits eingewanderte KapillargefäÙe und hat ein Absterben der Knorpelzellen im Innern zur Folge. In die nun entstandenen Aushöhlungen wandern Osteoblastenvorläuferzellen ein, die sich in reife Osteoblasten differenzieren und Knochen bilden (Benninghoff, A., 1994).

Der Knochen befindet sich in einem ständigen Umbau, ein Gleichgewicht zwischen Knochenaufbau und Knochenabbau und die Anpassungsfähigkeit an veränderte mechanische Erfordernisse sind Zeichen eines gesunden Knochens.

1.3 BMPs sind an der Entstehung und Ausbildung zahlreicher Organe beteiligt

Nachdem die Existenz der BMPs und ihre Fähigkeit zur de novo Knochenbildung als Schlüsselentdeckung schon lange bekannt war, stellte nach der Identifizierung und Isolierung der verschiedenen BMPs die genaue Beschreibung der Osteoinduktion und die Charakterisierung der biologischen Aktivitäten der aufgereinigten und rekombinanten Proteine eine große Herausforderung dar.

Da die bone morphogenetic proteins im Sinne einer enchondralen Ossifikation zunächst Knorpel induzieren, der dann in einem zweiten Schritt in Knochengewebe umgewandelt wird, werden sie auch als „cartilage morphogenetic proteins“ bezeichnet (Reddi, A. H., 1998). Knocheninduktion durch demineralisierte, inaktivierte Knochenmatrix ist ein Prozess, der in mehreren Schritten abläuft (Reddi et al., 1972 und Reddi, A. H., 1981). Die entscheidenden Vorgänge dabei sind Chemotaxis, Mitose und Differenzierung, wobei man in diesem Zusammenhang unter Chemotaxis die gerichtete Wanderung von Zellen aufgrund eines chemischen Gradienten von Signalmolekülen versteht, die von der Matrix ausgesendet werden (Reddi, A. H., 1984). Die Hauptschritte sind nach Bindung von Fibronectin, das Affinitäten zur Bindung von Kollagen, Fibrin und Heparin besitzt, an die Kollagenmatrix die Annäherung mesenchymaler Zellen an diese Matrix. Auf die Proliferation der mesenchymalen Zellen nach drei Tagen folgt die Differenzierung in Chondroblasten am 5. Tag mit anschließender Reifung in Chondrozyten und Hypertrophie bis Tag 8. Nach der Kapillareinsprossung am Tag 9, erreicht die gemessene Aktivität der Alkalischen Phosphatase als Marker der Knochenbildung am 10. bis 12. Tag ihr Maximum. Der

Knochenmarker Osteocalcin steigt an bis Tag 28, und bis zum 21. Tag ist das hämatopoietische Knochenmark voll ausgebildet.

In Anlehnung an den Modellversuch zur ektopischen Knocheninduktion konnte bei subkutaner Implantation von rekombinantem, humanen BMP-2 (Wang, E. A. et al. 1990, Ruppert, R., 1996) in Ratten die gesamte Kaskade der Knochenbildung induziert werden.

In zahlreichen in vitro-Versuchen mit Primärzellen und Zelllinien von noch wenig ausdifferenzierten, pluripotenten Zellen wurde die osteoinduktive Potenz der BMPs näher untersucht. Hierbei wurde eine Differenzierung in Knochenzellen durch Messung knorpel- und knochentypischer Marker wie z.B. Osteopontin, Osteonectin u.a. festgestellt. In der mesenchymalen Maus-Fibroblasten-Zelllinie C3H10T1/2 hat BMP-2 den Effekt einer erhöhten ALP-Aktivität und einer verstärkten cAMP-Produktion als Antwort auf PTH (Katagiri, T. et al., 1990; Ogata, T. et al., 1993). Ähnliche Resultate wurden bei Verwendung der Maus-Osteoblasten-Zelllinie MC3T3-E1 erzielt. Hier wurde aber zusätzlich noch eine erhöhte Kollagensynthese und die Spätphasenexpression des c-fos Proto-Onkogens durch BMP-2 beobachtet (Takuwa, J. et al., 1991; Ohta, S. et al., 1992). Auch die Osteoblasten-Vorläufer Ratten-Zelllinie ROB C26, die auch in Myoblasten oder Adipozyten differenzieren kann, werden nach BMP-2-Zugabe zu Knochenzellen, so wie auch die humane Knochenmarksstromazelllinie W-20-17, die Osteoblasten-Vorläufer Ratten-Zelllinie CFK1 und die myoblastische Zelllinie C2C12 (Yamaguchi, A. et al., 1991; Thies, R. S. et al., 1992; Bernier, S. M. und Goltzmann, D., 1992; Katagiri, T. et al., 1994). In der humanen Osteoblasten-ähnlichen Zelllinie HOBIT verursacht BMP-2 eine dosis- und zeitabhängige Expression von TGF β -1 Genen und von IL-6 (Zheng, M. H. et al., 1994). In den C3H10T1/2-Zellen konnte auch durch stabile Transfektion von BMP-2 cDNA und BMP-4 cDNA eine osteogene Differenzierung durch

Messung der Marker Osteopontin, Osteonectin und Osteocalcin beobachtet werden (Ahrens, M. et al., 1993).

Neben diesen Zelllinien wurden mesenchymale, embryonale Zellen von Hühnergliedmaßenknospen auf die Zugabe von BMP-2, BMP-3 und BMP-4 getestet und eine chondrogene Differenzierung beobachtet. Es konnte eine dosisabhängig induzierbare Kollagen II- und eine Proteoglycansynthese festgestellt werden (Carrington, et al., 1991; Chen, P. et al., 1991). Inhibierende Effekte auf die chondrogene Differenzierung und damit antagonistische Wirkung zu den BMPs zeigen TGF β 1 (Chen, P. et al., 1993), PDGF und Activin A, deren Effekte aber durch BMP-4 z.T. vollständig kompensiert werden (Chen, P. et al., 1992). Die Differenzierungsfähigkeit von BMP-2 wurde mittels Alcian-Blau-Färbung und Kollagen II- und Proteoglycan-mRNA gezeigt.

Die von Friedenstein und Owen identifizierten Knochenmarksstromastammzellen, die nicht identisch mit der hämatopoietischen Stammzelllinie sind, werden auch durch BMP-2 zur Knochenbildung angeregt, und sind damit wichtige in vitro-Zellkultursysteme zur Identifizierung der Zielzellen der BMPs.

Obwohl die BMPs aufgrund ihrer osteoinduktiven Aktivität entdeckt worden sind, ist in den letzten Jahren durch moderne molekularbiologische Methoden immer klarer geworden, wie vielfältig die verschiedenen Funktionen der BMPs sind. Die BMP-2- und BMP-4-knock-out-Mäuse haben unter anderem gezeigt, wie wichtig die Rolle dieser Proteine in der Embryonalentwicklung der Wirbeltiere ist. Die Inaktivierung des murinen BMP-4-Gens in embryonalen Stammzellen mittels „gene targeting“ (Winnier, G. et al., 1995) zeigt ein Absterben der meisten homozygoten Mäuse in der frühen Embryogenese. Die homozygoten Mäuse mit nach gleicher Methode inaktiviertem BMP-2-Gen sterben ebenfalls aufgrund starker Defekte in der Entwicklung von Amnion und

Herz bereits frühembryonal (Zang, H. und Bradley, A. N., zitiert in Hogan, B. L. M., 1996).

1.4 Die eng verwandten Proteine BMP-2/4 und Dpp spielen ähnliche Rollen in Fliege, Frosch und Wirbeltieren

Der starke Einfluss von BMP-2 und BMP-4 auf die Entwicklungsprozesse erscheint naheliegend, wenn man die enge Verwandtschaft zu dpp in **Drosophila melanogaster** betrachtet. Es scheint nach bisheriger Erkenntnis möglich, dpp als funktionelles Modellbeispiel für BMP-2 und BMP-4 zu nehmen. Neben seinem Einfluss auf die Entwicklung der Imaginalscheiben mit der korrekten Ausbildung der proximo-distalen Achse spielt es eine entscheidende Rolle bei der dorso-ventralen Musterbildung in der frühen Embryogenese der Fliege (Irish, V. F. und Gelbart, W. M., 1987; Ferguson, E. L. und Anderson, K. V., 1992a; Hoffmann, F. M., 1990; Ferguson, E. L. und Anderson, K. V., 1992b), bei der dpp als Genprodukt eines zygotisch aktiven Gens als Morphogen wirkt: das bedeutet, dass durch die Ausbildung eines Konzentrationsgradienten Zellen verschiedene Differenzierungen durchlaufen, abhängig von der Konzentration, die entlang des Gradienten auf die Zellen einwirkt. Dpp hat einen dorsalisierenden Effekt; das kann einmal gezeigt werden durch Versuche mit Mutanten des dpp-Gens, die einen Funktionsverlust des Gens zur Folge haben. Die fehlende Funktion des dpp-Gens zeigt eine Expansion ventraler Strukturen in den dorsalen Bereich des Embryos. Entsprechend erhält man eine Expansion dorsaler Strukturen bei zusätzlichen Kopien des dpp-Gens (Ferguson, E. L. und Anderson, K. F., 1992b).

Ein gängiges Modell für Untersuchungen der Rolle von Signalmolekülen in der Mesoderminduktion und Musterbildung ist **Xenopus laevis**. Über den Ort des Sameneintritts in das Xenopusei wird die dorsoventrale Polarität des Embryos festgelegt. Der vegetale Cortex und das animale Cytoplasma wird durch Rotation des corticalen Cytoplasmas auf die Seite positioniert, die dem Ort des Sameneintritts gegenüberliegt (Vincent, J. P. und Gerhart; J. C., 1987). Bereits im 32- bzw. 64-Zell-Stadium beginnt die Sekretion von Signalmolekülen, die das Schicksal von Zellen von unspezifischem Ektoderm in ventral-laterales Mesoderm bestimmen. Signale, ausgehend vom sogenannten Nieuwkoop-Zentrum, bewirken die Ausbildung des sogenannten Spemann-Organizers (von Spemann und Mangold 1924 erstmals beschrieben) aus dem dorsalen Bereich der Marginalzone und die Induktion von ventralem Mesoderm aus anderen Teilen der Marginalzone. Kurz vor Beginn der Gastrulation ist die BMP-4-Expression gleichmäßig über den ganzen Embryo verteilt, aber kurz nach dem Einsetzen der Gastrulation ändert sich das Expressionsmuster. Vom Spemann-Organizer werden wiederum Signalmoleküle ausgesendet, die einen dorsalisierenden Effekt haben (z.B. Noggin, Chordin und Follistatin) und durch Ausbildung eines morphogenetischen Gradienten die zu diesem Zeitpunkt der Gastrulation über den ganzen Embryo exprimierten ventralisierenden Signale (v.a. BMP-4) je nach Konzentration verschieden stark unterdrücken. Wie in zahlreichen Transplantationsexperimenten gezeigt wurde, kann der Spemann-Organizer auch Gastrulationsbewegungen und die Bildung von Nervengewebe induzieren, wenn er in den ventralen Bereich eines Xenopusembryos verpflanzt wird und ist damit verantwortlich für die Ausbildung einer zweiten Achse (Lemaire, P. et al., 1995). Activin spielt als dorsalisierender Faktor eine Rolle in der Mesoderminduktion; eine verzögerte Mesoderminduktion wurde durch die Expression der extrazellulären Domäne eines Typ II Activin-Rezeptors gezeigt, der zwar den Liganden bindet, aber keine Activin-Signale weiterleitet (Dyson

und Gurdon, 1997). Allerdings können andere Faktoren zu einem späteren Zeitpunkt den Effekt der verzögerten Entwicklung durch die fehlende Activinwirkung wieder kompensieren.

Auch bFGF besitzt, ähnlich wie BMP-4, einen ventralisierenden Effekt, wenn auch nicht so ausgeprägt. Im Gegensatz zu bFGF kann der ventralisierende Effekt von BMP-4 die dorsalisierende Aktivität von Activin überkompensieren, d.h. durch Activin dorsalisierte Strukturen werden durch Zugabe von BMP-4 ventralisiert (Jones et al., 1992).

Auch die beiden Proteine Noggin und Chordin haben dorsalisierende Aktivität, indem sie an BMP-4 binden und dadurch die Interaktion mit seinem Zelloberflächenrezeptor inhibieren; ihre Gene werden zuerst in der dorsalen Marginalzone exprimiert, die zur späteren Blastopore wird, und ihr Expressionsmuster verläuft insgesamt gegenläufig zu dem des BMP-4, d.h. ihre Konzentration steigt nach dorsal hin an (Sasai, Y. et al., 1995; De Robertis, E. M. und Sasai, Y., 1996; Schmidt, J. E. et al., 1995; Reem-Kalma, Y., 1995; Ferguson, E. L., 1996, Hogan, B. L. M., 1996).

In der Embryogenese von **Wirbeltieren** spielen die Interaktionen zwischen epithelialen und mesenchymalen Zellen für die Morphogenese und Differenzierung der verschiedenen Gewebe eine wichtige Rolle. Die Expression der BMPs in der embryonalen Entwicklung von Skelett und verschiedenen Organen wurde durch in situ-Hybridisierung bei der Maus als Modell für höhere Wirbeltiere untersucht, die molekularen Mechanismen sind jedoch noch zum großen Teil unbekannt.

In sich entwickelnden Zahnknospen und Gliedmaßenknospen wurden Transkripte von BMP-2 und BMP-4 gefunden (Lyons, K. M. et al., 1990; Vainio, S. et al., 1993). Auch in vitro Versuche haben einen Effekt von BMP-2, BMP-4 und BMP-7 in verschiedenen Stadien der Zahnentwicklung bei Vorgängen wie

Zellproliferation, Apoptose, Differenzierung und Interaktionen zwischen epithelialen und mesenchymalen Zellen gezeigt. Im Knospenstadium liegen die Zellen, die BMPs exprimieren, in einer zentralen Region im ektodermalen Epithel als „enamel knot“ zusammen (Vaahtokari et al., 1996a). Diese Zellen zeigen eine auffallend niedrigere Proliferationsrate als die Zellen im übrigen Epithel, was möglicherweise auf eine Funktion als Organisationszentrum im Rahmen der Zahnentwicklung hindeutet, genaueres ist bis heute aber noch nicht bekannt. BMP-2 hemmt möglicherweise die Proliferation des Epithels, während BMP-4 vielleicht einen Einfluss auf die Apoptose hat und damit für die Beendigung der Signalfunktion im „enamel knot“ verantwortlich wäre (Vaahtokari et al., 1996b). Wenn in in vitro-Versuchen das epitheliale BMP-4-Signal nachgeahmt wird, werden im darunterliegenden Mesenchym die Expression von BMP-4 und den Homeoboxgenen Msx 1 und Msx 2 induziert, wodurch auch die epithelial-mesenchymalen Wechselwirkungen durch BMPs gezeigt werden (Vainio et al., 1993). Auch im späten sog. „Glockenstadium“ spielen BMP-2 und BMP-4 u.a. eine Rolle bei der Differenzierung der Odontoblasten und der Ameloblasten (Vainio et al., 1993).

Auch in der Entwicklung vieler anderer Organe wirken die BMPs mit, wahrscheinlich ebenfalls durch Beteiligung an epithelial-mesenchymalen Interaktionen. Oft werden sie von einer relativ kleinen Gruppe von Zellen exprimiert, was auf eine Funktion dieser Zellen als „Organisationszentren“ der Organentwicklung hindeutet. In den letzten Jahren konnten mit Hilfe zahlreicher molekularbiologischer Experimente, u.a. einiger „knock-out“-Mäuse, einzelnen BMPs immer exakter spezifische Funktionen in der Entwicklung der verschiedensten Organe, wie z.B. Niere, Lunge, Haut, Haaren zugeordnet werden.

Viele BMPs werden in der embryonalen Niere und im Urogenitalsystem exprimiert (King et al, 1994; Bitgood und McMahon, 1995; Dudley et al., 1995;

Luo et al., 1995). Wichtig für die Entstehung des Ureters scheint BMP-5 zu sein (King et al., 1994) und auch BMP-7, das zunächst im Metanephros und später im Mesenchym exprimiert wird, spielt in der Nephrogenese eine Rolle. Homozygote „knock-out“-Mäuse für das BMP-7-Gen sterben bald nach der Geburt aufgrund von Nierenversagen, das durch eine massive Apoptose der nicht induzierten mesenchymalen Zellen verursacht wird.

In der embryonalen Lunge wurde BMP-4-, BMP-5- und BMP-7-mRNA gefunden (King et al., 1994; Bitgood und McMahon, 1995; Bellusci et al., 1996). Interessanterweise ist die BMP-4-RNA auf die distalen Lungenspitzen, die sich aus Endoderm des Vorderdarms entwickeln, und auf das benachbarte Mesenchym beschränkt. Aufgrund von Beobachtungen an transgenen Mäusen kann man darauf schließen, dass BMP-4 die Funktion hat, die Proliferation des Endoderms zu inhibieren und gleichzeitig das Wachstum von lateralen Ästen aus den Lungenknospen zu induzieren.

Schon lange ist bekannt, dass BMP-2, neben zahlreichen anderen Embryonalstadien, auch im Promyokard des sich entwickelnden Herzens der Maus (Entwicklungsstadium E9.5) stark exprimiert wird (Lyons et al., 1989, 1990, 1995). Durch eine BMP-2-Nullmutation konnte bei Mäusen im homozygoten Zustand, neben Defekten in der Bildung von Amnion/Chorion, auch eine abnormale Herzentwicklung festgestellt werden (Zhang, H. und Bradley, A, 1996).

Phänotypisch ist die sogenannte short ear (se)-Mutation mit ihren Defekten in Skelettentwicklung schon seit 1921 bekannt (Lynch, C.J., 1921). Ebenfalls in Mäusen wurde die Korrelation von Mutationen im BMP-5-Gen mit Mutationen im short ear (se) locus gefunden und dieser locus als BMP-5-Gen identifiziert (Kingsley, D.M. et al., 1992). Die lokale Expression des BMP-5-Gens, die mit den Orten der Skelett- und Gewebeabnormalitäten übereinstimmt, und die

Tatsache, dass die Produktion des reifen BMP-5 durch die klassische *se*-Mutation verhindert wird, legten den Schluss nahe, dass BMP-5 das normale Genprodukt des *se*-locus ist (Kingsley, D. M. et al., 1992; King, J. A. et al., 1994).

Die morphologischen Veränderungen in den *se*-Mäusen haben ihren Ursprung in den durch den veränderten Genlocus fehlerhaften Kondensationen mesenchymaler Zellen (Green, E. L. und Green, M. C., 1942; Green, M. C., 1968). Da jedes dieser Zellaggregate die Grundlage für ein späteres skelettales Element darstellt, können so veränderte Morphologie, Größe und z.T. sogar das Fehlen mehrerer kleiner Knochen und des 13. Rippenpaares erklärt werden. Eine augenfällige Fehlbildung ist die namensgebende Ausbildung kurzer Ohren neben über 20 weiteren Anomalien. Bei der Frage eines Zusammenhangs zwischen dem Expressionsmuster von BMP-5 und den Skelettdefekten zeigten sich in Experimenten mit chimären Mäusen (eine Fusion aus Wildtyp und homozygoter *se*-Mutation) auf eine Körperhälfte beschränkte Skelettmissbildungen und damit ein primär lokaler Effekt des Proteins. Diese Tatsache, zusammen mit einer Korrelation zwischen dem Expressionsmuster des BMP-5 in den Kondensationen und deren Ausmaß und Größe, legt die Vermutung nahe, dass es sich bei BMP-5 um einen autokrin oder parakrin wirkenden Faktor handelt (Kingsley, D. M., 1994b).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Grundanlage des Vertebratenskelettes wahrscheinlich wesentlich durch das räumliche und zeitliche Expressionsmuster der BMPs als die entscheidenden Signalmoleküle in der Knorpel- und Knochenentwicklung festgelegt wird. Die Unterschiede in der Synthese dieser Proteine und deren Verteilungsmuster bei den verschiedenen Organismen hat letztlich die unterschiedlichen Skelettausbildungen zur Folge (Kingsley, D. M., 1994).

1.5 Die Rolle der BMPs in der Gliedmaßenentwicklung

Auch die Entwicklung von Gliedmaßenknospen bietet ein hervorragendes Beispiel, die Fähigkeit der BMPs zur Induktion von Gewebe im Rahmen von Interaktionen zwischen epithelialen und mesenchymalen Zellen zu untersuchen. Besonders die sich entwickelnde Hühnergliedmaßenknospe, deren Entwicklung durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Mitglieder der TGF β Superfamilie beinhaltet, wurde als Entwicklungsmodell in den letzten Jahren immer beliebter. Der komplexe, durch eine Reihe von Signalmolekülen gesteuerte Prozess ist verantwortlich dafür, dass sich aus einer Ansammlung zahlreicher mesenchymaler Zellen, die von wenigen ektodermalen Zellen umgeben sind, das komplexe Muster einer Gliedmaße entwickelt. Der erste Schritt in diesem Prozess ist, nach Proliferation der mesenchymalen Zellen, die durch sie induzierte Bildung der apikalen ektodermalen Furche (AER) entlang des anterior-posterioren Randes durch eine Verdickung der ektodermalen Zellen. Die AER ist verantwortlich für die Morphogenese entlang der proximo-distalen Achse und damit für eine regelrechte Formung der Knospe. Die anterior-posteriore Musterbildung wird durch die sogenannte Zone der polarisierenden Aktivität (ZPA) in einem spezialisierten Bereich im posterioren Teil der Gliedmaßenknospe bestimmt. Die polarisierende Aktivität kann durch Transplantationsexperimente nachgewiesen werden: Die Verpflanzung von Mesenchym aus der ZPA in das anteriore Mesenchym induziert die Ausbildung einer zweiten Knospe, da sich anteriore Zellen nun wie posteriore verhalten (Tickle, C. et al., 1975). Entfernt man dagegen anteriore Teile der Gliedmaßenknospe hat dies keinen Effekt auf die Entwicklung. Der für die polarisierende Aktivität entscheidende Faktor ist das in dieser Zone exprimierte sonic hedgehog (Riddle, R. D. et al., 1993).

Das folgende Modell zur Induktion der Gliedmaßenentwicklung (Tabin, C., 1995) entstand u.a. aufgrund der Beobachtung, dass die Injektion von FGF-1, FGF-2 und FGF-4 in die Flanke des Embryos die Entwicklung einer ektopischen, regelrechten Gliedmaße zur Folge hatte (Cohn, M.J. et al., 1995): die Proliferation der mesenchymalen Zellen und die Expression von sonic hedgehog in den sog. kompetenten Zellen der ZPA wird durch im Mesoderm lokalisiertes FGF induziert, und die Zellen der sog. fortschreitenden Zone erhalten durch diesen Faktor die Fähigkeit, die AER zu induzieren. Sonic hedgehog aus der ZPA wiederum induziert nun die FGF-4-Produktion in der AER (Niswander, L. et al., 1994), und dieses FGF-4 erhält nun die ZPA aufrecht durch Erhaltung der weiteren sonic hedgehog-Expression mittels eines positiven feedback (Niswander, L. et al., 1994; Laufer, E. et al., 1994).

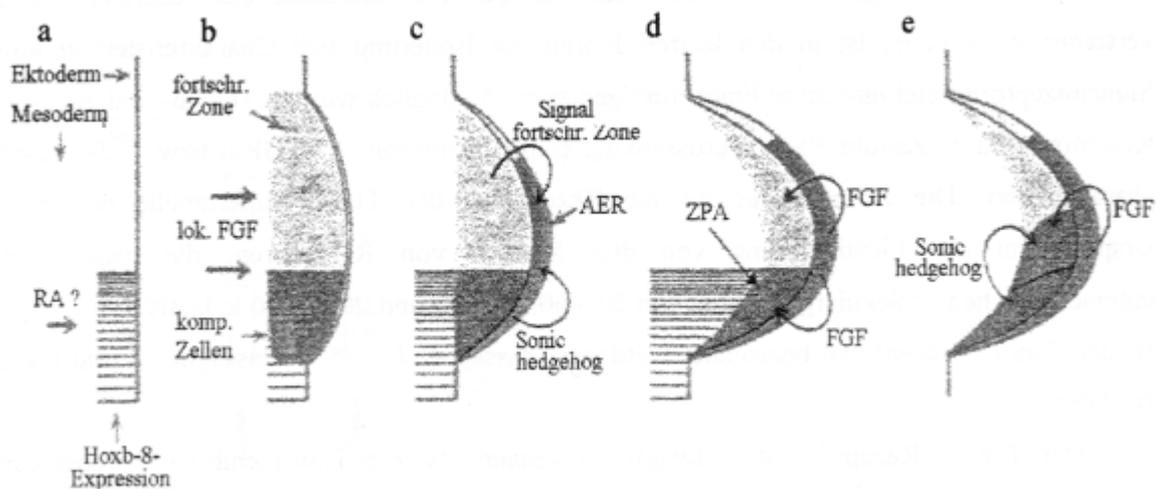


Abbildung 1-8 Modell zur Entwicklung einer Gliedmaße

In der frühen Knospenbildung werden BMP-2 und BMP-4 in der AER und im posterioren Mesenchym exprimiert, BMP-2 wird dabei als eines der Signalmoleküle der polarisierenden Region angesehen und es wird auch bei

Verpflanzung von ZPA-Transplantaten in das anteriore Mesenchym dort eine ektopische BMP-2-Genexpression induziert. Allerdings hat es keinen direkten Einfluss auf die Morphogenese der Knospe.

1.6 Die Extrazelluläre Matrix – Aufbau und mögliche Funktionen

Seit einiger Zeit wird die enorme Bedeutung der extrazellulären Matrix und ihrer Interaktion mit löslichen Wachstumsfaktoren in Differenzierung und Morphogenese immer klarer. Zunächst werden die Wachstums- und Differenzierungsfaktoren von bestimmten Zellen sezerniert, um dann durch den Interzellularraum zu ihren spezifischen Rezeptoren auf den Zielzellen zu gelangen, die sie dann mit hoher Affinität binden. Allerdings unterliegen sie nach ihrer Sekretion der Diffusion, so dass ihre Konzentration, ausgehend vom Sekretionsort, normalerweise in einem steilen Gradienten abnehmen würde. Mehrere Möglichkeiten sind bekannt, wie aus dieser dreidimensionalen Diffusion zumindest eine zweidimensionale wird; z.B. kann ein niederaffiner Rezeptor, wie der TGF β -Typ III Rezeptor Betaglycan (Lopez-Casillas et al., 1993), den Liganden zunächst binden und daraufhin dem hochaffinen Rezeptoren „präsentieren“ (Bernfield et al., 1992).

Um den Einfluss der extrazellulären Matrix (EZM) auf die biologische Aktivität der Liganden hinreichend beschreiben zu können, muss zunächst kurz auf ihren allgemeinen Aufbau und ihre Hauptbestandteile eingegangen werden.

Die meisten Zellen in vielzelligen Organismen sind untereinander durch ein kompliziertes Netzwerk von Protein- und Polysaccharidmolekülen verbunden, die von den jeweils ortsständigen Zellen sezerniert werden.

Glycosaminoglycane	Molare Masse (D)	Wiederholtes Disaccharid		Sulfate pro Disaccharideinheit	Gewebeverteilung
		Mono-saccharid 1	Mono-saccharid 2		
Hyaluronsäure	4 x 10 ³ - 8 x 10 ⁶	D-Glucuronsäure	N-Acetyl-D-Glucosamin	0	Verschiedene Bindegewebe, Haut, Knorpel, Synovialflüssigkeit
Chondroitin-4-sulfat	5000 - 50000	D-Glucuronsäure	N-Acetyl-D-Galaktosamin	0.2-1.0	Knorpel, Cornea, Knochen, Haut, Arterien
Chondroitin-6-sulfat	5000 - 50000	D-Glucuronsäure	N-Acetyl-D-Galactosamin	0.2-2.3	Knorpel, Cornea, Knochen, Haut, Arterien
Dermatan-Sulfat	15000 - 40000	D-Glucuronsäure oder L-Iduronsäure	N-Acetyl-D-Galaktosamin	1.0-2.0	Haut, Blutgefäße, Herz, Herzklappen
Heparan-sulfat	5000 - 12000	D-Glucuronsäure oder L-Iduronsäure	N-Acetyl-D-Glucosamin	0.2-3.0	Lunge, Arterien, Zelloberflächen
Heparin	6000 - 25000	D-Glucuronsäure oder L-Iduronsäure	N-Acetyl-D-Glucosamin	2.0-3.0	Lunge, Leber, Haut, Mastzellen
Keratan-sulfat	4000 - 19000	D-Galactose	N-Acetyl-D-Glucosamin	0.9-1.8	Knorpel, Cornea, Bandscheibe

Tabelle 1-3 Bis jetzt bekannte Glycosaminoglycane und ihre Eigenschaften

Zwei Hauptkomponenten der EZM werden unterschieden: Fasern, z.B. Kollagen- oder Elastinfasern, und polysaccharidische Glycosaminoglycane, die in der EZM gebunden an Proteine als sog. Proteoglycane auftreten.

Einleitung

Die Glycosaminoglycane sind lange, unverzweigte Polysaccharidketten, die aus sich wiederholenden identischen Disaccharideinheiten bestehen. Bis jetzt sind sieben verschiedene Glycosaminoglycane bekannt (siehe Tabelle 1-3). Sie unterscheiden sich u.a. in ihrem Molekulargewicht, das sowohl von der Anzahl der sich wiederholenden Disaccharideinheiten als auch von der Anzahl der Seitengruppen abhängt; auch sind sie aufgrund der verschiedenen Monosaccharidbausteine, der einzelnen Einheiten der Disaccharide, und in Anzahl und Position der Sulfatgruppen unterschiedlich. Einer der beiden Monosaccharidbausteine ist immer ein Aminoglycosid, meistens N-Acetylglucosamin oder N-Acetylgalactosamin.

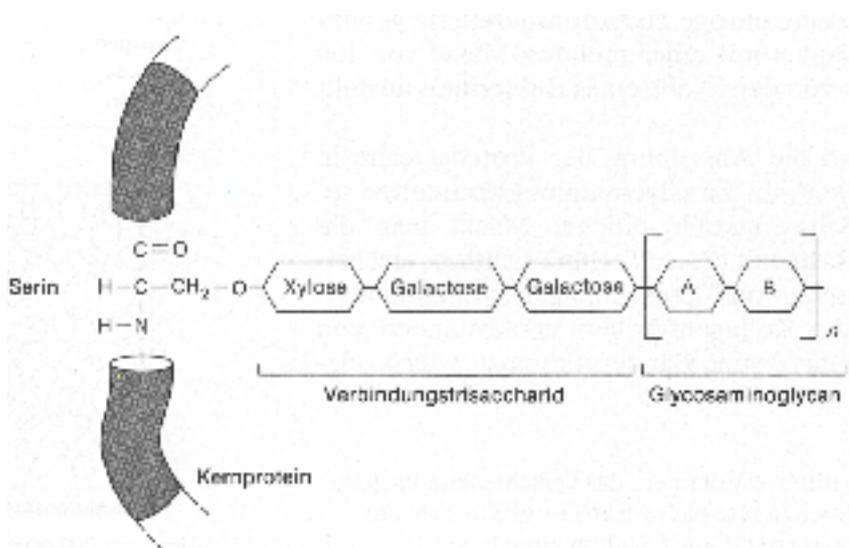


Abbildung 1-9 Die Verbindung des sog. Kernproteins mit den Glycosaminoglycanen erfolgt durch Zuckerreste

Sehr wichtig für die biologischen Funktionen der Glycosaminoglycane ist die große Anzahl Sulfat- und Carboxygruppen an vielen Zuckerresten, die für die starke negative Ladung der Glycosaminoglycane verantwortlich sind.

In vivo erscheinen die Glycosaminoglycane in der EZM an Proteine gebunden, die in diesen Molekülen als „Kernproteine“ bezeichnet werden.

Die bisher bekannten Proteoglycane sind eine sehr heterogene Gruppe von Molekülen, und die Zahl ihrer Glycosaminoglycanseitenketten schwankt zwischen zwei und mehreren hundert. Da Glycosaminoglycane sehr hydrophil sind, können Proteoglycane eine große Menge Wasser aufnehmen und dadurch ein Gel bilden. Dem entstehenden hohen Quelldruck setzen die Kollagenfasern einen gewissen Widerstand entgegen und dieses System kann Druck von außen erfolgreich abfangen. Das Wasser in dem Gel erlaubt die Diffusion von Nährstoffen, Metaboliten und Hormonen und damit einem Austausch zwischen Blut und Gewebe, sowie die Wanderung von Zellen.

Die Kollagenfasern bilden die andere Hauptgruppe extrazellulärer Makromoleküle, eingebettet in das von den Proteoglycanen gebildete Gel, um der EZM Struktur zu geben. Ein Kollagenmolekül besteht aus drei Kollagen-Polypeptidketten, die auch alpha-Ketten genannt werden, in Form einer Helix (ca. 300 nm lang, Durchmesser ca. 1,5 nm). Die Kollagenmoleküle werden in die EZM sezerniert, wo sie sich zu den sog. Kollagenfibrillen zusammenlagern (einige Mikrometer lang, Durchmesser zwischen 10 und 300nm), und mehrere dieser Fibrillen wiederum bilden dann die Kollagenfasern, durch deren kovalente Verbindungen untereinander ein stabiles Gerüst für die EZM entsteht.

Seit kurzem ist bekannt, dass für die Bildung der Kollagenfasern z.T. Proteoglycane verantwortlich sind; z.B. wurden in Decorin-„knock-out“-Mäusen große und irregulär geformte Kollagenfasern gefunden.

Die großen Unterschiede zwischen den einzelnen Bindegeweben hängen neben den spezifischen Zellen v.a. von der charakteristischen Mischung der Matrixbestandteile ab.

Das Heparinmolekül ist das im medizinischen Bereich sicherlich am bekannteste Glycosaminoglycan, da es als freies Molekül antikoagulative Wirkung hat, indem es die Bindung von Thrombin an Antithrombin III verstärkt. In der EZM ist Heparin an ein Kernprotein gebunden und erscheint daher als Proteoglycan (Serglycin).

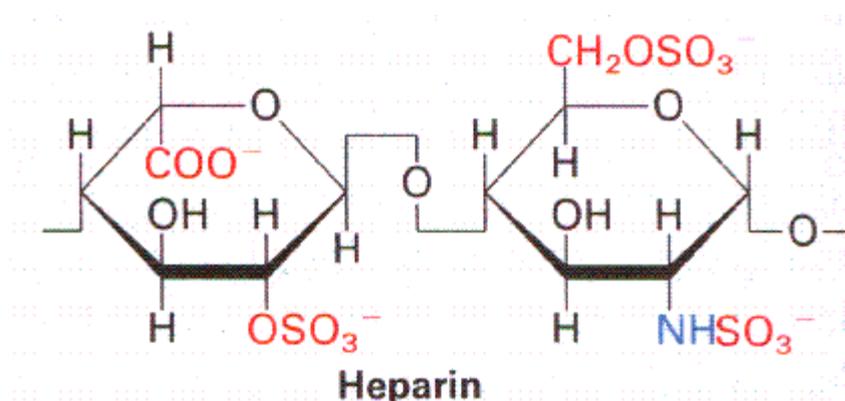


Abbildung 1-10 Die negativ geladenen Sulfat- und Carboxylgruppen im Heparinmolekül sind rot unterlegt.

Am Aufbau des Heparinmoleküls fallen eine große Anzahl negativ geladener Sulfat- und Carboxylgruppen auf, die sehr wichtig für die Bindung an positiv geladene basische Aminosäuren der Heparinbindungsstellen vieler Moleküle sind, wie z.B. BMP-2, dpp und anderer Wachstumsfaktoren, des Enzyms Heparinase I von *Flavobacterium heparinum* (Sasisekharan, R. et al., 1996) und anderen mehr. Es handelt sich dabei um eine nichtkovalente ionische Bindung jeweils zwischen den beiden Molekülen. Betrachtet man die Proteinsequenz des N-Terminus des reifen BMP-2, so fällt die bemerkenswerte

Anzahl positiv geladener basischer Aminosäurenreste auf, die an eine potentielle Bindungsstelle für das positiv geladene Heparinmolekül denken lassen.

Tatsächlich wurde dieser basische N-Terminus des BMP-2 als Heparinbindungsstelle identifiziert, die nicht für die Rezeptoraktivierung notwendig ist, aber die biologische Aktivität des Proteins verändert (Ruppert, R., Hoffmann, E. und Sebald, W., 1996). Indem die ersten zwölf Aminosäuren des reifen BMP-2-Proteins durch die ersten dreizehn Aminosäuren des humanen Interleukin-2 als Ersatzsequenz ausgetauscht wurden, konnte durch Analyse der physikalischen Interaktion mit Heparin in Biosensor-Experimenten gezeigt werden, dass keine Bindung des Proteins an Heparin mehr besteht. Im Vergleich der Aminosäuresequenzen des BMP-2 und der heparinbindungsdefizienten Mutante EH-BMP-2 fällt auf, dass die beiden basischen Triplets K H K und R K R durch neutrale Aminosäuren, z.B. T und S ersetzt worden sind.

BMP-2 (human)	QA KHK QRKRLKS SCKRH
EHBMP-2	MAPTS SST KKTQ LC KRH

Außerdem wurde gezeigt, dass die Heparinbindungsstelle des BMP-2 seine biologische Aktivität modifiziert. Im folgenden Experiment konnte gezeigt werden, dass BMP-2 unter in vitro-Bedingungen einer Konkurrenz zwischen der Bindung an seinen Rezeptor und der Bindung an heparinartige Bindungsstellen in der EZM unterliegt. Nach dieser Theorie wird ein Teil der BMP-2-Moleküle durch Bindung an die EZM „abgefangen“ und steht dadurch nicht mehr zur

Bindung an den Rezeptor zur Verfügung. Die Beobachtung, dass die Mutante EH-BMP-2 unter in vitro-Bedingungen eine höhere biologische Aktivität hat als BMP-2, ist mit dieser Vorstellung konsistent. Unterstützt wurde diese Theorie durch ein zweites Experiment, bei dem unter gleichen Bedingungen zusätzlich zum BMP-2 freie Heparinmoleküle zugegeben wurden. Auch hier wurde ein Anstieg der biologischen Aktivität im Fall von BMP-2, aber nicht bei EH-BMP-2 beobachtet, da nun die heparinartigen Bindungsstellen der EZM bereits durch die freien Heparinmoleküle abgesättigt sind und so für die BMP-2-Moleküle keine Konkurrenz zum Rezeptor mehr darstellen.

Im Gegensatz zu den in vitro-Bedingungen wurde in in vivo-Versuchen bei Ratten eine geringere biologische Aktivität im Fall der Mutante EH-BMP-2 festgestellt, was auf eine andere Bedeutung der EZM in vivo hindeutet. Hier wird angenommen, dass die Diffusion der Signalmoleküle vom Ort ihrer Sekretion in alle drei Richtungen des Raumes durch die zunächst niederaffine Bindung an die EZM abgeschwächt wird, bevor die Proteine eine höheraffine Bindung mit dem Rezeptorkomplex eingehen. Das hat eine abgeschwächte Wirkung der heparinbindungsdefizienten Mutante EH-BMP-2 zur Folge, da sie nicht in der EZM gehalten werden kann und frei wegdiffundiert.

1.7 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war eine detailliertere Charakterisierung der für die Heparinbindung verantwortlichen Aminosäuren im N-Terminus des humanen BMP-2 und die Untersuchung einer möglichen Korrelation zwischen der hohen Anzahl basischer Aminosäuren, angeordnet in den beiden Tripletts K H K und R K R, und der Intensität der Heparinbindung. Besonderes Interesse lag dabei auf der Untersuchung eines möglichen direkten Zusammenhangs zwischen den basischen Tripletts bzw. einer einzelnen der drei Aminosäuren und der

biologischen Aktivität des Proteins. Durch Schaffung der unter 3 beschriebenen BMP-2-Varianten sollte eine schrittweise Modifizierung des N-Terminus vorgenommen werden, um zunächst in in vitro-Versuchen eine mögliche Veränderung der biologischen Aktivität zu überprüfen und damit eine Grundlage für spätere in vivo-Versuche zu schaffen.

Ausgehend von den in vivo-Versuchen mit der BMP-2-Variante EH-BMP-2, könnte möglicherweise eine verstärkte Bindung an die EZM und eine damit verbundene geringere Diffusion des Proteins in vivo einen mehr lokalen Effekt zeigen, der gleichbedeutend mit einer geringeren Menge an Protein zur Erzielung der gleichen Wirkung wäre. Hierfür sollten die in dieser Arbeit angefertigten BMP-2-Mutanten die Ausgangsbasis bieten.

2 Material und Methoden

2.1 Abkürzungen

AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
ActR	Aktivin-Rezeptor
AER	Apikale ektodermale Furche
aFGF	acidic Fibroblast Growth Factor
ALP	Alkalische Phosphatase
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AS	Aminosäuren
BAA	Bisacrylamid
BMP	Bone Morphogenetic Protein
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
CHAPS	3-((3-Cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propansulfonat
CM-	Carboxymethyl-
d	Tag
Da	Dalton
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium (Kulturmedium für höhere Zellen)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPP/dpp	Decapentaplegic-Protein/Gen
DTT	Dithiothreitol

E.coli	Escherichia coli
EC50	halbmaximale effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	fetales Kälberserum
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GDF	Growth and Differentation Factor
GuCl	Guanidiniumhydrochlorid
h	Stunde
hh	hedgehog
HMS	Hochmolekularer Größenstandard
IPTG	Isopropyl- β -thiogalaktosid
Ka	Geschwindigkeitskonstante der Assoziationsreaktion
KD	Dissoziationskonstante
Kd	Geschwindigkeitskonstante der Dissoziationsreaktion
LB	Luria Broth
LMS	Niedermolekularer Größenstandard
M	Molar
MeOH	Methanol
min.	Minute(n)
NaOAc	Natriumacetat
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
Pfu	Pyrococcus furiosus
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid

Material und Methoden

Rnase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RU	Resonanzeinheit
SDS	Natriumdodecylsulfat
TB	Terrific Broth
Tab.	Tabelle
Taq	Thermophilus aquaticus
TBSE	Tris-Saline mit EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF	Transforming Growth Factor
TGF β RI/II	TGF β Rezeptor TypI/II
Tris	Tris-Hydroxymethylaminoethan
U	Unit
ÜNK	Übernachtkultur
V	Volt
Vol.	Volumen
ZPA	Zone der polarisierenden Aktivität

2.2 Chemikalien und Enzyme

2.2.1 Laborchemikalien wurden von den Firmen Merck, Roth, Sigma in den Reinheitsgraden „reinst“ oder „zur Analyse“ bezogen.

2.2.2 Die verwendeten Enzyme wurden bei den folgenden Firmen bestellt:

Restriktionsenzyme	Gibco, MBI Fermentas, New England Biolabs, Stratagene
T4-DNA-Ligase	Boehringer (Mannheim) Promega NEB
T4-Polynukleotid-Kinase	MBI Fermentas NEB Boehringer (Mannheim)
Shrimps Alkaline Phosphatase	USB
RNase A	Roth

2.3 Lösungen, Medien und Puffer

Alle verwendeten Lösungen, Medien und Puffer wurden, soweit nicht erwähnt, nach Sambrock et al., 1989 hergestellt.

2.4 Bakterienstämme

Escherichia coli JM 109

Genotyp: F' traD36 proAB⁺ lacI^q
lacZΔM15 Δ(pro-lacAB) supE44
hsdR17 recA1 gyrA96 thi endA1
relA1 λ⁻

Escherichia coli M15

Genotyp: C600 r⁻ ΔlacM15

Escherichia coli BL21DE3

BF⁻ dcm ompT hgdS(r⁻_Bm⁻_B) galλ
(DE3)

2.5 Oligonukleotide

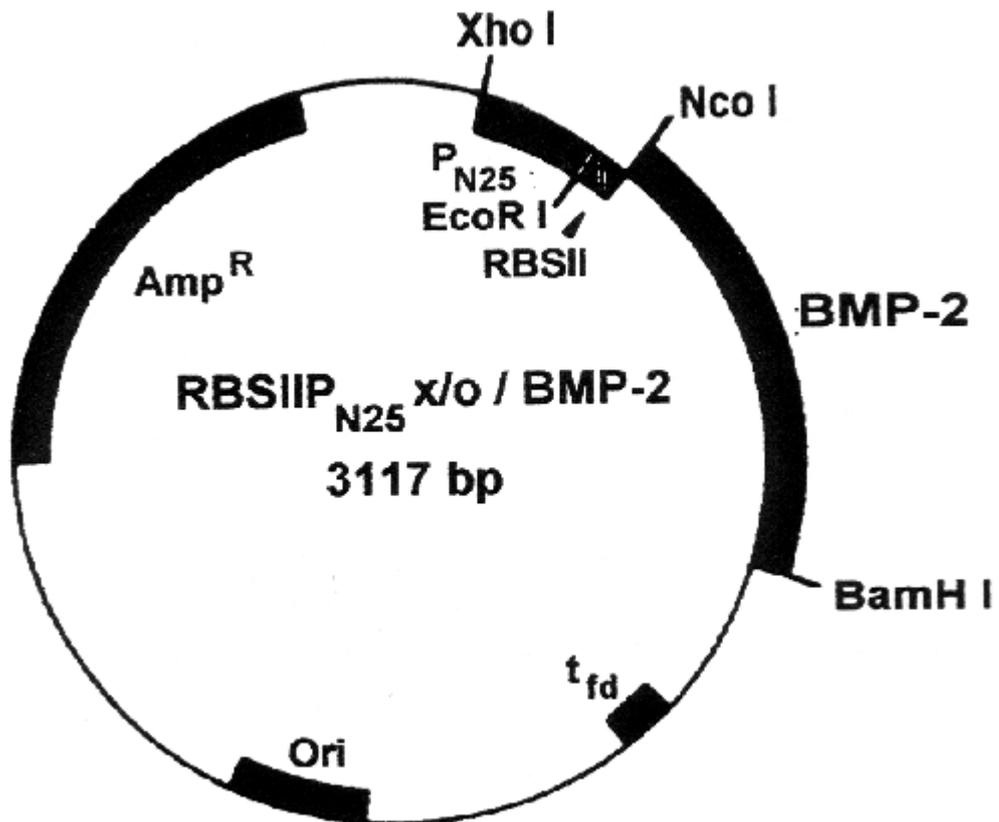
Die Oligonukleotide wurden von der Firma Interactiva (Ulm) bezogen.

T1	T1-P1	CATGGCTCAAGCCACCTCCTCCCAGCGGAAACGCC
	T1-P2	TTAAGGCGTTTCCGCTGGGAGGAGGTGGCTTGAGC
T2	T2-P1	CATGGCTCAAGCCAAACACAAACAGACCTCCTCCC
	T2-P2	TTAAGGGAGGAGGTCTGTTTGTGTTTGGCTTGAGC
T12	T12-P1	CATGGCTCAAGCCACCTCCTCCCAGACTTCTTCTC
	T12-P2	TTAAGAGAAGAAGTCTGGGAGGAGGTGGCTTGAGC
T3	T3-P1	CATGGCTCAAGCCAAACACAAACAGCGGAAACGCGCTCGTAAACG TC
	T3-P2	TTAAGACGTTTACGAGCGCGTTTCCGCTGTTTGTGTTTGGCTTGA GC
T4	T4-P1	CATGGCTCAAGCCAAACACAAACAGCGGAAACGCGCTAAGCATAA GC AACGTAAGCGTC
	T4-P2	TTAAGACGCTTACGTTGCTTATGCTTAGCGCGTTTCCGCTGTTTGT G TTTGGCTTGAGC
GLY	GLY-s	CATGGCTCAAGCCGGTGCTGCTCAGCGGAAACGCC
	GLY-a	TTAAGGCGTTTCCGCTGAGCAGCACCGGCTTGAGC
EX	EX-s	CATGGCTCAAGCCAAATCCAAACAGCGGTCCCGCC
	EX-a	TTAAGGCGGGACCGCTGTTTGGATTTGGCTTGAGC

2.6 Vektoren

pN25R2/BMP

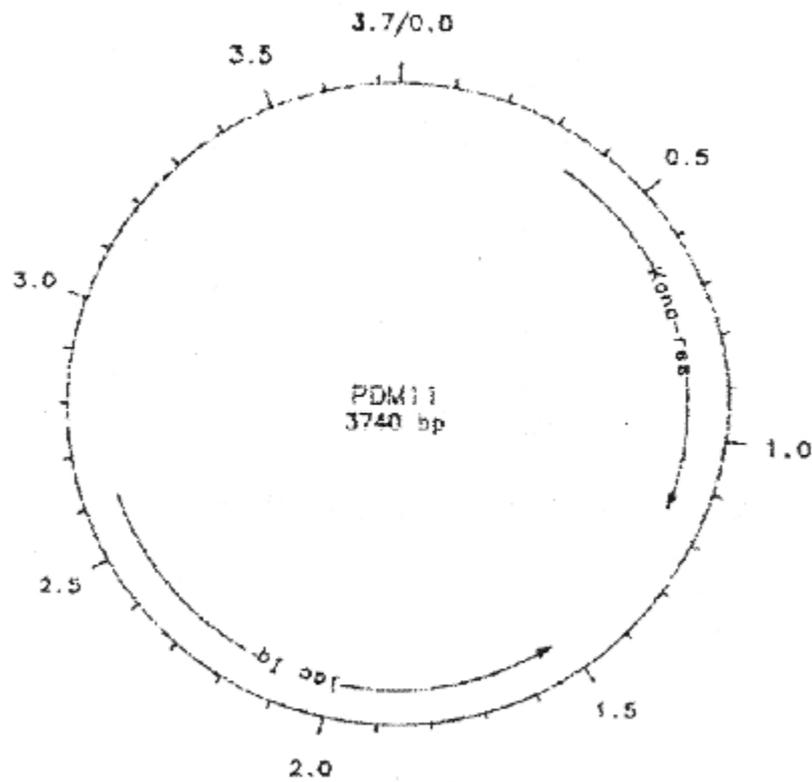
In den Expressionsvektor RBSIIP_{N25}X/o (Stueber et al., 1984) wurde die amplifizierte cDNA von BMP-2 nach vorherigem Schneiden mit den Restriktionsenzymen NcoI und BamHI einkloniert (Ruppert, R., Doktorarbeit). Auf der Vektor-DNA liegt das Gen für die Ampicillin-



Resistenz. Die bakterielle Expression steht unter der Kontrolle des lac-Operators.

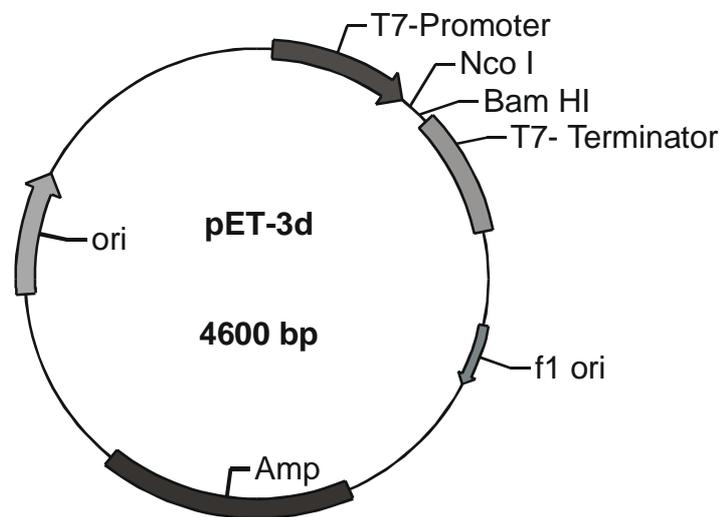
PDMI,1

Das Repressorplasmid pDMI,1 trägt das *lacIq*-Gen für den lac-Repressor, der bei der Transformation von pN25RII/BMP für eine kontrollierte Expression nötig ist. Daneben liegt auf ihm das Gen für die Kanamycin-Resistenz.



PET3d

Dieser bakterielle Expressionsvektor enthält einen Promotor für die T7-RNA-Polymerase. Er wird im E. coli-Stamm BL21DE3 eingesetzt, der das Gen für die T7-RNA-Polymerase chromosomal integriert hat. Dieses steht unter der Kontrolle eines lacUV5-Promotorkomplexes und ist durch IPTG induzierbar.



2.7 Mikrobiologische Methoden

2.7.1 Nährmedien

LB-Medium (L)	10 g/l Bacto-Trypton 10 g/l NaCl 5 g/l Bacto-Yeast Extract pH 7.4 mit NaOH eingestellt
TB-Medium	13.3 g/l Bacto-Trypton 26.7 g/l Bacto-Yeast Extract 4.4 ml/l Glycerin (87 %)
10x-Phosphatpuffer	0.17 M KH_2PO_4 0.72 M K_2HPO_4

Die **TB-Lösung** wird aus sterilem TB-Medium und sterilem 10x-Phosphatpuffer im Verhältnis 9:1 hergestellt.

LB Platten:	500 ml LB Medium 7,5 g Agar-Agar
-------------	-------------------------------------

Nach Autoklavieren abkühlen lassen auf Handwärme und nach Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin die Platten gießen.

2.7.2 Sterilisieren

Die beschriebenen Nährmedien, alle verwendeten Puffer und Kunststoffgefäße werden für 20 min. bei 121°C und 1.1 bar autoklaviert (Dampfsterilisator) und

alle für die Bakterienkultur verwendeten Pipetten, Glasgefäße und anderes Glaszubehör werden für 6 h bei 180° C im Heißluftschrank sterilisiert.

2.7.3 Kulturbedingungen

Aus einer Glycerin-Stammkultur (2.7.4.2) wird ein Ausstrich auf einer Agar-Platte angelegt und über Nacht bei 30°C oder 37°C inkubiert. Mit einer gepickten Einzelkolonie eines Klons kann nun Medium angeimpft werden. Optimale Wachstumsbedingungen für die Vermehrung der Bakterien sind Temperaturen von 37°C unter Schütteln. Von dieser Kultur können wiederum größere Kulturen angeimpft werden.

2.7.4 Konservieren von Bakterienkulturen

2.7.4.1 Kurzzeitige Konservierung

Für eine Konservierung einer Bakterienkultur für wenige Wochen werden Bakterien auf Agarplatten ausgestrichen, über Nacht bei 30°C oder 37°C inkubiert und anschließend bei 4°C gelagert.

2.7.4.2 Langfristige Konservierung

Um die Bakterienkultur über Jahre hinweg zu konservieren, werden 1-3 ml einer bis zu einer OD550 von 0,8 herangewachsenen Kultur bei 3000 rpm für 10 min. abzentrifugiert, das Zellsediment in 2 ml Medium resuspendiert und mit 2 ml sterilem Glycerin (87 %) versetzt. Diese Stammkultur wird bei -20°C aufbewahrt.

2.7.5 Herstellung kompetenter Zellen

2.7.5.1 Herstellung elektrisch kompetenter Zellen

Ein Klon des E. coli-Stammes wird zunächst in einer 50 ml-LB-Übernachtskultur kultiviert. Am Morgen werden 4 x 500 ml LB-Medium mit jeweils 5 ml dieser Kultur angeimpft und unter Schütteln bei 37° C bis zu einer OD550 von 0,5 inkubiert. Nach 30 min. Inkubation auf Eis, werden die Bakterien durch Zentrifugation sedimentiert (4000 rpm, 4° C, 20 min.). Die sedimentierten Bakterien werden nun mit 1000 ml, nach zwei weiteren Zentrifugationsschritten, mit jeweils 500 ml und 25 ml eiskaltem sterilem 10%igem Glycerinpuffer resuspendiert.

Nach zwei weiteren Wasch-Schritten mit jeweils 25 ml 10%igem Glycerinpuffer werden die Bakterien schließlich in 1 ml Glycerinpuffer aufgenommen. Nun können die Bakterien in gewünschter Menge aliquotiert werden.

2.7.5.2 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Puffer Tfb 1:	1,48 K-Ac
	0.05 g RbCl
	0,74 g CaCl ₂ -2H ₂ O
	5,0 g MnCl ₂ -4H ₂ O

Nach Lösen der Chemikalien in 300 ml H₂O und Einstellen des pH auf 5,8, werden 15 ml Glycerin (86 %) zugegeben und der Puffer mit ddH₂O auf 500 ml aufgefüllt.

ssDNA

33 µg/ml

2.8.1.2 Absorptionsmessung von Proteinlösungen

Wie bei der Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren wird auch zur spektralphotometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration das Absorptionsspektrum zwischen 240 und 320 nm aufgenommen. Bei einer angenommenen Schichtdicke der Küvette von 1 cm bei 280 nm entspricht eine Extinktion von 1.0 einer BMP-2-Konzentration von 1 mg/ml (Edelhoch-Methode; Pace, M. C. et al., 1995).

2.8.2 Enzymatische Behandlung von DNA

2.8.2.1 Einzelstrangphosphorylierung der Oligonukleotide

Die von der Firma Interactiva gelieferten Oligonukleotide liegen lyophilisiert vor. Sie werden in Wasser zu einer Endkonzentration von 100 µM gelöst. Nun wird ein Aliquot dieser Oligolösung auf eine Konzentration von 10 µM mit Wasser verdünnt. Diese Lösung wird zur Einzelstrangphosphorylierung eingesetzt. Dafür werden das Enzym T4-Polynucleotidkinase und der entsprechende Puffer, der das für die Reaktion benötigte ATP bereits enthält, zugegeben. Das anschließende Aneinanderfügen der beiden komplementären Basenstränge, das sog. „Annealing“, erfolgt durch kurzzeitiges Erhitzen auf ca. 95°C und langsames Abkühlen über mehrere Stunden.

2.8.2.2 Der enzymatische Verdau des Vektors

Für die Spaltung der doppelsträngigen Vektor-DNA werden die im einzelnen vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen eingehalten und die entsprechenden 10x Puffer verwendet.

Um eine analytische Spaltung durchzuführen werden 100-500 ng DNA in einem Volumen von ca. 20 µl mit 1-3 U Restriktionsenzym für 1-3 h verdaut.

Für einen präparativen Ansatz werden ca. 10-15 µg DNA und, je nach Art der Restriktionsendonuclease und Anzahl der Schnittstellen, ca. 5 U Enzym zum Ansatz dazugegeben und dieser dann für mindestens 2-3 h bei 37°C inkubiert.

Bei einem Verdau mit nur einem Enzym wird der Vektor zusätzlich durch das Enzym Alkalische Phosphatase dephosphoryliert, um den Anteil an religiertem Vektor möglichst gering zu halten.

Der Erfolg des Enzymverdaus wird durch Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert, da sich geschlossene Plasmid-DNA im Agarosegel anders darstellt als geschnittene DNA (s. 2.8.3).

2.8.2.3 Ligation von Vektor und Oligonukleotid

Ein für den Ligationsvorgang günstiges Verhältnis der Menge (ng) an Vektor-DNA zur Menge an Oligonucleotiden ist 1 : 3.

Nach Zugabe des Enzyms T4-DNA-Ligase und des entsprechenden Puffers wird der Ansatz für 1 h bei Raumtemperatur und anschließend für ca. 8-10 h bei 4° C inkubiert.

2.8.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

2.8.3.1 Analytisches Gel

Laufpuffer:	40 mM Tris-Acetat pH 8.2, 20 mM NaOAc, 1 mM EDTA
EtBr:	5 mg/ml Ethidiumbromid
6x Stop:	0.25 % (w/v) Bromphenolblau, 0.25 % (w/v) Xylencyanol FF, 40 % Saccharose in Wasser

Die Agarose-Gelelektrophorese wird u.a. zur Kontrolle nach Verdau mit einer Restriktionsendonuklease verwendet. Plasmid-DNA, die mit einem Restriktionsenzym geschnitten wurde, liegt entweder in linearisierter Form vor, wenn im Vektor nur eine Schnittstelle für dieses Enzym vorhanden ist, oder als mehrfach geschnittene DNA in Fragmenten erwarteter Zahl und Größe vor. Die mit Hilfe der aufgetragenen Größenstandards HMS und LMS abgeschätzte Größe der DNA-Fragmente kann als Kontrolle für den Restriktionsvorgang genommen werden.

Eine weitere Funktion dieses Agarose-Gels ist auch die Mengenabschätzung der aufgetragenen DNA mit Hilfe eines Markers.

HMS in bp	LMS in bp
23130	1608
9416	1201
6682	999
4361	711
2322	567
2027	517

564	396
125	360
	222/219/214
	132/120/112
	75/65/36/27

Tabelle 2-1 DNA-Größenstandards:**HMS: λ -Phagen-DNA, HindIII gespalten****LMS: pBR322, AluI gespalten**

Die Agarosekonzentration wird abhängig von der Länge der aufzutrennenden DNA gewählt. Die Agarose wird in Laufpuffer aufgeköcht und bei 65°C aufbewahrt. Nach Zugabe von 1/10 000 Vol. Ethidiumbromid wird die Agaroselösung in einen horizontalen Gelschlitten gegossen. Durch Einstecken eines Kammes werden Taschen für die aufzutragende DNA geformt. Die DNA-Proben werden mit 1/6 Vol. 6x Stop versetzt und nach kurzzeitigem Erhitzen auf 65°C in die ausgehärteten Agarose-Taschen pipettiert. Durch Anlegen einer Spannung wird ein Wandern der negativ geladenen DNA in Richtung der positiv geladenen Anode ausgelöst. Die Trennung nach der Größe erfolgt aufgrund der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit der verschieden langen DNA-Fragmente und kann mit Hilfe der beiden mit aufgetragenen Marker HMS und LMS zu einer relativ genauen Längenbestimmung führen. Durch das Ethidiumbromid kann die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht und photographiert werden.

2.8.3.2 Präparatives LMP-Agarose-Gel

Laufpuffer: 1x Tris-Acetat

Aufgrund von aufwendigen Reinigungsschritten bei Verwendung des unter 2.8.3.1 beschriebenen Agarosegels im präparativen Ansatz wird hierfür die low-melting-point-Agarose verwendet. Bei einem präparativen Gel wird durch den Kamm eine größere Tasche gebildet, um eine größere Menge an geschnittener DNA zu erhalten, die dann für die weiteren Klonierungsschritte verwendet wird. Die Ausführung entspricht der unter 2.8.3.1 beschriebenen Methode mit dem Unterschied, dass die Agarose aufgrund ihres niedrigeren Schmelzpunktes bei einer Temperatur von 4°C ausgehärtet werden muss. Die gewünschte DNA-Bande wird nach dem Sichtbarmachen mit UV-Licht ausgeschnitten und kann direkt, ohne Entfernung der mit ausgeschnittenen Agarose, weiterverwendet werden.

2.8.4 Analytische Plasmidpräparation – die Miniprep

Lösung 1:	25 mM Tris/HCl (pH 8.0), 50 mM Glucose, 10 mM EDTA (pH 8.0)
Lösung 2:	0.2 N NaOH, 1 % SDS
Lösung 3:	3 M KOAc (pH 4.8)

Die analytische Plasmidpräparation wird zur Gewinnung kleiner Mengen an Vektor-DNA durchgeführt, wie z.B. zur Basensequenzierung benötigt wird. Dazu werden 3 ml einer Bakterienkultur angeimpft und ca. 12-16 h bei 37°C inkubiert. Davon werden, je nach benötigter Plasmidmenge 1.5-2.5 ml in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß bei RT abzentrifugiert (10 000 rpm, 1 min.) und in 200 µl Lösung 1 resuspendiert. Nach kurzem Schütteln wird 300 µl Lösung 2 dazugegeben, um die Bakterien zu lysieren, und 5 min. auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl Lösung 3, die zur Neutralisierung dient, wird wieder 5 min.

auf Eis inkubiert. Anschließend wird 10 min. bei 10 000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Verdau mit RNase wird durch Zugabe von Phenol und Tris die DNA in der oberen Phase von den restlichen Bestandteilen in der unteren Phase getrennt. Nach mehrmaliger Reinigung mit Ethanol wird die DNA mit 0,6 Vol. Isopropanol gefällt. Nach weiterem Waschen mit Ethanol wird die DNA getrocknet und in 20 µl H₂O aufgenommen.

2.8.5 Präparative Plasmidpräparation – die Maxiprep

Säule: NUCLEOBOND AX 500 (Macherey-Nagel, Düren)

S1-Puffer: s. Lösung 1

S2-Puffer: s. Lösung 2

S3-Puffer: s. Lösung 3

N2-Puffer: 100 mM Tris, 15 % EtOH, 900 mM KCl auf pH 6.3 mit H₃PO₄

N3-Puffer: 100 mM Tris, 15 % EtOH, 1150 mM KCl auf pH 6.3 mit H₃PO₄

N5-Puffer: 100 mM Tris, 15 % EtOH, 1000 mM KCl auf pH 8.5 mit H₃PO₄

Um größere Mengen Plasmid-DNA zu gewinnen, werden 200 ml einer Bakterienkultur angezüchtet und die DNA mit einer AX 500-Säule mit einer Kapazität von 500 µg gewonnen.

Die Bakterienkultur wird, nach Wachstum über Nacht, abzentrifugiert, das Pellet in 12 ml S1-Puffer resuspendiert. dazu werden 12 ml S2-Puffer zum Aufschluss der Bakterien zugegeben, leicht gemischt und für 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe des S3-Puffers wird die Suspension 15 min. bei 4°C inkubiert, 10 min. bei Raumtemperatur zentrifugiert (5000 rpm) und anschließend auf die bereits mit N2-Puffer equilibrierte NUCLEOBOND AX 500-Säule geladen. Es wird zweimal mit N3-Puffer gewaschen und die DNA mit N5-Puffer eluiert. Die gereinigte DNA wird nun noch mit 0.7 Vol. Isopropanol gefällt, bei 4°C und 10 000 rpm zentrifugiert und mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach Trocknung wird sie in H₂O aufgenommen und ihre Konzentration durch Absorptionsbestimmung bei 260 nm ermittelt.

2.8.6 DNA-Sequenzierung

Gerät: DNA-Sequenzer Applied Biosystems, Modell 373A

Die Sequenzierungen der klonierten DNA-Konstrukte wurden freundlicherweise von Herrn Wolfgang Hädelt übernommen.

Es wurde die von Sanger et al. 1977 beschriebene „Kettenabbruch-Methode mit Didesoxynucleotiden“ verwendet, bei der die Didesoxynucleotide mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind, die bei unterschiedlichen Wellenlängen ihr Absorptionsmaximum haben. Die durch anknüpfen der Didesoxynucleotide entstandenen Kettenabbruchfragmente werden in einem 12 % (w/v) Polyacrylamidgel mit 8.3 M (w/v) Harnstoff aufgetrennt. Durch Laserabtastung werden die Fluoreszenzfarbstoffe angeregt und ihre Absorption bestimmt.

Nach der Matrizenberechnung der Molekulargewichte der einzelnen Fragmente kann die Basensequenz bestimmt werden.

2.9 Expression von rekombinanten Proteinen in E.coli

2.9.1 Analytische Proteinexpression

Medium: TB mit Antibiotikum-Zusatz
Probenpuffer: 62.5 mM Tris/HCl (pH 6.8), 2 % SDS, 20 % Glycerin
(87 %)
2 % Bromphenolblau

Für eine analytische Expression rekombinanter Proteine wird eine Übernachtskultur von Bakterien im Maßstab 1:200 mit TB-Medium verdünnt und diese Kultur für 1.5 h in 37°C wachsen gelassen. Dann wird IPTG in einer

Endkonzentration von 1 mM zugegeben. Als Kontrolle werden von jedem Klon jeweils zwei Kulturen angelegt, von denen nur eine mit IPTG versetzt wird. Nach weiteren 2 h Wachstum werden die Zellen abzentrifugiert, das Zellpellet in 25 μ l Probenpuffer aufgenommen und die Expression durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert.

2.9.2 Präparative Proteinexpression

Medium: TB/Antibiotikum
TBSE-Puffer: 10 mM Tris/HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1mM EDTA,
0.5 ml β -Mercaptoethanol, 0.5 ml 0.5 M PMSF

In drei 2l-Erlenmeyerkolben mit jeweils 800 ml TB-Medium und Ampicillin (Endkonzentration 100 μ g/ml) wird jeweils 20 ml einer Übernachtskultur dazugegeben. Diese Kultur wird bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₅₅₀ von ca. 0.8 heranwachsen gelassen. Nach Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1mM wird die Kultur weitere 3 h bei 37°C inkubiert und dann geerntet (Zentrifugation bei 7000 rpm, 15 min., 4°C, JA-10-Rotor)
Das Zellpellet wird mit TBSE-Puffer resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Die Feuchtausbeute der Zellen wird bestimmt. Nun kann das Zellpellet entweder bei -80°C für kurze Zeit oder in flüssigem Stickstoff eingefroren werden

2.9.3 Präparation der „inclusion bodies“

Das bei der präparativen Proteinexpression gewonnene Zellpellet wird nun in eisgekühltem TBSE-Puffer resuspendiert und die Bakterien durch zweimalige

Ultraschallbehandlung (300 W, 5 min.) aufgebrochen, um das in den Zellen in Form unlöslicher Einschlusskörperchen vorliegende Protein zu erhalten. Nach jeder der beiden Ultraschallbehandlungen wird die Suspension jeweils 30 bzw. 20 min. bei 4°C mit 11 500 rpm zentrifugiert und anschließend mit TBSE-Puffer resuspendiert.

Nach einem weiterem Zentrifugationsschritt und Bestimmung des Feuchtgewichtes der inclusion bodies erfolgt die Vorextraktion, bei der das Pellet an inclusion bodies in 50 mM NaAc-Puffer (pH 5.0) mit 0,6 M Guanidiniumhydrochlorid und 1 mM EDTA im zehnfachen Volumen zur Feuchtausbeute resuspendiert und 20 min. bei RT gerührt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt erfolgt die Hauptextraktion, bei der das Pellet in 50 mM NaAc (pH 5.0), 6 M Guanidiniumhydrochlorid und 0,1 EDTA im zehnfachen Volumen zum erneut bestimmten Feuchtgewicht resuspendiert, mit 1/1000 Vol. β -Mercaptoethanol versetzt und bei Rt über Nacht gerührt wird.

2.9.4 Chromatographische Reinigung von Proteinen

2.9.4.1 Sephacryl-S300 Gelfiltrationschromatographie

Säule:	Pharmacia XK 50/100, 650 ml Säulenvolumen
Säulenmaterial:	Sephacryl-S300 High Resolution (Pharmacia) Trennbereich 10-1500 kD
Pumpe:	LKB 2232 Microperpex S Peristaltic Pump, Einstellung 243
Detektion:	LKB 2238 Uvicord, Linear Instruments Recorder
Probensammler:	ISCO Retriever II
Laufpuffer:	6 M GuCl, 50 mM NaAc, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 5.0

Nach der Hauptextraktion wird die Probe zunächst 1 h in der Ultrazentrifuge (Beckmann-Ultrazentrifuge, 30 000rpm, 18°C, Deceleration 9, 45 Ti-Rotor) zentrifugiert und anschließend filtriert, damit die Säule nicht verstopft. Zunächst wird die Säule mit dem Laufpuffer equilibriert, dann wird die Probe aufgetragen. Die Elution des Proteins erfolgt mit dem Laufpuffer und wird mit Hilfe eines Durchflußphotometers, an den ein Schreiber angeschlossen ist, dokumentiert. Die Fraktionen werden durch einen Fraktionssammler aufgefangen und photometrisch durch Absorptionsmessung bei 280 nm deren Proteingehalt bestimmt. Die proteinenthaltenden Fraktionen werden vereinigt und die Gesamtproteinmenge ebenfalls photometrisch bestimmt.

2.9.4.2 CM-Sepharose-Chromatographie

Säule:	O 3.0 x 10 cm
Säulenmaterial:	CM-Sepharose fast flow (Pharmacia)
Pumpe:	LKB 2232 Microperex S Peristaltic Pump
Detektion:	LKB 2238 Uvicord, LKB 2210 Recorder
Probensammler:	ISCO Retriever II
Puffer 1:	50 mM NaAc (pH 5.0), 30 % Isopropanol
Puffer 2:	50 mM NaAc (pH 5.0), 30 % Isopropanol, 1 M NaCl

Bei der CM-Sepharose Chromatographie handelt es sich um einen schwachen Kationenaustauscher. Das Prinzip des Kationenaustauschers beruht auf der Konkurrenz positiv geladener Proteine und positiv geladener Ionen um Bindungsstellen an der Säule. Daher kann das Protein durch einen Elutionspuffer, der positiv geladenen Ionen enthält, eluiert werden.

Zunächst werden zwei Säulen mit 20 ml Puffer 1 gefüllt und jeweils 7 ml des CM-Sepharose-Säulenmaterials (in Puffer 1 equilibriert) dazugegeben. Dieses setzt sich am Boden der Säule ab. Der Renaturierungsansatz, der wie unter 2.8.5. beschrieben zusammengestellt wird, wird nun nach Zentrifugation (Beckmann, 9000 rpm, 20 min., 4°C) und Zugabe von Isopropanol in einer Endkonzentration von 30 % auf die Säule aufgetragen. Ist das gesamte Volumen aufgetragen, werden beide Säulenvolumina vereinigt.

Für die Elution wird ein automatischer Gradientenmischer angeschlossen, durch den zunächst nur Puffer 1 und dann ein stetig steigender Anteil an Puffer 2 bei gleichzeitig fallendem Anteil an Puffer 1 auf die Säule gepumpt werden kann. So steigt die Konzentration von 0-1 M NaCl linear an, wodurch die an die Säule gebundenen Proteine eluiert werden. Mit Hilfe eines Fraktionssammlers

wird das Eluat aufgefangen und die Proteinmenge durch ein angeschlossenes Durchflußphotometer bei 280 nm vermessen. Die Proteinmenge der vereinigten Proben wird am Spektrophotometer ermittelt.

2.9.4.3 Fractogel EMD Chromatographie – die FPLC-Säule

Säule:	MERCK Superformance 150 x 10 mm, Säulenvolumen 12 ml
Säulenmaterial:	Fractogel EMD SO3-650 (S) (20-40 µm)
Pumpe:	MERCK Hitachi Intelligent Pump L 6210
Detektion:	UV Monitor Gamma LCD 500, Linear Instruments Recorder
Probensammler:	Gilson 203
Flussrate:	1 ml/min.
Niedrigsalzpuffer:	50 mM NaAc (pH 5.0), 30 % Isopropanol
Hochsalzpuffer:	50 mM NaAc (pH 5.0), 30 % Isopropanol, 2 M NaCl

Die vereinigten proteinenthaltenden Fraktionen der CM-Säule werden nach Dialyse gegen das 100fache Volumen H₂O über Nacht auf die FPLC-Säule aufgetragen. Bei dem in der FPLC-Säule verwendeten Säulenmaterial handelt es sich um einen starken Kationenaustauscher.

Die Säule wird zunächst mit Niedrigsalzpuffer equilibriert. Die Probe wird aufgetragen, nachdem sie mit dem äquivalenten Volumen 100 mM NaAc (pH 5.0), 60 % Isopropanol zu einer Endkonzentration von 50 mM NaAc (pH 5.0), 30 % Isopropanol versetzt worden ist.

Nach Auftragen der Probe wird die Säule wiederholt mit Niedrigsalzpuffer nachgewaschen. Anschließend erfolgt die Elution durch eine linearen NaCl-

Gradienten, der mit Hilfe des zugegebenen Hochsalzpuffers aufgebaut wird. Die Fraktionen werden mit einem automatischen Probensammler (1.5 ml/Fraktion) aufgefangen und anschließend photometrisch bei 280 nm vermessen.

2.9.5 Renaturierung der Proteine

Renaturierungsansatz:

- 0.3 M Guanidiniumchlorid
- 50 mM Tris/HCl (pH 8.0)
- 1 M NaCl
- 10 mM CHAPS
- 1 mM Cystamin
- 2 mM Cysteamin

Nach Vereinigen des Proteinanteils von der S300-Säule liegt das Protein noch in denaturierter Form vor. Um die Renaturierung der Proteine zu ermöglichen, wird das S300-Eluat zu dem Renaturierungsansatz gegeben. Das Volumen wird so gewählt, dass die Proteinkonzentration im Ansatz 0.2 mg/ml beträgt und die GuCl-Konzentration unter 0.3 M liegt.

Der Renaturierungsvorgang erfolgt unter ständigem Rühren bei RT für 5 d.

2.9.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Acrylamidlösung:	30 % Acrylamid, 0.8 % N, N'-Methylenbisacrylamid Lösung wird nach dem Filtrieren bei 4°C gelagert
4 x Lower Tris:	1.5 M Tris/HCl (pH 8.8), 0.4 % SDS
4 x Upper Tris:	0.5 M Tris/HCl (pH 6.8), 0.4 % SDS
SDS-Laufpuffer:	25 mM Tris/HCl (pH 8.6), 190 mM Glycin, 0.15 % SDS
SDS-Probenpuffer:	62.5 mM Tris/HCl (pH 6.8), 2 % SDS, 20 % Glycerin (87 %), 22 % BPB für reduzierenden SDS- Probenpuffer wird 2 % β -Mercaptoethanol zugesetzt
Coomassie-Blau:	0.25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 gelöst in einer Lösung aus MeOH : H ₂ O : Essigsäure 5 : 5 : 1
Entfärbelösung:	H ₂ O : Isopropanol : Essigsäure 8 : 1 : 1

Die Lösungen für Trenn- und Sammelgel werden nach dem folgenden Pipettierschema zusammengegeben:

Stammlösungen	Sammelgel	Trenngel	
		12 %	15 %
Acrylamidlösung	0.25 ml	2 ml	2.5 ml
4 x Upper Tris	0.62 ml		
4 x Lower Tris		1.25 ml	1.25 ml
H ₂ O	1.6 ml	0.75 ml	0.25 ml
Glycerin		1 ml	1 ml
40 % APS	6 µl	7 µl	10 µl
TEMED	6 µl	7 µl	10 µl

Zunächst wird das Gel zwischen zwei Glasplatten gegossen, indem der Zwischenraum zunächst bis ca. 1 cm unter den Rand mit Trenngel gefüllt und dann bis zum Oberrand mit Wasser aufgefüllt wird, um einen waagrechten Abschluss zu erhalten. Nach Aushärten des Trenngels wird das Wasser abgegossen und der Zwischenraum bis zum Oberrand mit Sammelgel aufgefüllt, in das ein Kamm zur Bildung von Taschen gesteckt wird.

Die Proteinproben werden im Verhältnis 1:1 mit SDS-Probenpuffer vermischt. Vor dem Auftragen wird im Fall des reduzierenden Probenpuffers zur vollständigen Denaturierung des Proteins die Probe zunächst für 5 min. aufgekocht. Die Glasplatten mit dem Gel werden in die Gelkammer gestellt und nach Zugabe von Laufpuffer werden die Proteine durch Anlegen einer Spannung (200 V) der Größe nach aufgetrennt.

Anschließend wird das Gel 30 min. in einer Coomassie-Blau-Lösung gefärbt und mehrere Stunden in Entfärbelösung geschwenkt bevor es zum Trocknen in einen Rahmen zwischen zwei Folien gespannt wird.

2.10 Zellkultur

2.10.1 Sterilisieren

Thermostabile Lösungen werden autoklaviert (20 min., 121°C, 1.1 bar); Kulturmedien und thermolabile Lösungen werden sterilfiltriert; Glasgefäße und Präparierbestecke werden 6 h bei 180°C im Heißluftschrank sterilisiert.

2.10.2 Kultivierung der adhärent wachsenden C2C12-Zellen

2.10.2.1 Auftauen von Zellen

Die Zellen werden bei 37°C möglichst rasch aufgetaut. Nach Überführen in ein 50 ml Greiner Röhrchen wird mit im 37°C-Wasserbad vorgewärmten Medium auf 50 ml aufgefüllt und die Zellen 10 min. bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellsediment wird in frisches, ebenfalls vorgewärmtes, Medium aufgenommen, vorsichtig resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

2.10.2.2 Kulturbedingungen der C2C12-Zellen

Zelllinie: Maus-Myoblasten-Zelllinie C2C12 (ATCC Number CLR 1772)

Kulturmedien:

DMEM-Medium: nach Herstellerhinweis (Gibco Nr. 31600)
3.7 g/l NaHCO₃ (pH 7.0-7.4), sterilfiltriert
mit Penicillin/Streptomycin-Zusatz (Endkonzentrationen:
Penicillin 1 U/ml; Streptomycin 1 µg/ml)

Kulturmedium I: 10 % FCS
1 l DMEM-Medium
4.5 g/l Glucose
5 mM Glutamin

Kulturmedium II: 2 % FCS
1 l DMEM-Medium
4.5 g/l Glucose
5 mM Glutamin

Lösungen für den Alkalische Phosphatase-Test

PBS-Puffer: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄,
1.5 mM KH₂PO₄

2 x Trypsinlösung: 274 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 16.2 mM Na₂HPO₄,
2.9 mM KH₂PO₄, 1.4 mM EDTA, 1 g/l Trypsin (Seromed)
sterilfiltriert

PNPP-Lösung: 20 mg/ml p-Nitrophenylphosphat

Material und Methoden

Alk. Lysispuffer I: 0.1 M Glycin (pH 9.6)
1 % NP-40
1 mM MgC₁₂
1 mM ZnC₁₂

Alk. Lysispuffer II: 0.1 M Glycin,
1 mM MgC₁₂
1 mM ZnC₁₂

Die Kultivierung der Zellen erfolgt in Plastik-Kulturplatten und -flaschen (Greiner, Falcon).

Die Zellen werden in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

Sobald die Zellen konfluent sind, müssen sie entweder in eine größere Flasche überführt werden oder ein Teil davon in einer neuen Flasche mit frischem Medium verdünnt werden, da die Zellen durch Überwachsen ihre spezifischen Eigenschaften verlieren können. Zunächst wird dafür das Medium abgesaugt, die adhärent am Boden festgewachsenen Zellen durch Zugabe von 2 x Trypsin gelöst, und dann entsprechend dem weiteren Verfahren frisches Medium zugegeben. Um die Zelldichte bestimmen zu können, werden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Dies ist für das Einhalten definierter Versuchsbedingungen notwendig. Dazu wird ein Aliquot der Zellen entnommen und im Verhältnis 1 : 1 mit 0.5 %iger Trypanblaulösung (in PBS, Biochrom) versetzt. Es handelt sich dabei um eine Färbung, bei der nur die toten Zellen blau angefärbt werden.

Zur Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase als Marker für eine osteoblastäre Differenzierung wird in dem im Folgenden beschriebenen Testsystem eine Konzentration von 1.5×10^5 Zellen/ml eingestellt und von

dieser Zellsuspension je 200 μl (entspricht ca. 0.3×10^5 Zellen) in ein „well“ einer „96-well-plate“ (ELIZA-Platte) pipettiert. Nun werden die Zellen für ca. 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert, damit sie am Boden anwachsen. Nach dieser Zeit wird das Medium abgesaugt und in jedes „well“ 100 μl des Kulturmediums II gegeben, das durch seinen niedrigeren FCS-Anteil von nur 2 % schlechtere Wachstumsbedingungen für die Zellen schafft und die nun gewünschte Differenzierung begünstigt.

Für die osteoblastäre Differenzierung werden nun BMP-2 und BMP-2-Varianten in einer in Zehnerschritten absteigenden logarithmischen Verdünnungsreihe mit Endkonzentrationen von 1 μM bis 1 nM zugegeben.

Nach weiteren 72 h Inkubationszeit unter gleichen Bedingungen wird das Medium abgesaugt und die Zellen in jedem „well“ einmal mit 100 μl PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen durch Zugabe 100 μl des alkalischen Lysispuffers I unter Schütteln bei RT 1 h lysiert. Danach werden 100 μl einer 1 : 1 Mischung aus Lysispuffer II und dem Substrat des Enzyms Alkalische Phosphatase PNPP zugegeben. Es findet durch Umsetzung des Substrates in sein Produkt eine Farbreaktion statt, die im ELISA-Reader (ELISA-reader Dynatech MR 5000, Guernsey Channel Islands) durch Absorptionsbestimmung der Lösung in jedem einzelnen „well“ bei 405 nm quantifiziert werden kann.

2.10.3 Der Limb Bud Test

2.10.3.1 Präparation von embryonalen Zellen der Hühnergliedmaßenknospen

PBS: 120 mM NaCl, 2 mM KCl, 3 mM KH_2PO_4 , 7 mM NaH_2PO_4
(pH7.3)

Medium: Coon`s F-12 + 5 % FCS

Die Hühnereier, die zunächst 7 d in einer Brutmaschine (Janeschlitz, Modell 2000) bebrütet werden (bis zum „Hamilton stage“ 26-28), werden in einer Sterilbank aufgeschlagen und das Innere in eine große Petrischale gegeben. Durch rasches Abziehen des Embryokopfes vom Körper werden sie schnell getötet und anschließend die Gliedmaßenknospen abpräpariert und in PBS gegeben. Nach Entfernen des PBS werden sie für 30 min. bei RT in 2 ml 0.1 % Trypsin/0.1 % Kollagenase in PBS inkubiert. Nun wird die Trypsin/Kollagenaselösung entfernt und die Gliedmaßenknospen zweimal mit Medium gewaschen. Mit einem Glasstempel werden sie durch Nitex-20 Gaze gedrückt, um einzelne Zellen zu erhalten. Nach erneutem Waschen der Zellen mit Medium werden sie abzentrifugiert (1000 rpm, 10 min.), wieder in Medium resuspendiert und durch Zählen in der Neubauer-Zählkammer kann ihre Zellzahl auf 1×10^7 Zellen/ml eingestellt werden. Sie werden sofort für den Test verwendet.

2.10.3.2 Messung der Proteoglycansynthese von embryonalen Zellen der Hühnergliedmaßenknospe

Verdünnungspuffer:	50 mM NaOAc pH 5.8, 0.5 % Triton X-100
Waschpuffer:	50 mM NaOAc pH 5.8, 0.1 M Na ₂ SO ₄ , 50 mM MgCl ₂
Alcian-Blau-Lösung:	0.2 % Alcian Blau in 50 mM NaOAc pH 5.8, 85 mM MgCl ₂

Jeweils 20 µl der isolierten Zellen (2.9.3.1) werden in die Mitte eines „wells“ einer 24-well-plate pipettiert. Sie werden nun 1 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert, um sie adhären zu lassen. Zu den adhären Zellen werden jeweils 1 ml Medium mit verschiedenen Konzentrationen an BMP-2 und BMP-2-Varianten zugegeben.

Nach einer Inkubationszeit von 4 d bei 37°C und 5 % CO₂ werden 30 µCi Na₂³⁵SO₄ pro ml Medium hinzugefügt und daraufhin die Inkubation für weiter 6 h fortgesetzt.

Nach zweimaligem Waschen mit PBS bewirkt die Zugabe von 400 µl 6 M GuHCl/50 mM Tris/HCl (pH 7.4) über Nacht eine Lyse der Zellen.

Isoliert werden die Proteoglycane, die nun das ³⁵SO₄ eingebaut haben durch Fällung mit Alcian-Blau in 96-well-plates. Dazu werden zu 75 µl Verdünnungspuffer 25 µl Zellysat und 150 µl Alcian-Blau gegeben. Nach einstündigem Schütteln auf dem ELISA-Schüttler bei RT, werden die Präzipitate mit einem halbautomatischen Zellerntegerät (Scatron 7020 Semiautomatic Cell Harvester) auf Glasfiltermatten (Scatron 11731) gesaugt und die „wells“ zweimal mit Waschpuffer nachgewaschen. Die Glasfiltermatten

werden bei 50°C für 30 min. getrocknet und die ausgefallenen Radioaktivität in einem Raytest Radio-TLC-Analyser RITA-90 (Raytek Scientific Ltd.) gemessen.

2.10.4 Messung der physikalischen Bindungseigenschaften am Biosensor

Gerät: BIAcore TM 2000 (Pharmacia Biosensor AB), Sensor Chip
CM5

HBS-Puffer: 10 mM Hepes (pH 7.5), 0.5 M NaCl, 3.7 mM EDTA

Die Experimente zur Analyse der physikalischen Bindungseigenschaften der BMP-2-Varianten an Heparin wurden an einem BIAcore TM 2000 Biosensor im Multikanalmodus durchgeführt. Die Flussrate betrug 10 µl/min. und die Messungen wurden bei einer Temperatur von 25 °C durchgeführt. Der Sensorchip wurde bei den Versuchen mit dem ALK3-Rezeptor mit Streptavidin und bei der Bindungsanalyse mit Heparin (Sigma, M = 16 000) mit Neutravidin beschichtet, nachdem es vorher biotinyliert wurde.

Die Auswertung der Messdaten zur Bestimmung der Gleichgewichtsbindung, Assoziation- und Dissoziationsrate erfolgte mit Hilfe der Originalsoftware (BIA evaluation 2.1, Software Handbook, 1995; Pharmacia Biosensor AB). Mit Hilfe der Gleichgewichtsreaktion zur Bildung eines Ligand-Rezeptor-Komplexes können die Geschwindigkeitskonstanten berechnet werden (Michaelis-Menten-Gleichung).

3 Resultate

3.1 Kurzbeschreibung des Projektes und Klonierungsstrategie

Beim Vergleich der Proteinsequenzen des reifen hBMP-2 und der BMP-2-Variante EH-BMP-2 fällt vor allem die relative Häufung basischer Seitenketten im N-Terminus des BMP-2 auf, die in zwei Boxen zu je drei Aminosäuren angeordnet sind (Lys 3, His 4, Lys 5 und Arg 7, Lys 8, Arg 9). Ausgehend von der Überlegung, dass die beiden basischen Boxen im heparinbindungsdefizienten EH-BMP-2 fehlen, und damit der Schluss naheliegt, dass sie an der Heparinbindung beteiligt sind, wurden sieben BMP-2-Mutanten entworfen, die den N-Terminus des reifen Proteins durch Austausch und Duplikation dieser Boxen verändern.

Klon	Primer	Anmerkung	Proteinsequenzen
BMP-2			MAQAKHKQRKRLKS
T1	T1-P1	TSS 1.Triplett	MAQATSSQRKRLKS
	T1-P2		
T2	T2-P1	TSS 2.Triplett	MAQAKHKQTSSLKS
	T2-P2		
T12	T12-P1	TSS, beide Triplett	MAQATSSQTSSLKS
	T12-P2		
T3	T3-P1	Verdopplung 1.Triplett	MAQAKHKQRKRARKRLKS
	T3-P2		
T4	T4-P1	Verdopplung 2.Triplett	MAQAKHKQRKRAKHKQRKRLKS
	T4-P2		
GLY	Gly-s	Subst. 1 Tr. GAA	MAQAGAAQRKRLKS
	Gly-a		
EX	EX-s	Subst. 1. und 2. Tr.	MAQAKSKQRSRLKS
	EX-a	2. AS durch S ersetzt	

Tabelle 3-1 Auflistung der Primer und der dazugehörigen Proteinsequenzen der entworfenen BMP-2-Mutanten

Im Fall der Mutante T1 wurde das erste der beiden basischen Aminosäuretripleetts gegen die drei neutralen Seitenketten Thr und Ser ausgetauscht. Die Aminosäuren Thr und Ser wurden gewählt, weil sie ohnehin bereits im N-Terminus von EH-BMP-2 an dieser Stelle vorkommen und diese Variante sich gut exprimieren und renaturieren lässt.

Bei der Mutante T2 wurde entsprechend das zweite basische Triplett und im Fall von T12 beide Triplett gegen Thr und Ser ausgetauscht.

Im Falle der Duplikationsvariante T3 wurde nur die erste der beiden Boxen zur Duplikation herangezogen, in der Mutante T4 sind beide Boxen verdoppelt.

Wie sich im Laufe der Versuchsdurchführung herausstellte, war eine Proteinexpression der Austausch-Mutanten T1, T2 und T12 in E.coli nicht möglich. Es wurden zu einem späteren Zeitpunkt zwei weitere Mutanten entworfen:

Im Fall der Mutante GLY wurde die erste basische Box durch andere neutrale Aminosäuren, Gly und Ala statt Thr und Ser, ersetzt. Um das Problem der fehlenden Proteinexpression möglicherweise auf einzelne Aminosäuren eingrenzen zu können, wurden in der Mutante EX nur noch jeweils die zweite Aminosäure der beiden basischen Triplets durch Ser ersetzt.

Basierend auf der Arbeit von Tuan et al. („Engineering, Expression and Renaturation of Targeted TGF β -Fusion Proteins“, Conn. Tiss. Res. 34, No.1, 1996), in der die Kollagenbindungsstelle des von-Willebrand-Faktors in ein TGF β 1-Fusionsprotein inkloniert wurde, enthält die BMP-2-Mutante KOL diese Kollagenbindungsstelle mit der Aminosäuresequenz W R E P S F C A L S. Das Dekapeptid sollte hinter die Heparinbindungsstelle ebenfalls in den N-Terminus des BMP-2 inkloniert werden.

3.2 Klonierung der BMP-2-Mutanten durch Kassettenmutagenese

Das Prinzip der Kassettenmutagenese beruht auf dem Austausch eines doppelsträngigen DNA-Stückes, das zwischen zwei aufeinanderfolgenden Restriktionsschnittstellen liegt, durch ein anderes DNA-Stück. Bei Vorliegen geeigneter Schnittstellen, die eine solche „Kassette“ begrenzen, können so beliebig lange Nucleotide aus einem Plasmid ausgeschnitten werden und durch

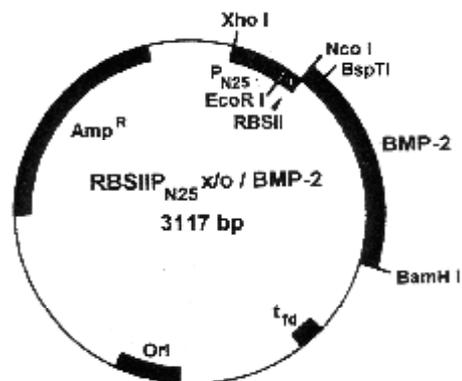
die gewünschte DNA-Sequenz ersetzt werden. Diese wird nach der sog. „high codon usage“ so gewählt, dass unter den verschiedenen möglichen Basentriplets, die für eine Aminosäure codieren, diejenige mit der höchsten Translationshäufigkeit in *E. coli* ausgesucht wird. Auf diese Weise wurden die im Folgenden beschriebenen BMP-2-Varianten rekombinant hergestellt.

3.2.1 Klonierung in den Expressionsvektor RBSIIP N25/ BMP-2

3.2.1.1 Die Primer

Die Vorbereitung der Primer auf die Ligation erfolgt durch Einzelstrangphosphorylierung am 5`OH-Ende der beiden Oligonucleotide mittels des Enzyms T4-Polynucleotidkinase. Nach Vereinigung der Gegenstränge, erfolgt die Basenpaarung der komplementären DNA-Einzelstränge, das Annealing (5 min. bei 95° C und anschließendes Abkühlen auf Raumtemperatur).

3.2.1.2 Der Vektor



Der Expressionsvektor RBSIIP N25/ BMP-2 war bereits kloniert worden, indem sowohl die mittels PCR amplifizierte BMP-2-cDNA als auch der Expressionsvektor RBSIIP N25 x/o mit den Restriktionsendonucleasen NcoI und BamHI geschnitten worden waren (Doktorarbeit, Rainer Ruppert).

3.2.1.3 Die Klonierung im Vektor RBSIIP N25/BMP2

Im BMP-2-Gen des 3117 bp langen Vektors befindet sich, 35 Nukleotide auf die NcoI-Schnittstelle folgend, eine BspTI-Schnittstelle, die damit am C-terminalen Ende der Heparinbindungsstelle liegt. Durch die Methode der Kassettenmutagenese wird nun der Vektor mit den Restriktionsenzymen NcoI und BspTI verdaut und damit ein 35 bp langes Nukleotidstück herausgeschnitten.

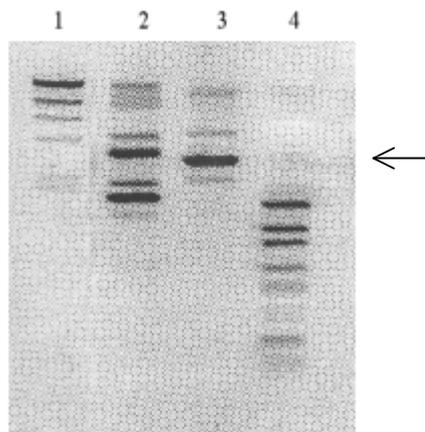


Abbildung 3-1 Kontrolle der Restriktion im 1 % Agarosegel:

Spur 1: HMS

Spur 2: Ungeschnittener Vektor RBSIIP N25/BMP-2

Spur 3: RBSIIP N25/BMP-2 nach Restriktion mit BspTI (3117 bp) (←)

Spur 4: LMS

Auf Spur 2 und 3 sind die Banden des Hilfsvektors pDMI,1 schwach erkennbar.

Durch die anschließende Ligation mit den phosphorylierten und annealten Oligonukleotiden wird die Sequenz, die die jeweils gewünschten Aminosäuren kodiert, in den Vektor inkloniert.

Das Ligationsprodukt wird, wie unter 2.6.6.2 beschrieben, durch Hitzeschock in kompetente Zellen des E. coli-Stammes JM 109 transformiert. Positive Klone können auf mit Ampicillin versetzten Nähragarplatten isoliert werden, da nur die Zellen, die das Plasmid mit dem Gen für die Ampicillin-Resistenz aufgenommen haben, auf einer solchen Platte wachsen können. Die Analyse der präparierten und durch PEG-Fällung aufgereinigten DNA erfolgt durch Sequenzierung mit Hilfe des 5`-Primers P1-D24A.

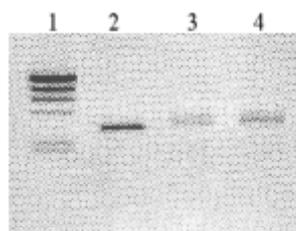


Abbildung 3-2 1 % Agarose-Gelelektrophorese der durch Mini-Präparation gewonnenen BMP-2-Mutanten T3 und T4

Spur 1: HMS

Spur 2: RBSIIP N25/BMP2 nach Restriktion mit BspTI

Spur 3: BMP-2-Mutante T3 nach Restriktion mit BspTI

Spur 4: BMP-2-Mutante T4 nach Restriktion mit BspTI

Eine Probeexpression, wie unter 3.3.3 beschrieben zeigte, dass keine Proteinbildung induziert werden konnte.

Resultate

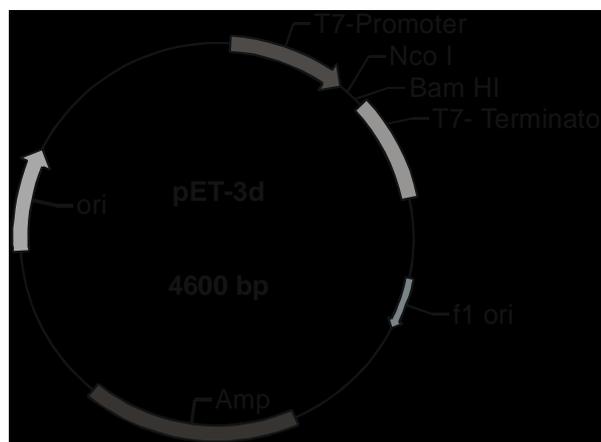
Aufgrund dieser nicht induzierbaren Proteinexpression (siehe unter 3.3.3) wurde das Ligationsprodukt im nächsten Schritt in den elektrisch kompetenten E. coli-Stamm M15 transformiert. Diese Zellen tragen zusätzlich das Hilfsplasmid pDMI,1, das neben dem Gen für die Kanamycin-Resistenz das Gen für das lac-Iq-Repressorprotein trägt.

Das Oligonucleotid der Mutante KOL lässt sich in den nur einfach mit BspTI geschnittenen Vektor einklonieren. Allerdings besteht dabei eine hohe Tendenz zur Religation des Vektors ohne Einfügen des Nucleotids. Diese Gefahr kann durch vorherige Dephosphorylierung an den 5`-Enden des Vektors mit dem Enzym Alkalische Phosphatase (Shrimps Alkaline Phosphatase) vermindert werden.

Aber trotz Verwendung des Enzyms Alkalische Phosphatase und trotz systematischer Änderungen der Versuchsbedingungen konnte in zahlreichen Ansätzen keine erfolgreiche Ligation erreicht werden. Weder durch systematischen Austausch von Ligaseenzym und Ligationspuffer noch durch Variationen der Umgebungstemperatur, Länge der Versuchsdauer und Vorbehandlung der DNA konnte eine erfolgreiche Klonierung erreicht werden. Die Klonierung der Austausch- und Duplikationsmutanten allerdings konnte durch Verifizierung der korrekten Basensequenz bestätigt werden.

3.2.2 Klonierung in den pET3d-Expressionsvektor

Wie unter 3.3.1 beschrieben, konnte im Expressionssystem RBSIIP N25/ BMP-2 keine Proteinexpression der Mutanten T1, T2 und T12 induziert werden. Deshalb wurde eine Umklonierung in das pET3d-Expressionssystem vorgenommen.



Dieses Expressionssystem unterscheidet sich aufgrund seiner hohen Expressionsfähigkeit rekombinanter Proteine von anderen Systemen (Studier, F. W. und Moffatt, B. A., 1986). Für die Umklonierung wurden die durch Mutationen modifizierten BMP-2-Gene, die bereits die korrekte Basensequenz der Mutanten T1, T2 und T12 enthielten, aus dem Expressionsvektor RBSIIP N25/ BMP-2 durch Restriktion mit NcoI und BamHI ausgeschnitten. In einem zweiten Schritt erfolgte dann die Ligation in den ebenfalls NcoI und BamHI verdauten pET3d-Expressionsvektor. Anschließend wurde dann das Ligationsprodukt in kompetente E. coli vom Stamm BL21 (DE3) transformiert. Aber auch in diesem Expressionssystem konnte keine Proteinexpression erreicht werden.

3.3 Expression der BMP-2-Mutanten

3.3.1 Das Expressionssystem RBSIIP N25/ BMP-2

Die Expression der cDNA der BMP-2-Mutanten steht in diesem Vektor unter der Kontrolle eines lac-Operon. Das Gen für das lacIq-Repressorprotein liegt im Fall der M15-Zellen neben einem Gen für die Kanamycinresistenz auf dem Hilfsplasmid pDMI,1.

Das lac-Repressorprotein bindet im nichtinduzierten Zustand an den lacIq-Operator und hemmt somit die Transkription. IPTG, ein Galaktosid, bindet an den lacIq-Repressor, wodurch er vom lacIq-Operator abfällt und dadurch den Transkriptionsbeginn der stromabwärts liegenden Basensequenz ermöglicht.

Die analytische Proteinexpression durch Zugabe von IPTG ergab bei keinem Klon der Mutanten T1, T2 oder T12, die getestet wurden, eine spezifische Induktionsbande. Es wurden zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten jeweils mindestens 7 Klone jeder Mutante getestet. Da aus Erfahrung bekannt ist, dass bei anderen BMP-2-Mutanten mindestens 1 von 8 Klonen exprimiert, erscheint eine Analyse weiterer Klone nicht lohnend.

3.3.2 Das Expressionssystem pET3d/ BMP-2

Die Expression im pET3d-System steht unter der Kontrolle des T7-Promotors und kann damit von der T7-Polymerase transkribiert werden. Das Gen für die T7-Polymerase ist Teil des Coliphagen lambda-DE3, der bereits im E. coli-Stamm BL21(DE3) chromosomal integriert ist. Das Polymerasegen steht unter der Kontrolle des lacUV5-Promotors, der im nichtinduzierten Zustand wieder durch einen lac-Repressor inaktiviert ist. Die Bindung von zugesetztem IPTG hat das Abfallen des Repressorproteins vom Promotor zur Folge, wodurch dann die Transkription durch die T7-Polymerase möglich wird.

3.3.3 Die analytische Proteinexpression

Zur Überprüfung der Proteininduktion im analytischen Maßstab wird zu einer 1 : 200 verdünnten Übernachtskultur nach 2 h 1/1000 Vol. IPTG zugegeben und nach 3 h Proben durch SDS-PAGE analysiert (siehe Abb. 3-3 und 3-4).

Im Expressionssystem RBSIIP N25/ BMP-2 zeigen sich im Fall der Duplikationsvarianten T3 und T4 deutliche Banden als Zeichen einer Proteinexpression, im Gegensatz zu den Varianten T1, T2 und T12.

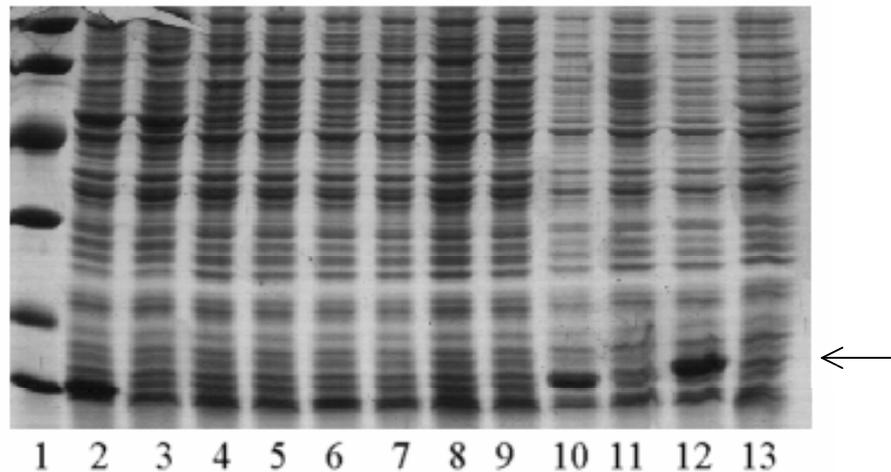


Abbildung 3-3

SDS-PAGE der Probeexpression der Mutanten T1, T2, T12, T3 und T4,

Spur 1: Proteinmarker

Spur 2: BMP-2: induziert

Spur 3: BMP-2: nicht induziert

Spur 4: T1: induziert

Spur 5: T1: nicht induziert

Spur 6: T2: induziert

Spur 7: T2: nicht induziert

Spur 8: T12: induziert

Spur 9: T12: nicht induziert

Spur 10: T3: induziert ()

Spur 11: T3: nicht induziert

Spur 12: T4: induziert ()

Spur 13: T4: nicht induziert

Auch im Fall der beiden Austauschmutanten GLY und EX, deren Expression nicht auf dem folgenden Gel gezeigt wird, konnte nur eine schwache Proteinexpression beobachtet werden.

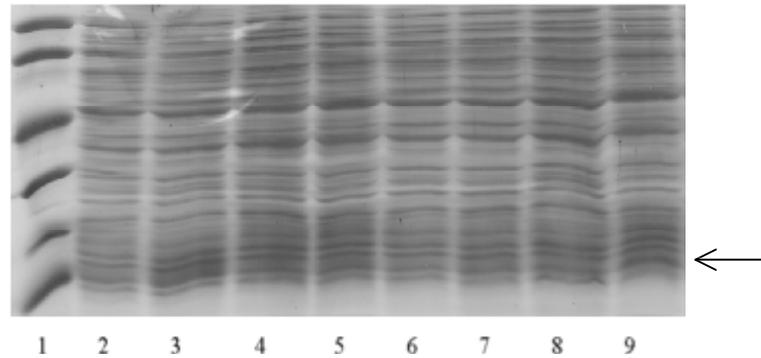


Abbildung 3-4

SDS-PAGE der Probeexpression von Klonen der BMP-2-Mutante GLY

Spur 1: PM

Spur 2 und 3: Klon 1, Spur 4 und 5: Klon 2, Spur 6 und 7:Klon 3,

Spur 8 und 9: Klon 4

Spur 2, 4, 6 und 8 nicht induziert

Spur 3, 5, 7 und 9 induziert

In Spur 9 ist eine schwach induzierte Bande zu erkennen (←).

3.3.4 Die präparative Proteinexpression

Zur präparativen Proteininduktion der gut induzierbaren Mutanten T3 und T4 wurden 80 ml einer über Nacht dichtgewachsenen Bakterienkultur am Morgen zu je einem Drittel in 3x 800 ml Nährmedium verdünnt und nach weiterem Wachstum bei einer OD_{580} von ca. 0,8 mit 1/1000 Vol IPTG versetzt und für 3 h

Resultate

induziert. Pro Liter Kulturansatz erhält man nach dieser, nach R. Ruppert modifizierten Methode, ca. 5 g Zellpellet (Feuchtgewicht).

Mutante	Zellpellet (Feuchtgewicht)
T3	9,2 g
T4	13,2 g

Tabelle 3-2 Das bei der ersten präparativen Proteinexpression gewonnene Zellpellet der BMP-2-Mutanten T3 und T4

3.4 Die Proteinaufreinigung

3.4.1 Inclusion bodies

Die Zellen werden zunächst mit Hilfe einer zweifachen Ultraschallbehandlung aufgebrochen. Das gesamte rekombinante Protein fällt in Form sog. Einschlusskörperchen, der „inclusion bodies“ an. Nach zweimaligem Waschen wurden ca. 1-3 g „inclusion bodies“ pro Liter Kulturansatz erhalten.

Anschließend wurde das in den Einschlusskörperchen vorliegende Protein mit dem chaotropen Reagenz Guanidiniumhydrochlorid versetzt (Vorextraktion) und die Disulfidbrücken des nur teilweise denaturierten Proteins mit β -Mercaptoethanol gespalten (Hauptextraktion).

Bei der Vorextraktion werden zu dem Protein Reagenzien zu den Endkonzentrationen von 0,6 M GuCl, 1 mM EDTA und 50 mM NaAc, pH5 in

einem den gewogenen inclusion bodies entsprechenden 10fachen Volumen zugegeben.

Entsprechend wird bei der Hauptextraktion verfahren mit den Endkonzentrationen von 6 M GuCl, 1/1000 β -Mercaptoethanol, 50 mM NaAc pH5.

Mutante	Vorextraktion	Hauptextraktion
T3	gewogene Zellen(inclusion bodies): 3,42 g in einem Ansatz von 34,2 ml = 10 VE	gewogene Zellen: 2,42 g in einem Ansatz von 24,2 ml = 10 VE
T4	gewogene Zellen(inclusion bodies): 2,55 g in einem Ansatz von 25,5 ml = 10 VE	gewogene Zellen: 1,76 g in einem Ansatz von 17,6 ml = 10 VE

Tabelle 3-3 Die im Rahmen der Proteinaufreinigung erhaltenen „inclusion bodies“ und die jeweils daraus berechneten Ansätze für Vor- und Hauptextraktion

Nach Ultrazentrifugation des Denaturierungsansatzes wird der Zentrifugationsüberstand durch Molekularsiebchromatographie an einer S300-Sephacrylsäule in einen Proteinanteil, Nucleinsäuren und Verunreinigungen anderer Proteine aufgetrennt. Um Oxidationsprozesse des Proteins an der Säule zu vermeiden, wird DTT in einer Endkonzentration von 0,1mM zu der als Laufpuffer dienenden Guanidiniumhydrochloridlösung zugegeben. Die erhaltenen Fraktionen werden am Spektrophotometer vermessen und, nach Fällung mit TCA, analysiert.

3.4.2 Renaturierung der BMP-2-Mutanten

Die Renaturierung der beiden BMP-2-Mutanten T3 und T4 wurde nach der von Rainer Ruppert (1996) etablierten Methode zur Renaturierung von BMP-2 durchgeführt. Modifiziert wurde das Protokoll durch die Verwendung von Cystamin/ Cysteamin statt Gluthation ox./ red. als Redoxsystem in dem unter 2.9.5 beschriebenen Renaturierungspuffer. Die effizienteste Renaturierung findet durch Inkubation bei 18° C unter leichtem Rühren statt.

Eine anschließende Dialyse gegen das zwanzigfache Volumen 50 mM NaOAc-Puffer (pH 5.0) dient vor allem zur Reduzierung der NaCl-Konzentration.

3.4.3 Reinigung durch Kationenaustauschchromatographie

Nach Zugabe von 2-Propanol bis zu einer Endkonzentration von 30 Vol.% wird das Dialysat über eine CM-Sepharose-Säule durch Kationenaustauschchromatographie wie unter 2.9.4.2 beschrieben aufgereinigt und die Proteine mit einem linearen Gradienten von 0-1 M NaCl eluiert. Die Kationenaustauschchromatographie wird bei pH 5 durchgeführt, weil dann die zu reinigenden Proteine positiv geladen sind, während das noch enthaltene Chaps ungeladen vorliegt. Deshalb treten keine Wechselwirkungen des ungeladenen Chaps mit der negativ geladenen Matrix auf.

Die erhaltenen Fraktionen des Eluates werden vereinigt und gegen die hundertfache Menge Wasser dialysiert zur Reduzierung des noch entaltenen 2-Propanols, Salz und anderer Verunreinigungen.

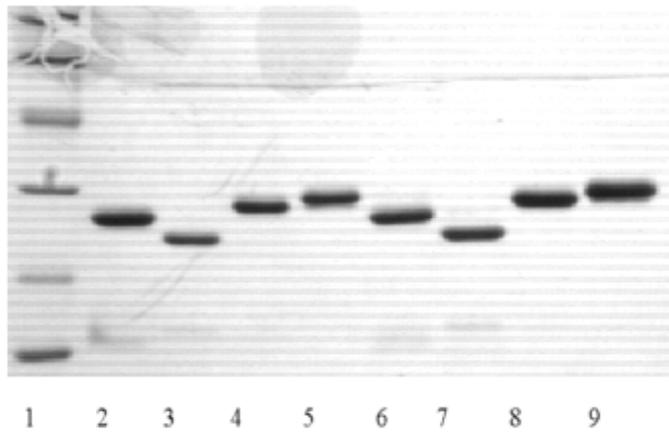
3.4.4 Starke Kationenaustauschchromatographie (FPLC-Säule)

Das Prinzip der Fractogel-Säule ist wie das der CM-Sepharose-Säule die Kationenaustauschchromatographie. Sie unterscheiden sich aber durch den chemischen Aufbau der Säulenmatrix und die Stärke der elektrostatischen Wechselwirkungen.

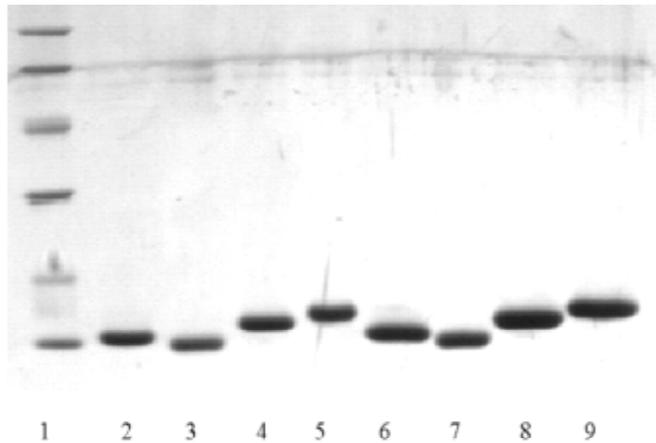
Die charakteristische Aufteilung in Vor- und Hauptpeak gibt die stufenweise Elution von monomerem und dimerem Protein wieder, deren Menge anschließend spektrophotometrisch vermessen wird. Eine Abschlussdialyse über Nacht gegen die hundertfache Menge Wasser und 15 min. Zentrifugation bei 4° C schließen den Aufreinigungsprozess ab.

Die Proteine werden in verschiedenen Mengen aliquotiert und bei -51° C und 1,5 mbar für 24 h gefriergetrocknet und bei -80° C aufbewahrt.

Die folgenden SDS-PAGE zeigen BMP-2, EH-BMP-2 und die gereinigten BMP-2-Mutanten T3 und T4 in oxidiertem und β -Mercaptoethanol-reduzierter Form:



a)



b)

Abbildung 3-5 SDS-Page der gereinigten Proteine BMP-2 (2 und 6), EH-BMP-2 (3 und 7), T3 (4 und 8) und T4 (5 und 9) in a) oxidiertes und b) β -Mercaptoethanol-reduzierter Form, jeweils 2-5 in einfacher und 6-9 in doppelter Menge

3.5 Berechnung des Absorptionskoeffizienten von BMP-2

Den Absorptionskoeffizienten eines Proteins kann man nach der Edelhoch-Methode (Pace, M. C. et al., 1995) in sehr guter Näherung berechnen. Dabei wird davon ausgegangen, dass die Absorption eines Proteins bei einer Wellenlänge von 280 nm v.a. von den drei Chromophoren Tryptophan, Tyrosin und Cystein abhängt. Durch Messungen von 116 molaren Absorptionskoeffizienten für 80 Proteine konnte so empirisch folgende Formel zur Berechnung des molaren Absorptionskoeffizienten aufgestellt werden:

$$\epsilon(280) = (n \text{ Trp}) (5500) + (n \text{ Tyr}) (1490) + (n \text{ Cys}) (125) \quad n: \text{Anzahl der Chromophore}$$

Die Berechnung des molaren Absorptionskoeffizienten des dimeren BMP-2 ergibt aufgrund der oben zitierten Gleichung mit 4 Tryptophanen, 10 Tyrosinen und 7 Cystein-Cystein-Brücken $\epsilon(280) = 37\,775$.

Mit Hilfe des Lambert-Beer-Gesetzes lässt sich anschließend, ausgehend vom berechneten molaren Absorptionskoeffizienten, einer angenommenen Küvettenbreite (d) von 1,0 cm und einem Absorptionswert $A_{280} = 1,0$, die Konzentration c der wässrigen Proteinlösung bestimmen:

$$A = \epsilon \cdot d \cdot c.$$

3.6 Darstellung der physikalischen und biologischen Aktivität der BMP-2-Mutanten T3 und T4

In den folgenden Versuchen wurde der Einfluss einer veränderten Heparinbindungsstelle des BMP-2-Proteins auf die physikalische Bindung an Heparin und an den BMPR-IA (ALK-3) gemessen und das Verhalten der Mutanten unter verschiedenen in vitro-Bedingungen getestet.

3.6.1 Messung der physikalischen Interaktion der BMP-2-Varianten T3 und T4 mit Heparin und ALK-3

Die Messungen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Sebald ausgeführt. Nach dem in 2.10.4 beschriebenen Prinzip können Wechselwirkungen zwischen Ligand und Rezeptor bzw. Molekülen wie z.B. Heparin auf physikalischer Basis auf einem Biosensor (BIAcore-System) gemessen werden. Zunächst wurde die Bindung von BMP-2, EH-BMP-2 und den Varianten T3 und T4 an die Ektodomäne des BMPR-IA, der auch ALK-3 genannt wird, untersucht. Der Rezeptor wurde dafür biotinyliert und auf einem Streptavidin-Chip immobilisiert. Die Dichte des auf die Chip-Oberfläche gebundenen Proteins wird in resonance units (RU) gemessen (1 RU = 1 pg/mm² an gebundenem Protein) und im Sensogramm über die Zeit aufgetragen. Mit Hilfe der BIAcore-Software können dann durch die Bestimmung kinetischer Konstanten quantitative Aussagen zur Bindungskinetik der einzelnen Liganden gemacht werden. Daraus lassen sich dann Assoziations- (KA) und Dissoziationskonstanten (KD) der Liganden berechnen.

In den ersten 1200 s wird die Bindung und Dissoziation des Ligand-Rezeptor-Komplexes während des Durchströmens von Ligand (BMP-2, EH-BMP-2, T3, T4) zusammen mit Puffer gemessen und in den anschließenden 300 s während des Durchströmens von Puffer allein.

Am Sensogramm sieht man, dass in den ersten Sekunden vorwiegend eine Bindung des Liganden an die zu diesem Zeitpunkt noch weitgehend unbesetzten ALK-3-Rezeptormoleküle stattfindet. Nach ca. 200 s nimmt die Dissoziation bereits gebildeter Ligand-Rezeptor-Komplexe im Vergleich zur Assoziation immer mehr zu, da die Zahl freier Rezeptormoleküle ständig abnimmt, bis es zur Einstellung eines Gleichgewichtes kommt. Entsprechend sind die RU-Werte im Sättigungsbereich am größten.

Während nur Puffer über die Ligand-Rezeptor-Komplexe gespült wird, findet im wesentlichen Dissoziation statt. Hieraus lässt sich die Dissoziationskonstante berechnen.

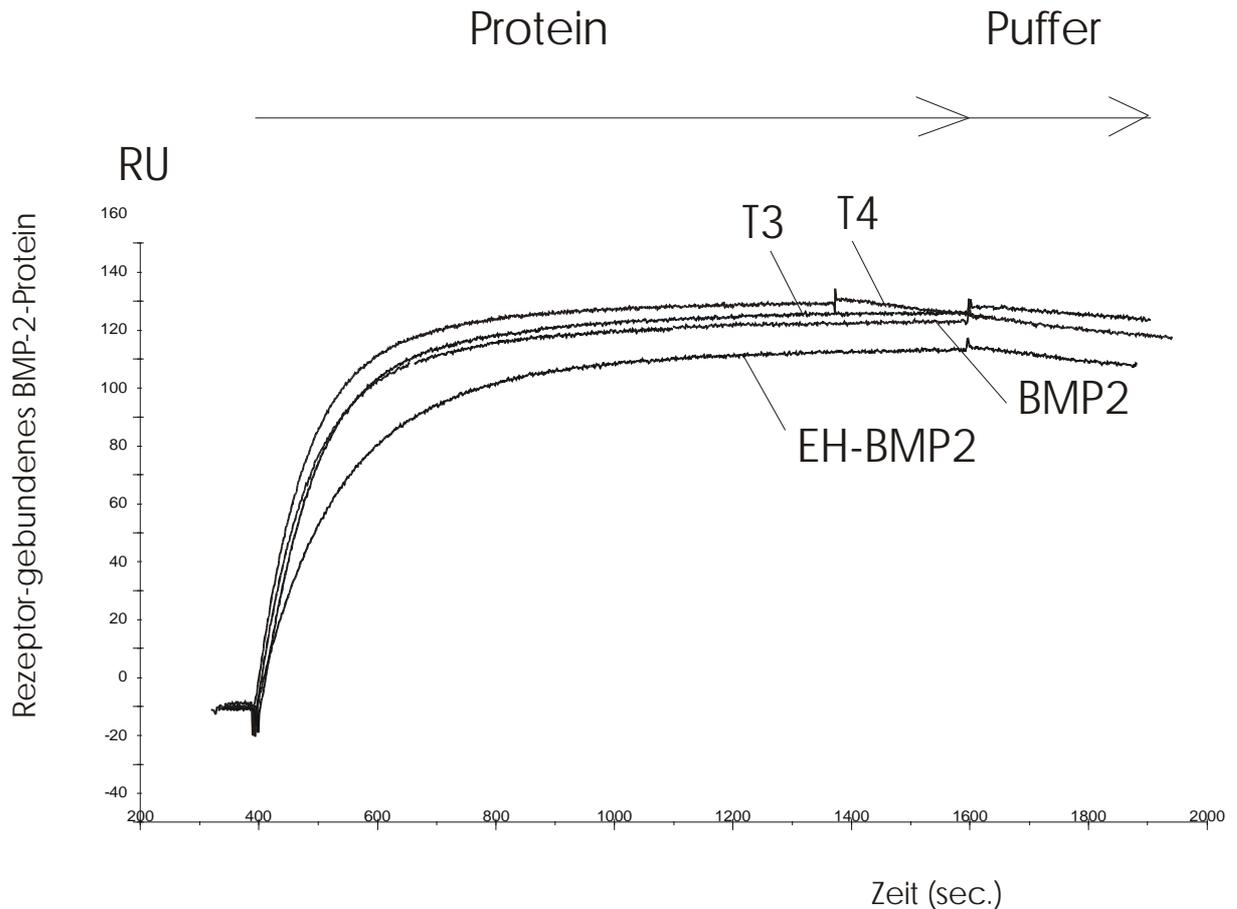


Abbildung 3-6: Das Sensogramm der Rezeptorbindung der BMP-2-Mutanten an die Ektodomäne des ALK-3. Es ist offensichtlich, dass die Modifizierung der Heparinbindungsstelle im N-Terminus des BMP-2 weitgehend keinen Einfluss auf die Rezeptorbindung hat.

Resultate

In einem zweiten Schritt wurde dann die Bindung von BMP-2, EH-BMP-2 und der Mutanten T3 und T4 an Heparin untersucht. Hierfür wurde biotinyliertes Heparin verwendet, das auf einen Neutraavidin-Chip immobilisiert wurde.

Nach dem gleichen Prinzip wurde hier die Bildung und Dissoziation des Protein-Heparin-Komplexes gemessen, indem zunächst in den ersten 150 s das Protein zusammen mit dem Puffer und anschließend für weitere 100 s mit Puffer allein über das immobilisierte Heparin gespült wurde. Das völlige Fehlen einer Bindung der Variante EH-BMP-2 an Heparin ist schon gezeigt worden (Ruppert, R. et al., 1996).

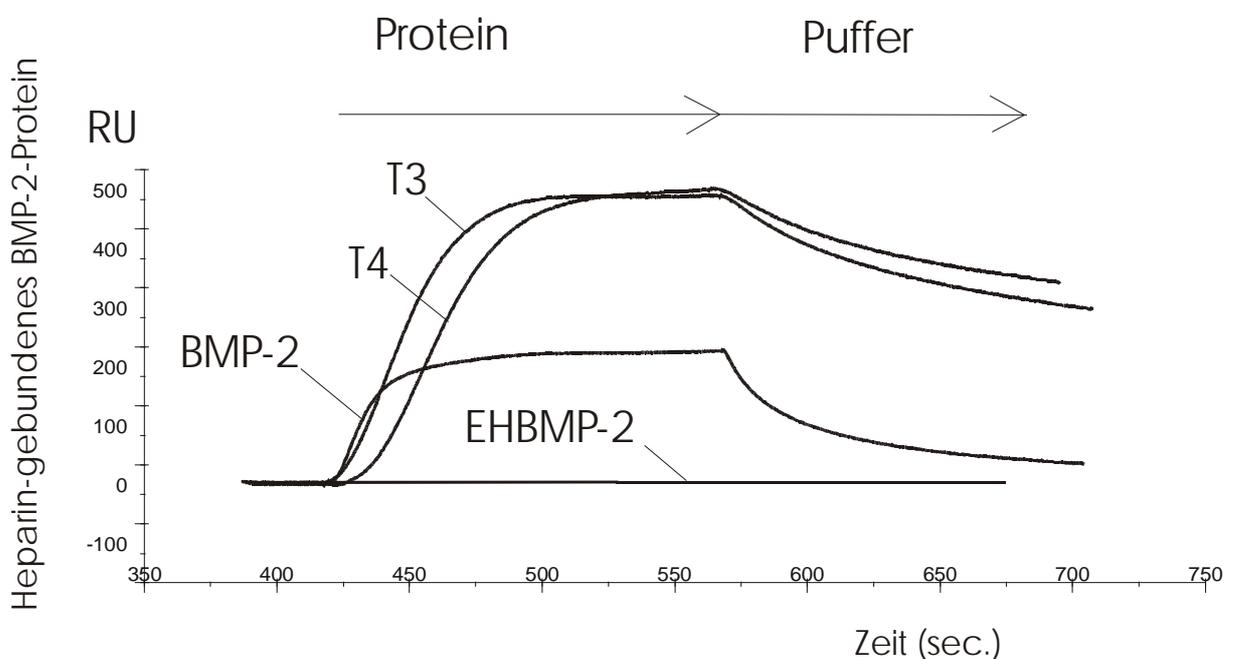


Abbildung 3-7: Bindung der BMP-2-Mutanten an Heparin

In diesem Versuch wurde nun gezeigt, dass zwischen den Duplikationsvarianten T3/T4 und Heparin im Vergleich zu BMP-2 eine sehr viel stärkere Assoziation stattfindet. Dies wird durch die ca. 2,5 x höheren RU-Werte im Sättigungsbereich der Bindung bei T3 und T4 im Vergleich zu BMP-2 deutlich. Allerdings kann man in diesem Versuch keine direkte Korrelation zwischen der Anzahl der basischen Triplets und der Stärke der Heparinbindung feststellen, da sich das Bindungsverhalten von T3 und T4 zu wenig unterscheidet.

3.6.2 Biologische Aktivität der BMP-2-Varianten T3 und T4

3.6.2.1 Biologische Aktivität der BMP-2-Varianten in embryonalen Zellen der Hühnergliedmaßenknospe

Zunächst wurden T3 und T4, wieder in direktem Vergleich zu BMP-2 und EH-BMP-2, zur Charakterisierung ihrer biologischen Wirksamkeit im sog. „limb bud“-Test untersucht. Es handelt sich um ein schon häufig beschriebenes (Ahrens, P. et al., 1977; Lennon, D. P. et al., 1983; Carrington, J. L. und Reddi, A. H., 1990) Testsystem zur Charakterisierung der Differenzierung mesodermaler embryonaler Zellen von Hühnergliedmaßenknospen in Knorpel bzw. Knochen. Dabei wird die Synthese von Proteoglycanen als Zeichen für stattfindende chondrogene und osteoblastäre Differenzierungsvorgänge genommen und die Syntheserate dieser EZM-Bestandteile gemessen. Auch zur Charakterisierung der chondro- bzw. osteoinduktiven Aktivität verschiedener BMPs und BMP-Mutanten kann das Testsystem herangezogen werden.

Aufgrund der sulfathaltigen Glycosaminoglycane (z.B. Chondroitin-4-Sulfat, Chondroitin-6-Sulfat u.a.) als Seitenketten der Proteoglycane kann man durch

Resultate

mehrstündige Inkubation der embryonalen Zellen mit radioaktiv markiertem $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ durch Zugabe von BMPs oder BMP-Mutanten eine Proteoglycansynthese anregen, für die das angebotene radioaktive Sulfat verwendet wird. Nun werden die in einem bestimmten Zeitraum synthetisierten Proteoglycane durch ihr eingebautes $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ unter steigenden Konzentrationen an BMP-2 bzw. BMP-2-Mutanten gemessen und als Dosis-Wirkungskurven dargestellt.

Im folgenden Diagramm wurde der SO_4 -Einbau der mit Alcian-Blau gefällten Proteoglycane in Prozent über der Proteinkonzentration aufgetragen.

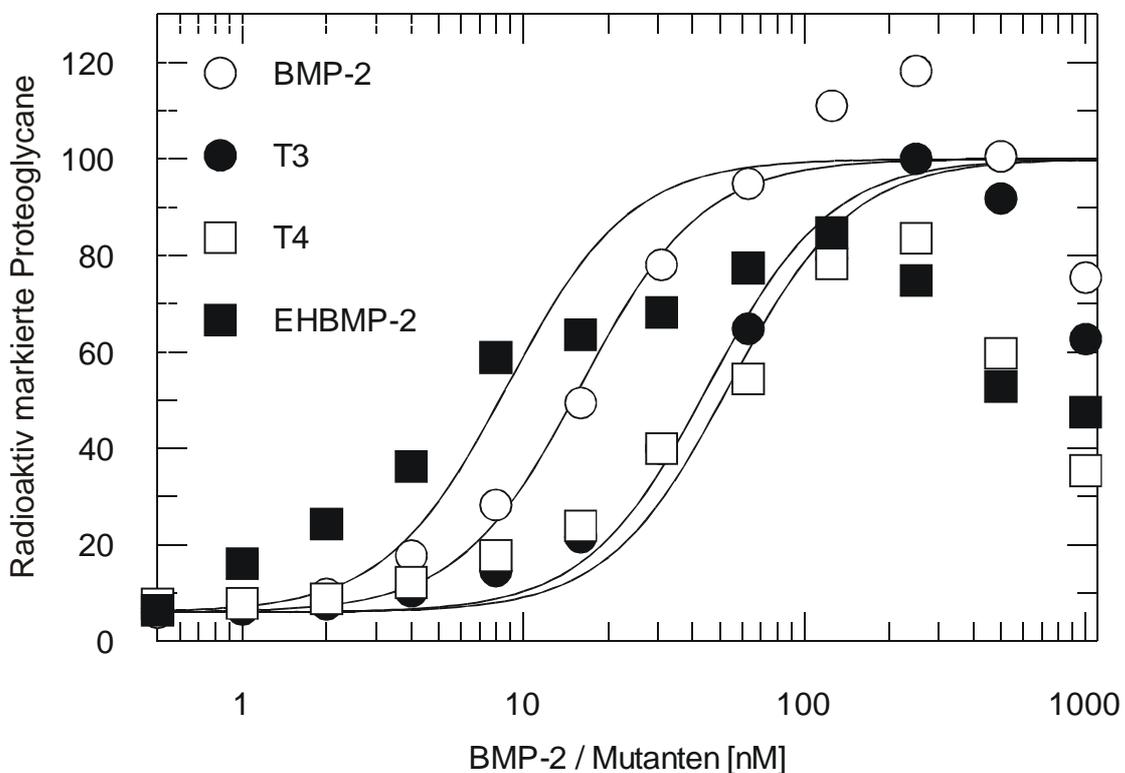


Abbildung 3-8 Der Hühnergliedmaßentest mit BMP-2 und den Varianten EH-BMP-2, T3 und T4

Man sieht einen deutlichen Anstieg des EC50-Wertes der Mutante T3 (EC50 = 29 nM) mit Verdopplung nur des ersten der beiden Triplets im Vergleich mit BMP-2 (EC50 = 13 nM) und einen noch höheren EC50-Wert der Mutante T4 (EC50 = 69nM), bei der beide basischen Triplets verdoppelt wurden. Ein höherer EC50-Wert bedeutet, dass für das Erreichen desselben Effektes eine höhere Konzentration an Ligand notwendig ist.

3.6.3 Biologische Aktivität der BMP-2-Varianten in den C2C12-Zellen

Das Enzym Alkalische Phosphatase (ALP) ist das Genprodukt eines Markergens für Osteoblasten, das während der Reifung der Knochenmatrix exprimiert wird. Es kann somit in mesenchymalen, pluripotenten Zelllinien, die normalerweise dieses Enzym nicht exprimieren, als Marker für osteoblastäre Differenzierungsvorgänge dienen. Die C2C12-Zellen stellen eine solche Zelllinie dar; sie können sich abhängig von äußeren Bedingungen entweder in Muskel- oder in Knochenzellen differenzieren. Durch Wahl eines Nährmediums, das schlechte Wachstumsbedingungen für die Zellen schafft, und gleichzeitige Zugabe von BMP-2 bzw. BMP-2-Varianten, kann eine osteoblastäre Differenzierung ausgelöst werden, die innerhalb von 4 d Inkubationszeit zu messbarer Induktion der ALP führt.

Der funktionelle Nachweis der ALP gelingt durch Zugabe ihres Substrates p-Nitrophenyl-phosphat, das zum p-Nitrophenolatanion gespalten wird. Die im ELIZA-Reader bei 405 nm gemessene Absorption dieses Anions ist nun der Aktivität der ALP direkt proportional. Die Aktivität des Enzyms berechnet sich aus der Menge an umgesetztem Substrat pro Zeiteinheit und Gesamtproteinmenge und wird in relativen Einheiten angegeben.

Wie unter 2.10.2.2 beschrieben, werden die Messungen in einer logarithmischen Verdünnungsreihe mit abnehmender Konzentration an

Resultate

Wachstumsfaktor jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt. Auch in diesem Test wurden wieder die Varianten T3 und T4 im Vergleich zu BMP-2 und EH-BMP-2 im Hinblick auf eine mögliche Änderung der biologischen Aktivität durch eine modifizierte Heparinbindungsstelle analysiert.

Als Kontrolle wurde immer eine Parallelbestimmung in einem well ohne Zugabe von Wachstumsfaktor durchgeführt.

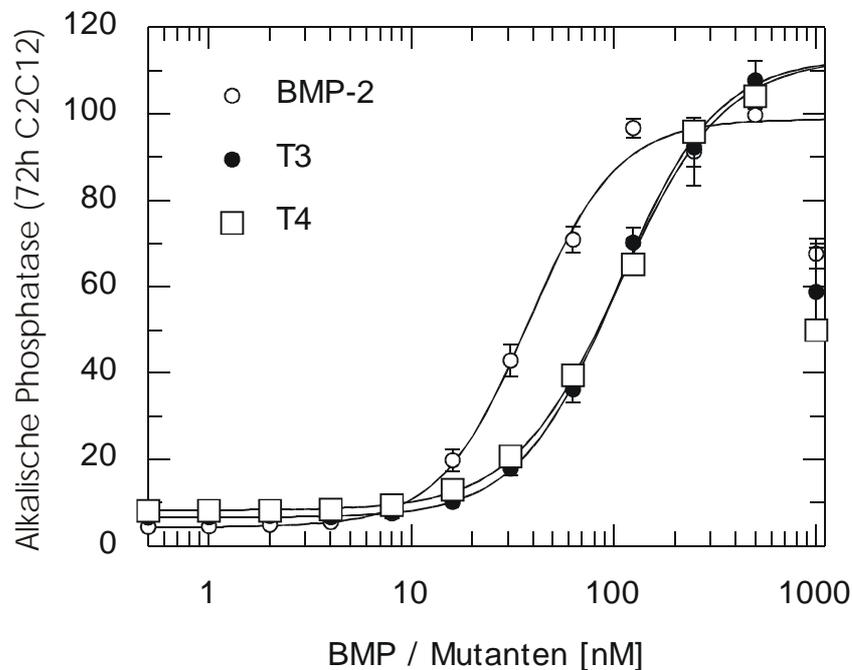


Abbildung 3-9: Induktion der Alkalischen Phosphatase in C2C12-Zellen

In diesem Diagramm ist die Aktivität der ALP über der Proteinkonzentration aufgetragen.

Auch wenn in diesem in vitro-Zellsystem keine Abstufung zwischen den beiden Mutanten T3 und T4 festgestellt werden kann, ist doch ebenfalls ein sehr viel höherer EC₅₀-Wert bei T3 (EC₅₀ = 91 nM) und T4 (EC₅₀ = 95 nM) im Vergleich mit BMP-2 (EC₅₀ = 38 nM) festzuhalten.

4 Diskussion

Für eine genaue Festlegung der für die Heparinbindung verantwortlichen Aminosäuren im N-Terminus des BMP-2 wurde, wie unter 3 beschrieben, eine stufenweise Modifizierung der bereits identifizierten Heparinbindungsstelle vorgenommen. Durch Steigerung der Anzahl zusätzlich eingeführter basischer Aminosäuren bzw. durch Austausch der basischen durch neutrale Aminosäuren sollte eine möglicherweise vorhandene Korrelation zwischen der Stärke der Heparinbindung und einer veränderten biologischen Aktivität der BMP-2-Mutanten untersucht werden. Die Klonierung der Austausch- und Duplikationsmutanten T1, T2, T12, T3, T4, GLY und EX nach der bereits beschriebenen Methode der Kassettenmutagenese konnte erfolgreich durchgeführt und durch Sequenzierung bestätigt werden.

4.1 Proteinexpression

Eine hohe bakterielle Expressionsrate des BMP-2-Proteins unter der Kontrolle des Hybridpromotors aus lac-Operon und T5-Phagen im Expressionssystem RBSIIPN25/BMP ist bereits gezeigt worden. Die BMP-2-Variante EH-BMP-2 konnte im Expressionssystem RTSpRC109 ebenfalls sehr gut exprimiert werden (Doktorarbeit, R. Ruppert, 1996).

Eine Expression der beiden Duplikationsvarianten T3 und T4 konnte auch im Expressionssystem RBSIIPN25/BMP durch Zugabe des Lactose-Analogons IPTG in der logarithmischen Wachstumsphase der Bakterien erreicht werden.

Unter reduzierenden Bedingungen kann man in der SDS-PAGE eine leichte, aber klare Abstufung der beiden Banden nach ihrer jeweiligen Größe erkennen, die entsprechend ihres errechneten Molekulargewichtes von 13 620 Da (T3) bzw. 14 140 Da (T4) knapp über der Bande des BMP-2 mit 13 106 Da

zwischen der Lactalbumin- (14,4 kDa) und der Trypsin-Inhibitorbande (20,1 kDa) liegen.

Dagegen konnte im Fall der Varianten T1, T2 und T12 in zahlreichen Versuchen zu keinem Zeitpunkt eine Expression ausgelöst werden. Auch leichte Variationen im Zeitpunkt der IPTG-Zugabe (nach 1,5 h, 2 h, 2,5 h) und in der Zeitspanne zwischen Induktion und Ernte der Bakterien (2,5 h, 3 h, 3,5 h) brachten nicht den gewünschten Erfolg. Bei den Varianten GLY und EX konnte in der analytischen SDS-PAGE zwar eine schwache Expression erkannt werden, für eine Großinduktion mit dem Ziel einer für in vitro-Versuche lohnenden Menge an Protein als Ergebnis konnte dabei aber nicht gerechnet werden.

Stellt man sich nun die Frage, warum im einen Fall eine gute Expression auslösbar ist und im anderen Fall nicht, muss man den Prozess der Proteinbildung in der prokaryontischen Zelle näher betrachten. Die beiden Ebenen dieses Prozesses sind die Transkription und die Translation, die durch zahlreiche „Störfaktoren“ beeinflusst werden können.

Einer der häufigsten Gründe, der allgemein für eine fehlende Proteingewinnung verantwortlich gemacht wird, ist ein vorzeitiger Abbau des Proteins durch Proteasen.

Auch kann z.B. durch Austausch von Nucleotiden, die im Bindungsbereich von Regulatorproteinen in Promotornähe liegen, deren Wechselwirkung mit der RNA-Polymerase beeinflusst werden und so eine Änderung der Transkriptionshäufigkeit zur Folge haben.

Eine andere Erklärung kann die Ausbildung von RNA-Sekundärstrukturen sein, die eine Translation dieser mRNA in diesem Expressionssystem verhindern.

Auch im pET3d-Expressionssystem konnte trotz des anderen Promotors keine Expression dieser Mutanten ausgelöst werden.

Im Vergleich der Aminosäuresequenzen auf der Ebene der Mutanten fällt auf, dass in den beiden Duplikationsmutanten, die sich gut induzieren lassen, die eigentliche Heparinbindungsstelle mit den beiden basischen Boxen nicht verändert, sondern lediglich durch Verdopplung der Boxen erweitert wurde. Bei allen anderen Mutanten wurden diese Boxen in unterschiedlicher Weise modifiziert. Das legt den Schluss nahe, dass dieser Bereich im N-Terminus des BMP-2 auf der Ebene der RNA-Synthese eine sensible Region für die Synthese des ganzen Proteins darstellt.

4.2 Renaturierung und Aufreinigung der BMP-2-Varianten T3 und T4

Die Renaturierung und die Aufreinigung der BMP-2-Mutanten T3 und T4 nach dem für BMP-2 etablierten Syntheseprotokoll gelang erwartungsgemäß ohne Schwierigkeiten. Die Renaturierung sollte kein Problem darstellen, da die kritischen Punkte im Rückfaltungsprozess die Ausbildung der Disulfidbrücken sind. Mutationen im Bereich des N-Terminus sollten die korrekte Rückfaltung mit Ausbildung des Cysteinknotens und damit der Dimerstruktur nicht gefährden, da dieser Teil des Proteins nicht die entscheidende Rolle bei der Ausbildung des Dimers spielt.

Bei den säulenchromatographischen Aufreinigungsschritten ergaben sich im Vergleich mit BMP-2 nur kleine Veränderungen, z.B. wurden die durch zusätzliche Einführung basischer Aminosäuren stärker positiv geladenen Mutanten bei der Kationenaustauschchromatographie erst bei einer höheren Salzkonzentration von der Säule eluiert als BMP-2.

4.3 Die biologische Funktion der Bindung des BMP-2 an die extrazelluläre Matrix

Bone morphogenetic proteins werden als Wachstums- und Differenzierungsfaktoren von bestimmten Zellen sezerniert und gelangen durch Diffusion im extrazellulären Raum zu ihren Zielzellen, wo sie durch Bindung an ihre spezifischen Rezeptoren die eigentliche Wirkung in der Zelle auslösen. Sie werden von einer relativ geringen Anzahl benachbarter Zellen sezerniert und liegen somit um ihren Sekretionsort in hoher Konzentration vor. Durch die sofort einsetzende Diffusion in alle drei Richtungen des Raumes nimmt die Konzentration in einem steilen Gradienten ab, so dass auf Zellen, die in verschiedenen Entfernungen vom Sekretionsort liegen, eine jeweils unterschiedliche Konzentration des Proteins einwirkt. Dies hat schließlich konzentrationsabhängige Unterschiede der Zellantwort auf diese Signalmoleküle und damit letztlich Unterschiede in der Differenzierung der einzelnen Zellen zur Folge. Sezernierte Faktoren wie die BMPs, dpp u.a., die durch Ausbildung eines solchen Gradienten verschiedene Zellschicksale bestimmen, nennt man Morphogene, da sie auf diese Weise für die Morphogenese von Organen verantwortlich sind. Aber v.a. auch in der Embryonalentwicklung spielen die BMPs in ihrer Funktion als Morphogene eine entscheidende Rolle. Dabei steht immer mehr die Frage im Vordergrund, welche Mechanismen für den Aufbau des Konzentrationsgradienten verantwortlich sind. Obwohl mittlerweile eine Entstehung des Gradienten durch reine Diffusion unwahrscheinlich geworden ist, sind die genauen Mechanismen noch nicht bekannt.

Reddi postuliert zwei entscheidende Prinzipien, um das komplexe Geschehen bei Morphogenese- und Entwicklungsprozessen zu erklären (Reddi, A. H., 1998): einmal sind lokal exprimierte Proteine bekannt, die an in großen

Bereichen exprimierte Signalmoleküle binden und so deren Interaktion mit ihrem Rezeptor verhindern. Ein Beispiel dafür sind die dorsalisierend wirkenden Proteine Noggin, Chordin und Follistatin, die im Gastrulationsstadium der Xenopusentwicklung im Spemann-Organizer sezerniert werden und das über den ganzen Embryo exprimierte BMP-4 binden und so das ventralisierende BMP-4-Signal je nach Konzentration verschieden stark unterdrücken.

Das andere von Reddi aufgestellte Prinzip ist die Ausbildung des Konzentrationsgradienten durch Bindung der Morphogene an Bestandteile der extrazellulären Matrix. Danach kommt der EZM eine Speicherfunktion zu, die eine zu schnelle Diffusion der sezernierten Proteine verhindert und somit für die Gradientenausbildung verantwortlich ist. Gerade in der Embryonalentwicklung ist oft die Begrenzung des Wirkungsbereichs eines Wachstums- und Differenzierungsfaktors für die Ausbildung verschiedener Strukturen notwendig, was durch eine lokale Speicherung des Faktors erreicht wird.

Es ist schon lange bekannt, dass BMP-2 stark an die Matrix und an Zelloberflächen bindet (Israel, D. I. et al., 1992). In zahlreichen Experimenten ist die Bindung von BMPs an einzelne Komponenten der EZM, wie z.B. an Heparansulfat, Typ IV Kollagen der Basalmembranen (Paralkar, V. M., Reddi, A. H. et al., 1990) und Heparin (Wang, E. A., 1988; Wang, E. A., 1990), nachgewiesen worden. Heute wird allgemein vermutet, dass das Wechselspiel zwischen den BMPs und Bestandteilen der EZM wesentlich an der Knochenentwicklung beteiligt ist.

Um die Bedeutung der extrazellulären Matrix in Morphogenese und Entwicklung verstehen zu können und ihre Funktion als niederaffinen Corezeptor, der den Wachstumsfaktor in der Nähe des spezifischen Rezeptors hält, zu prüfen, ist die genaue Charakterisierung der Interaktionen zwischen Signalmolekülen und EZM-Bestandteilen notwendig.

Deshalb war das Ziel dieser Arbeit, die einmal identifizierte Heparinbindungsstelle des BMP-2 (Ruppert, R. et al., 1996), ausgehend von den beschriebenen Überlegungen, gezielt auf einen möglichen direkten Zusammenhang der Matrixbindung mit der biologischen Aktivität des Proteins zu untersuchen.

In vielen Proteinen wurden Heparinbindungsstellen gefunden, die sehr unterschiedliche physiologische Funktionen haben: im Hepatozytenwachstumsfaktor HGF wird über die Heparinbindung eine Oligomerisierung von HGF induziert, die an der Rezeptoraktivierung beteiligt sein könnte (Aoyama, H. et al., 1997); die Dimerisierung und Aktivierung des FGF-Rezeptors erfolgt durch Heparin, indem es den FGF-Rezeptor-Komplex vernetzt (Spivak-Kreuzman, T. et al., 1994); auch der platelet-derived growth factor PDGF-AA kann an Heparin und andere Glycosaminoglycane binden, wodurch seine mitogene Wirkung inhibiert wird (Lustig, F. et al., 1996). Bekannt ist auch die antikoagulative Wirkung der Bindung von Heparin an Antithrombin III, wodurch dessen inhibierende Bindung an Thrombin verstärkt wird.

Bei der Identifizierung der Aminosäuresequenzen der Heparinbindungsstellen dieser verschiedenen Proteine, wurde meist eine starke Häufung basischer Seitenketten beschrieben, von denen oft nur einige wenige für die eigentliche Bindung verantwortlich sind. Durch gezielten Austausch einzelner Aminosäuren (z.B. Austausch von Arginin 132 und Lysin 133 gegen das neutrale Methionin im Antithrombin III; Meagher, J. L. et al., 1996) oder durch Vergleich kleiner Peptidfragmente aus einem Protein im Hinblick auf die Affinität zu Heparin (z.B. im Fall von HGF; Aoyama, H. et al., 1997) und ähnliche Methoden konnte gezeigt werden, dass basische Aminosäuren für die Bindung an Heparin und andere Glycosaminoglycane verantwortlich sind.

Auch im N-Terminus des BMP-2, der ebenfalls als Heparinbindungsstelle identifiziert wurde, fallen 6 basische Seitenketten auf. In der BMP-2-Variante EH-BMP-2, die keine hochaffine Bindung mit Heparin mehr eingehen kann, fehlen diese 6 basischen Aminosäurereste. Das legt im Kontext der beschriebenen Literatur die Vermutung nahe, dass diese beiden basischen Tripletts oder einzelne Aminosäuren aus diesen Tripletts für die Heparinbindung verantwortlich sind. Auch wird eine mögliche Bedeutung dieses Motivs deutlich, wenn man die starke Konservierung über die Speziesgrenzen hinweg berücksichtigt. Sowohl im *Xenopus laevis*-BMP2 als auch in *dpp* finden sich die beiden basischen Boxen, und Fragmente davon auch in BMP-3, -5, -7, -8 und GDF-5.

Durch die geballte positive Ladung, die durch die Anordnung in den beiden Tripletts entsteht, erscheint eine Interaktion der basischen Reste mit den negativ geladenen Sulfat- und Carboxylgruppen des Heparinmoleküls wahrscheinlich. Möglich sind aber auch direkte Wechselwirkungen mit den nichtsulfatierten Zuckereinheiten des Heparinmoleküls wie sie für FGF gezeigt wurden (Ornitz, D. M. et al., 1995).

Um die bindungsrelevanten Aminosäurereste zu identifizieren, wurden die beschriebenen BMP-2-Mutanten entworfen. Austausch und Duplikation wurden jeweils mit einem und mit beiden Tripletts durchgeführt, um mögliche Unterschiede in der Abhängigkeit der Bindung von einem der Tripletts erkennen zu können und mögliche Veränderungen in der biologischen Aktivität der Mutanten zu erkennen.

Mit Hilfe der BMP-2-Mutante EH-BMP-2 wurde eine unterschiedliche Bedeutung der EZM unter *in vitro*- und unter *in vivo*-Bedingungen beobachtet. Dies führte zu der Theorie, dass in der *in vitro*-Versuchsanordnung die Bindungsstellen in der EZM mit den Rezeptorbindungsstellen um den Liganden konkurrieren und folglich der Ligand ohne Heparinbindungsstelle in größerem

Ausmaß zur Rezeptorbindung zur Verfügung steht. Das erklärt die in vitro höhere biologische Aktivität von EH-BMP-2 im Vergleich zu BMP-2. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse der in vivo-Versuche. In Ratten subkutan implantiertes EH-BMP-2 zeigte einen geringeren Effekt der ektopischen Knochenbildung als BMP-2. Das ist mit der Theorie konsistent, dass die Matrixbindung in vivo die Aufgabe hat, die Diffusion des sezernierten Faktors im Gewebe lokal zu begrenzen. Sie stellt somit eine Art Corezeptor zum spezifischen Rezeptor des Liganden dar, der den Liganden zuerst niederaffin bindet, um ihn dem hochaffinen Rezeptor zu präsentieren. Wird nun wie im Fall des EH-BMP-2 die Heparinbindungsstelle gegen eine beliebige Sequenz ausgetauscht, kann der Faktor nicht mehr so gut im Gewebe gehalten werden.

Basierend auf dieser Theorie wurden die beschriebenen BMP-2-Konstrukte entworfen, um durch schrittweise Modifizierung der identifizierten Heparinbindungsstelle die Bedeutung der EZM-Bindung für die biologische Funktion des Liganden genauer erfassen zu können.

Die Charakterisierung der BMP-2-Mutanten T3 und T4 erfolgte zunächst wie unter 3.6.1 beschrieben durch Biosensorexperimente. Zunächst zeigte die Analyse der physikalischen Interaktion von T3 und T4 mit der Ektodomäne des ALK-3-Rezeptors im Vergleich mit BMP-2 und EH-BMP-2, dass die Heparinbindungsdomäne die Rezeptorbindung nicht beeinflusst. Das ist eine wichtige Voraussetzung, um die Unterschiede in der Intensität der Heparinbindung und ihren Zusammenhang zur biologischen Aktivität interpretieren zu können.

Im nächsten Schritt zeigte die Untersuchung der Bindung der vier Faktoren an biotinyliertes Heparin eine sehr viel stärkere Bindungsintensität der Duplikationsmutanten als von BMP-2. Das wird deutlich durch den steileren

Anstieg der Bindungskurven mit maximalen RU-Werten, die ca. 2,5 x höher im Fall von T3/4 (ca. 500) als bei BMP-2 (ca. 200) sind.

Dieses Ergebnis legt nahe, dass tatsächlich die basischen Boxen entscheidend für die Heparinbindung verantwortlich sind. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass eine Differenzierung zwischen T3 (Duplikation der zweiten Box) und T4 (Duplikation beider Boxen) in diesem Bindungstest nicht möglich ist. Man kann sogar im Fall von T3 einen geringfügig steileren Anstieg der Kurve erkennen, was einer stärkeren Affinität dieser Mutante zu Heparin gleichkommt. Der geringe Unterschied zwischen den BMP-2-Varianten deutet zwar darauf hin, dass die zweite der beiden basischen Boxen entscheidend für die Bindung ist, andererseits ist eine umfassende Aussage von der physikalischen Messung allein nicht möglich.

Um neben der rein physikalischen Interaktion die biologische Aktivität von T3 und T4 zu analysieren, wurden diese Mutanten auch im unter 3.6.2.1 beschriebenen „limb bud“-Test untersucht. Die hier beobachtete Steigerung der EC50-Werte um mehr als das zweifache bei T3 (29 nM) bzw. das dreifache bei T4 (69 nM) gegenüber BMP-2 (13 nM) bedeutet eine Verminderung der biologischen Aktivität der Mutanten gegenüber BMP-2 in diesem Zellsystem. Dieses Ergebnis mit einer klaren Abstufung der drei EC50-Werte unterstützt das oben erläuterte in vitro-Modell, das aufgrund der bereits durchgeführten Versuche mit EH-BMP-2 etabliert worden ist, dass durch eine verstärkte Bindung an der EZM weniger Ligand für die Rezeptorbindung zur Verfügung steht und so insgesamt eine geringere „Antwort“ auf den Ligand erhalten wird. Auch im Testsystem zur Induktion der Alkalischen Phosphatase in C2C12-Zellen konnte eine deutliche Erhöhung des EC50-Wertes der Mutanten um ca. das 2,5fache beobachtet werden, ebenfalls ein Ergebnis, das mit dem oben vorgestellten Modell konsistent ist. Aber wie auch in den

Biosensorexperimenten kann in diesem Zellsystem ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen T3 (91 nM) und T4 (95 nM) beobachtet werden.

Zellkulturen können eine große Menge an Glycosaminoglycanen produzieren (Ahrens, P. B. et al., 1977). Die Unterschiede in den produzierten Mengen an Glycosaminoglycanen in verschiedenen Zellsystemen und die dadurch unterschiedlich starke Konkurrenz zur Rezeptorbindung des BMP-2 hat die großen Unterschiede in der spezifischen Aktivität des BMP-2 zur Folge.

Mit den beschriebenen Zellkulturversuchen wurde eine Basis für mögliche in vivo-Experimente, wie sie schon mit EH-BMP-2 ausgeführt wurden, geschaffen. Nachdem das Verhalten der T3/T4-Varianten in vitro nicht im Widerspruch zur Theorie über die EZM-Funktion steht, stellen nun Experimente zur ektopischen Knochenbildung in Ratten mit den T3/T4-Varianten die nächste Herausforderung dar. Dabei steht die Frage nach der Funktion der EZM im Vordergrund. Ausgehend von den Beobachtungen mit EH-BMP-2 in den Ratten und aufgrund der in vitro-Ergebnisse wäre hierbei ein mehr lokaler Effekt der Knochenbildung durch T3 und T4 gegenüber BMP-2 zu erwarten, da die Mutanten stärker in der Matrix gebunden werden und ihre Diffusion dadurch stark eingeschränkt ist. Das wiederum würde bedeuten, dass eine geringere Menge an Protein denselben Effekt auslösen könnte.

Aber die spezifische Aktivität von BMP-2 und BMP-2-Mutanten ist von vielen verschiedenen Faktoren abhängig, die sich nicht beeinflussen lassen und die letztlich einem in vitro-Zellkultursystem nur eine begrenzte Aussagekraft geben. Folglich ist eine einfache Übertragung auf in vivo-Verhältnisse nicht möglich.

Da in der letzten Zeit immer mehr Funktionen von BMPs aufgeklärt werden, macht gleichzeitig auch die Entdeckung ihrer medizinischen und therapeutischen Relevanz und von Mutationen ihrer Rezeptoren bei bestimmten Krankheiten große Fortschritte. Auch die Diskussion um einen

möglichen therapeutischen Einsatz modifizierter BMPs wurde durch die Einführung zahlreicher genetischer und biochemischer Methoden vorangetrieben.

Neben der Beteiligung von BMP-6 an der Entstehung von Psoriasis (zitiert in Reddi, A. H., 1998) und den bereits ausführlich beschriebenen Entwicklungsdefekten bei Fehlen verschiedener BMPs, können pathologische Expressionsmuster von BMPs und BMP-Rezeptoren zur Krankheitsentstehung führen.

Bei der pathologischen Verknöcherung des Ligamentum flavum, die durch Kompression von Rückenmark und Nervenwurzeln zur Myeloradikulopathie führt, wurde eine Überexpression von BMPs und BMP-Rezeptoren gefunden. Sowohl in direkter Nähe zur kalzifizierten Zone, wo die endochondrale Ossifikation vorwiegend stattfindet, als auch in einiger Entfernung zu ihr, wurde die Überexpression dieser Faktoren und ihrer Rezeptoren in der Patientengruppe im Gegensatz zur gesunden Kontrollgruppe beobachtet (Hayashi, K. et al., 1997). Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei der pathologischen Verknöcherung des Ligamentum longitudinale posterior (OPLL) gefunden (Yonemori, K. et al., 1997). Da die Expressionsmuster dieser beiden Krankheitsphänomene fast identisch sind, liegt die Vermutung nahe, dass die BMPs und BMP-Rezeptoren kausal beteiligt sind (Hayashi, K. et al., 1997).

Seit kurzer Zeit steht besonders die durch rekombinante Proteine auslösbare „Gewebekonstruktion“ des Knochens, das sog. tissue engineering, im Mittelpunkt des Interesses. Durch die Implantation von BMPs auf einer geeigneten Matrix in nichtknochenhaltiges Gewebe, kann eine ektopische Knochenbildung ausgelöst werden. Wird nun in die Hohlform eines Femurkopfes Muskelgewebe eingebracht und anschließend BMPs injiziert, bildet sich in der Hohlform Knochen, der genau die Form eines Femurkopfes hat (Reddi, A. H., 1998). Da originales Knochengewebe aufgrund der besseren

Verträglichkeit immer künstlichen Materialien vorzuziehen ist, stellt dieses bis jetzt nur an der Ratte erprobtes Verfahren sicher ein Transplantationsverfahren mit Zukunft dar.

Besonderes Interesse findet auch die Redifferenzierung von degeneriertem Knorpelgewebe durch BMPs, TGF β Isoformen u.a., da dieses Gewebe im Gegensatz zu Knochengewebe nicht die Fähigkeit zur Selbstregeneration besitzt. Das spielt v.a. eine Rolle bei schweren Fällen von Gelenkknorpeldegeneration (Reddi, A. H., 1998).

Gerade für das Ziel einer therapeutischen Anwendung ist aus finanziellen Gründen eine möglichst geringe Menge an erforderlichem Protein die Voraussetzung für die Umsetzung in die Realität. Auch können eventuell auftretende Nebenwirkungen durch eine geringere Dosis so niedrig wie möglich gehalten werden. Aus diesem Grund spielen modifizierte Proteine, die durch stärkere Bindung an Bestandteile der Matrix die physiologische Funktion der EZM ausnutzen, möglicherweise in der Zukunft eine größere Rolle.

5 Zusammenfassung

Das Zytokin Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) gehört als Mitglied der Transforming Growth Factor β -Superfamilie zu einer großen Gruppe eng verwandter Wachstums- und Differenzierungsfaktoren. Es spielt eine entscheidende Rolle bei Bildung und Regeneration von Knorpel und Knochen und während verschiedener Prozesse der embryonalen Entwicklung. Durch Sezernierung des Proteins und anschließende Diffusion in der extrazellulären Matrix (EZM) ausgehend vom Ort der Sekretion unterliegt sein Wirkungsgrad einem abnehmenden Konzentrationsgradienten. BMP-2 bindet neben der hochaffinen Bindung an seinen spezifischen Rezeptor unter anderem auch an die extrazelluläre Matrix. So konnte in Vorarbeiten bereits durch Deletion der basischen Heparinbindungsstelle des BMP-2, die sich im N-terminalen Bereich befindet, eine Wirkungsverstärkung des Proteins in einem *in vitro*- Experiment, dem Hühnergliedmaßentest, erreicht werden, da die konkurrierende Bindung an Heparinbindungsstellen der EZM wegfällt.

Im Tiermodell konnte jedoch ein genau umgekehrter Effekt dieser Mutante im Vergleich mit dem Wildtyp gezeigt werden, da *in vivo* die Diffusion des Moleküls durch Bindung an die EZM begrenzt und es so lokal an seinem Wirkungsort konzentriert wird.

Von diesen Vorbefunden ausgehend war das Ziel der Arbeit die Klonierung und Expression von Mutanten des BMP-2, bei denen durch schrittweise Modifizierung der Heparinbindungsstelle die Bindung des Proteins an Heparin und deren Einfluß auf die Rezeptorbindung charakterisiert werden sollte.

Dazu wurden zwei Mutanten des BMP-2 mit Verdopplung eines bzw. beider basischer Aminosäuretripletts kloniert, da diesem basischen Bereich im N-Terminus die eigentliche Bindung an Heparin zugeschrieben wird. Nach

Expression, Renaturierung und säulenchromatographischer Aufreinigung der Proteine konnte in dieser Arbeit in drei verschiedenen funktionellen in vitro-Tests eine abnehmende Wirkung der Mutanten gezeigt werden. Neben dem biophysikalischen Nachweis der apparenten Affinitäten der Mutanten zu Rezeptor und Matrix in Biacore-Messungen konnte die Änderung des Wirkungsgrades auch in einem Zellkulturassay mit einer Maus-Fibroblasten-Zelllinie durch Messung der Alkalischen Phosphatase und im Hühnergliedmaßentest gezeigt werden. In in vivo Experimenten bleibt eine entsprechende zu erwartende Wirkungsverstärkung dieser beiden Mutanten nachzuweisen, die im Hinblick auf einen therapeutischen Einsatz bei gewünschtem Ersatz zerstörten Knochens relevant werden könnte.

6 Literaturverzeichnis

A

- Ahrens, M., Ankenbauer, T., Schröder, D., Hollnagel, A., Mayer, H., Gross, G. (1993), DNA Cell Biol. 12, 971-880.
- Ahrens, P.B., Solursh, M., Meier, S. (1977), J Exp Zool 202, 375-388.
- Ahrens, P.B., Solursh, M., Reiter RS (1997), Dev Biol 60, 69-82.
- Assoian, R. K., Komoriya, A., Meyers, C. A., Miller, D. M., Sporn, M. B. (1983), J. Biol. Chem. 258, 7155-7160.
- Attisano, L., Wrana, J. L., Lopez-Casillas, F., Massague, J. (1994), Biochem. Biophys. Acta 1222, 71-80.
- Aoyama, H., Naka, D., Yoshiyama, Y., Ishii, T., Kondo, J., Mitsuka, M., Hayase, T. (1997), Biochemistry 1997, 36, 10286-10291.

B

- Bellusci, S., Henderson, R., Winnier, G., Oikawa, T., Hogan, B. L. M. (1996), Development 122, 1693-1702.
- Benninghoff, A. (1994), Anatomie, 15. Auflage, Urban und Schwarzenberg, München 1994.
- Bernfield, M., Kokenyesi, R., Kato, M., Hinkes, M. T., Spring, J., Gallo, R. L., Lose, E. J. (1992), Annu. Rev. Cell. Biol. 8, 365-393.
- Bernier, S. M., Goltzmann, D. (1992), J. Cell. Physiol. 152, 317-327.

Bitgood, M. J., McMahon, A. P. (1995), *Dev. Biol.* 172, 126-138.

Burt, D. W., Law, A. S. (1994), *Prog. Growth Factor Res.* 5, 99-118.

C

Carrington, J.L., Reddi, A.H. (1990), *Exp Cell Res* 186, 368-373.

Carrington, J. L., Chen, P., Yanagishita, M., Reddi, A. H. (1991), *Dev. Biol.* 146, 406-415.

Celeste, A.J., Iannazzi, J.A., Taylor, R.C., Hewick, R.M., Rosen, V., Wang, E.A., Wozney, J.M. (1990), *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 9843-9847.

Chen, P., Carrington, J. L., Hammonds, R. G., Reddi, A. H. (1991), *Exp. Cell Res.* 195, 509-515.

Chen P., Carrington, J. L., Paralkar, V. M., Pierce, G. F., Reddi, A. H. (1992), *Exp. Cell Res.* 200, 110-117.

Chen, P., Yu, M., Reddi, A. H. (1993), *Exp. Cell Res.* 206, 119-127.

Cohn, M. J., Izpisua-Belmonte, J. C., Abud, H., Heath, J. K., Tickle, C. (1995), *Cell* 80, 739-746.

D

Daopin, S., Davies, D. R. (1993), *Proteins: Structure, Function and Genetics* 17, 176-192.

Daopin, S., Piez, K. A., Ogawa, Y., Davies, D. R. (1992), *Science* 257, 369-373.

De Robertis, E. M., Sasai, Y. (1996), *Nature* 380, 37-40.

Dudley, A. T., Lyons, K. M., Robertson, E. J. (1995), *Genes and Dev.* 9, 2795-2807.

Dyson, S., Gurdon, J. B. (1997), *Curr. Biol.* 7, 81-84.

F

Ferguson, E. L., Anderson, K. V. (1992a), *Development* 114, 583-597.

Ferguson, E. L., Anderson, K. V. (1992b), *Cell* 71, 451-461.

Ferguson, E. L. (1996), *Curr. Op. Genet. Dev.* 6, 424-431.

Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V., Kurolesova, A. I., Frolora, G. P. (1968), *Transplantation* 6, 230-247.

G

Gentry, L. E., Liobin, M. N., Purchio, A. F., Marquardt, H. (1988), *Mol. Cell. Biol.* 8, 4162-4168.

Green, E. L., Green, M. C. (1942), *J. Morphol.* 70, 1-19.

Green, M. C. (1968), *J. Exp. Zool.* 167, 129-150.

Griffith, D. L., Keck, P. C., Sampath, T. K., Rueger, D. C., Carlson, W. D. (1996), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 93, 878-883.

H

- Hanamura, H., Higuchi, Y., Nakagawa, M., Iwata, H., Nogami, H., Urist, M. R. (1980a), Clin. Orthop. 148, 281-290.
- Hanamura, H., Higuchi, Y., Nakagawa, M., Iwata, H., Urist, M. R. (1980b), Clin. Orthop. 153, 232-240.
- Hayashi, K., Ishidou, Y., Yonemori, K., Nagamine, T., Origuchi, N., Maeda, S., Imamura, T., Kato, M., Yoshida, H., Sampath, T.K., ten Dijke, P., Sakou, T. (1997), Bone 21, 23-30.
- Heldin, C. H., Miyazono, K., ten Dijke, P. (1997), Nature 390, 465-471.
- Henis, Y. I., Moustakas, A., Lin, H. Y., Lodish, H. (1994), J. Cell Biol. 126, 139-154.
- Hoffmann, F. M. (1990), Gen. Pattern Growth Control, 103-124.
- Hogan, B. L. M. (1996), Genes and Development 10, 1580-1594.
- Hoodless and Wrana-Review 1997

I

- Irish, V. F., Gelbart, W. M. (1987), Genes Dev. 1, 868-879.
- Israel, D. I., Nove, J., Kerns, K. M., Moutsatsos, I. K., Kaufmann, R. J. (1992), Growth Factors 7, 139-150.

J

Jones, C. M., Lyons, K. M., Lapan, P. M., Wright, C. V. E., Hogan, B. L. M. (1992), *Development* 115, 639-647.

K

Katagiri, T., Yamaguchi, A., Ikeda, T., Yoshiki, S., Wozney, J. M., Rosen, V., Wang, E. A., Tanaka, H., Omura, S., Suda, T. (1990), *Biol. Biochem. Res. Commun.* 172, 295-299.

Katagiri, T., Yamaguchi, A., Komaki, M., Abe, E., Takahashi, M., Ikeda, T., Rosen, V., Wozney, J. M., Fujisawa-Sekara, A., Suda, T. (1994), *J. Cell Biol.* 127, 1755-1766.

King, J., Marker, P. C., Seung, K. S., Kingsley, D. M. (1994), *Dev. Biol.* 166, 112-122.

Kingsley, D. M. (1994a), *Genes Dev.* 8, 133-146.

Kingsley, D. M. (1994b), *Trends Gen.* 10, 16-21.

Kingsley, D. M., Bland, A. E., Grubber, J. M., Marker, P. C., Russell, L. B., Copeland, M. G., Jenkins, N. A. (1992), *Cell* 71, 399-410.

L

- La Croix, P. (1945), *Nature* 156, 576.
- Laufer, E., Nelson, C. E., Johnson, R. L., Morgan, B. A., Tabin, C. (1994), *Cell* 79, 993-1003.
- Lemaire, P., Garrett, N., Gurdon, J. B. (1995), *Cell* 81, 85-94.
- Lennon, D.P., Osdooby, P., Carrino, D.A., Vertel, B.M., Caplan, A.I. (1983), *Dev Biol* 99, 132-144.
- Lopez-Casillas, F., Wrana, J. L., Massague, J. (1993), *Cell* 73, 1435-1444.
- Luo, G., Hofmann, C., Bronckers, A. L. J. J., Sohocki, M., Bradley, A., Karsenty, G. (1995), *Genes and Dev.* 9, 2808-2820.
- Lustig, F., Hoebeke, J., Östergren-Lunden, G., Velge-Roussel, F., Bondjers, G., Olsson, U., Rüetschi, U., Fager, G. (1996), *Biochemistry* 1996, 35, 12077-12085.
- Lustig, F., Hoebeke, J., Östergren-Lunden, G., Velge-Roussel, F., Bondjers, G., Olsson, U., Rüetschi, U., Fager, G. (1996), *Biochemistry* 1996, 35, 12077-12085.
- Lynch, C. J. (1921), *Am. Nat.* 55, 421-426.
- Lyons, K. M., Pelton, R. W., Hogan, B. L. M. (1989), *Genes Dev.* 3, 1657-1668.
- Lyons, K. M., Pelton, R. W., Hogan, B. L. M. (1990), *Development* 109, 833-844
- Lyons, K. M., Hogan, B. L. M., Robertson, E. J. (1995), *Mech. Dev.* 50, 71-83.

M

- Massague, J. (1990), Annu Rev Cell Biol 6; 597-641.
- Massague, J. (1990), J Biol Chem 265, 21393-6.
- Massague, J., Attisano, L., Wrana, J. (1994), Trends Cell. Biol. 4, 172-178.
- Massague, J., Hata, A., Liu, F. (1997), Trends Cell Biol. 7, 187-192.
- Massague, J. (1998), Ann. Rev. Biochem. 67, 753-91.
- McDonald, N.Q., Hendrickson, W. A. (1993), Cell 73, 421-424.
- Meagher, J. L., Huntington, J. A., Fan, B., Gettins, P. G. W. (1996), The Journal of Biological Chemistry 271, No. 46, 29353-29358.
- Moser, M. (1994), Diplomarbeit Würzburg

N

- Niswander, L., Jeffrey, S., Martin, G. R., Tickle; C. (1994), Nature 371, 609-612.

O

- Ogata, T., Wozney, J. M., Benezra, R., Noda, M. (1993), Proc. Natl. Acad. Science USA 90, 9219-9222.

Ohta, S., Hiraki, Y., Shigeno, C., Suzuki, F., Kasai, R., Ikeda, T., Kohno, H., Lee, K., Kikuchi, H., Konishi, J., Bentz, H., Rosen D. M., Yamamoto, T. (1992), FEBS 314, 356-360.

Ornitz, D. M. Herr, A. B., Nilsson, M., Westman, J., Svahn, C. M., Waksman, G. (1995) Science 268, 432 – 436.

Owen, M. E., Friedenstein, A. J. (1988), CIBA Foundation Symposium 136, 42-60.

P

Paralkar, V.M., Nandedkar, A.K., Pointer, R.H., Kleinman, H.K., Reddi, A.H. (1990), J Biol Chem 265, 17281-4.

R

Reddi, A. H., Huggins, C. B. (1972), Proc. Nat. Acad. Science USA 69, 1601-1605.

Reddi, A. H., Huggins, C. (1975), Proc. Natl. Acad. Science USA 72, 2212.

Reddi, A.H. (1997), Cytokine Growth Factor Rev. 8, 11-20.

- Reddi, A. H. (1981), *Coll. Rel Res.* 1, 209-226.
- Reddi, A. H. (1984), *Extracellular Matrix Biochemistry*, KA Piez, Reddi A. H., eds. New York, Elsevier, 1984, 375-412.
- Reddi, A.H., Cunningham, N.S. (1990) *Biomaterials* 11, 33-34.
- Reddi, A. H. (1998), *Nature Biotechnology* 16, 247-252.
- Re`em-Kalma, Y., Lamb, T., Frank, D. (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 12141-12145.
- Riddle, R. D., Johnson, R. L., Laufer, E., Tabin, C. (1993), *Cell* 75, 1401-1416.
- Roberts, A. B., Sporn, M. B. (1988), *Adv. Cancer Res.* 51, 107-145.
- Ruppert, R., Hoffmann, E., Sebald, W. (1996), *Eur. J. Biochem.* 237, 295-302.

S

- Sampath, T. K., Reddi, A. H. (1981), *Proc, Natl. Acad. Science USA* 78, 7599-7603.
- Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H., De Robertis, E. M. (1995), *Nature* 376, 333-336.
- Sasisekharan, R., Venkataraman, G., Godavarti, R., Ernst, S.; Cooney, C. L., Langer, R. (1996), *J. Biol. Chemistry* 271, 3124-3131.
- Scheufler, C., Sebald, W., Hülsmeier, M. (1999), *J.Mol.Biol.* 287, 103-115.
- Schmidt, J. E., Suzuki, A., Ueno, N., Kimelman, D. (1995), *Dev. Biol.* 169, 37-40.
- Schmidt, J. E., Francois, V., Bier, E., Kimelman, D. (1995), *Development* 121, 4319-4328.

Spivak-Kroizman, T., Lemmon, M. A., Dikic, I., Ladbury, J. E., Pinchasi, D.,
Huang, J., Jaye, M., Crumley, G., Schlessinger, J., Lax, I. (1994), *Cell* 79,
1015-1024.

Studier, F. W. und Moffatt, B. A., 1986

T

Tabin, C. (1995), *Cell* 80, 671-674.

Takuwa, Y., Ohse, C., Wang, E. A., Wozney, J. M., Yamashita, K. (1991), *Biol.
Biochem. Res. Commun.* 174, 96-101.

ten Dijke, P., Franzen, P., Yamashita, H., Ichijo, H., Heldin, C. H., Miyazono, K.
(1994a), *Prog. Growth Fac. Res.* 5, 55-72.

ten Dijke, P., Miyazono, K., Heldin, C. H. (1996), *Curr. Opin. Cell. Biol.* 8, 139-
145.

Thies, R. S., Bauduy, M., Ashton, B. A., Kurzberg, L., Wozney, J. M., Rosen, V.
(1992), *Endocrinology* 130, 1318-1324.

Tickle, C. A., Summerbell, D., Wolpert, L. (1975), *Nature* 254, 199-202.

Tuan, T.-L., Cheung, D. T., Wu, L.-T., Yee, A., Gabriel, S., Han, B., Morton, L.,
Nimni, M. E., Hall, F. L. (1996), *Connective Tissue Research* 34, No.1, 1-9.

U

Urist, M. R. (1965), *Science* 150, 893-899.

V

Vahtokari, A., Abert, T., Jernvall, J., Keranen, S., Thesleff, I. ((1996a), Mech. Dev 54, 39-43.

Vahtokari, A., Abert, T., Thesleff, I. (1996b), Development 122, 121-129.

Vainio, S., Karavanova, I., Jowett, A., Thesleff, I. (1993), Cell 75, 45-58.

Vincent, J. P., Gerhart, J. C. (1987), Dev. Biol. 123, 526-539.

W

Wang, E.A., Rosen, V., Cordes P., Hewick R.M., Kriz M.J., Luxenberg, D.P., Sibley, B.S., Wozney, J.M. (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 9484-9488.

Wang, E. A., Rosen, V., D`Alessandro, J. S., Bauduy, M., Cordes, P., Harada, T., Israel, D., Hewick, R. M., Kerns, K., LaPan, P., Luxenberg, D. P., McQuaid, D., Moutsatsos, J., Nove, J., Wozney, J. M. (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 2220-2224.

Winnier, G., Blessing, M., Labosky, P. A., Hogan, B. L. M. (1995), Genes Dev.9, 2105-2116.

Wozney, J. M., Rosen, V., Celeste, A. J., Mitsock, L. M., Whitters, M. J., Kriz, R. W., Hewick, R. M., Wang, E. A. (1988), Science 242, 1528-1534.

Wrana, J. L., Attisano, L., Wiesner, R., Ventura, F., Massague, J. (1994b), Nature 370, 341-347.

Y

Yamaguchi, A., Katagiri, T., Ikeda, T., Wozney, J. M., Rosen, V., Wang, E. A., Kahn, A. J., Suda, T., Yoshiki, S. (1991), *J. Cell Biol.* 113, 681-687.

Yonemori, K., Imamura, T., Ishidou, Y., Okano, T., Matsunaga, S., Yoshida, H., Kato, M., Sampath, T.K., Miyazono, K., ten Dijke, P., Sakozu, T. (1997), *Am J Pathol* 150, 1335-1347.

Z

Zhang, H., Bradley, A. (1996), *Development* 122, 2977-2986.

Zheng, M. H., Wood, D. J., Wysocki, S., Papadimitriou, J. M., Wang, E. A. (1994), *J. Cell. Physiol.* 159, 76-82.

Friederike Vogel
Sonnenblickallee 13/802
35039 Marburg
Tel. dienstlich: 06421 / 2891919
Tel. privat: 0171 / 1206826
E-Mail dienstlich: vogelf@med.uni-marburg.de
E-Mail privat: rikevogel@gmx.net

Würzburg, den 10.11.02

Sehr geehrte Damen und Herren,

hiermit beantrage ich meine Zulassung zur Promotion (angestrebter
Doktorgrad: Dr. med., Fachgebiet: Physiologische Chemie, Humanmedizin).

Mit freundlichen Grüßen,

Friederike Vogel

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Friederike Vogel, dass ich die Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Diese Dissertation wurde noch nie, vollständig oder teilweise, einer anderen Fakultät vorgelegt, mit dem Ziel einen akademischen Grad zu erwerben. Weiterhin erkläre ich, dass ich nicht bereits früher akademische Grade erworben oder zu erwerben versucht habe, mir kein akademischer Grad entzogen wurde und kein strafrechtliches Ermittlungsverfahren oder ein Disziplinarverfahren gegen mich eingeleitet wurde.

Würzburg, den

Friederike Vogel

Fachgebiet und Prüfer für die mündliche Prüfung:
Humangenetik, Prof. Dr. rer. nat. C-R. Müller-Reible

Referent: Prof. Dr. rer. nat. W. Sebald

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. C.R. Müller-Reible

Dekan: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung:

Die Promovendin ist Ärztin

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben:

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Sebald für die Möglichkeit, diese medizinische Doktorarbeit an seinem Lehrstuhl für Physiologische Chemie II anfertigen zu können, für stete Präsenz und sein Interesse am Fortgang der Arbeit.

Ganz herzlich danke ich auch Dr. Thomas Kirsch und Dr. Joachim Nickel für die Betreuung der Arbeit im Labor. Ganz besonderer Dank gilt Joachim Nickel für viele Tipps und Tricks an der „bench“ und viele lehrreiche und lustige Stunden, besonders für die Geschichten aus der Ladenburger Zeit.

Alexandra Will danke ich besonders für die Hilfe bei der Proteinaufreinigung, ihre große Geduld mit mir und viele lustige Mittags- und Kaffeepausen.

Weiterhin danke ich allen anderen Mitarbeitern, vor allem Thomas Hom, Irina Witek und Angelika Wagner, Christian Söder und Johannes Kobler für große Hilfsbereitschaft und Kollegialität.

Ganz besonders danke ich Martin Roth für seine unendliche Geduld und Hilfsbereitschaft, für viele Anregungen, Kritik und für ungezählte Tipps, Tricks und Hilfestellungen zu Klonier-, Computer- und vielen anderen Fragen und vor allem für eine sehr schöne Zeit.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern und meinem Bruder an dieser Stelle für ihre stete Unterstützung und Hilfsbereitschaft während des ganzen Studiums.

Lebenslauf

Angaben zur Person:

Name: Friederike Vogel
Wohnort: Sonnenblickallee 13/802
35039 Marburg

Geburtsdatum: 04.03.1975
Geburtsort: Freiburg
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1981-1985 Besuch der Meinloh-Grundschule Ulm
1985-1994 Besuch des Humboldt-Gymnasiums Ulm,
Abitur 1994

Berufsausbildung:

WS 1994/95 Studium der Musikwissenschaften an der Ludwig-
Maximilians-Universität München

SS 1995 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,

03/1997 Physikum

03/1998 1. Staatsexamen

09/2000 2. Staatsexamen

10/2000-09/2001

Praktisches Jahr

1. Tertial: Neurol. Universitätsklinik Würzburg
(Neurologie)
2. Tertial: University of Louisville, KY, USA und
Med. Poliklinik der Universität Würzburg
(Innere Medizin)
3. Tertial: Kantonsspital Luzern, Schweiz
(Chirurgie)

Seit 01/2002

Arzt im Praktikum an der Neurol. Universitätsklinik
Marburg

Famulaturen:

09/1997 Famulatur am Rosmann-Krankenhaus Breisach (Innere Medizin)

03/1999 Famulatur in der Praxis Dr. Gröger, Würzburg (Chirurgie)

08/1999 Famulatur am Royal Devon and Exeter Hospital, Exeter, England
(Neurologie)

09/1999 Famulatur an der Mönchberg-Kinderklinik Würzburg (Pädiatrie)

Promotion:

04/1998-11/1998

Experimenteller Teil der Arbeit am Lehrstuhl für
Physiologische Chemie II, Universität Würzburg
Doktorvater Prof. Dr. W. Sebald

Würzburg, den 10.12.02

Friederike Vogel