

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

Expression und Isolierung des BMP-bindenden Proteins Ep45

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Nikola Nussel
aus Würzburg**

Würzburg, März 2005

Referent: Prof. Dr. W. Sebald

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. dent. K. Würzler

Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Oktober 2005

Die Promovendin ist Ärztin

Matthias und meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Knochenentwicklung der Wirbeltiere	1
1.2	BMPs als Mitglieder der TGF- β Superfamilie	4
1.3	BMPs als wichtige Faktoren in der Knochenentwicklung	6
1.4	BMPs als wichtige Faktoren in der Embryogenese	7
1.5	Extrazelluläre Liganden der BMPs	10
1.6	Das BMP-bindende Protein Ep45	11
1.7	Zielsetzung dieser Arbeit	14
2	MATERIAL UND METHODEN	16
2.1	Chemikalien und Enzyme	16
2.2	Bakterien- und Insektenzellstämme	16
2.2.1	Escherichia coli-Stämme	16
2.2.2	Zelllinien	16
2.3	Vektoren	17
2.4	Oligonukleotide	17
2.5	Antikörper	18
2.6	Mikrobiologische und molekulargenetische Methoden (<i>E. coli</i>)	18
2.6.1	Kulturbedingungen	18
2.6.2	Plasmidisolierung	19
2.6.2.1	Plasmid-Minipräparation	19
2.6.2.2	Plasmid-Maxipräparation	20
2.6.3	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	20
2.6.4	DNA-Agarose-Gelelektrophorese	21
2.6.5	Ligation von DNA-Fragmenten	22
2.6.6	Transformation von <i>E. coli</i>	22
2.6.6.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	22
2.6.6.2	Transformation kompetenter Zellen	22
2.6.7	Polymerase chain reaction (PCR)	23
2.6.8	Automatisierte DNA-Sequenzierung	23
2.6.9	Expression von rekombinanten Proteinen in <i>E. coli</i>	24
2.6.10	Präparation von <i>inclusion bodies</i>	25
2.6.11	Denaturierung der <i>inclusion bodies</i> mit Harnstoff	25
2.6.12	Denaturierung der <i>inclusion bodies</i> mit Guanidiniumhydrochlorid (Gnd-HCl)	25
2.6.13	Renaturierung von Proteinen	26

2.7	Mikrobiologische und molekulargenetische Methoden (<i>Sf9</i>-Zellen)	28
2.7.1	Kulturbedingungen	28
2.7.2	InsectSelect™ System.....	28
2.8	Chromatographische Verfahren zur Trennung von Proteinen	29
2.8.1	Kationenaustausch-Chromatographie an Fractogel EMD SO ₃ ⁻ 650 (S)	29
2.8.2	Größenausschluss-Chromatographie an Sephacryl S-300	29
2.8.3	Amylose-Affinitäts-Chromatographie.....	30
2.8.4	Chromatographie an Ni-NTA-Agarose.....	30
2.8.5	Chromatographie an Phenyl Sepharose (Hydrophobe Säule).....	31
2.8.6	Anionenaustausch-Chromatographie an Fractogel EMD TMAE.....	31
2.9	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	32
2.9.1	Coomassie-Blau-Färbung	33
2.9.2	Silberfärbung	33
2.9.3	Protein-Größenstandards für SDS-PAGE.....	34
2.10	Western Blot	35
2.11	Tests zur Überprüfung der Aktivität von Ep45	36
2.11.1	Enzym-Assay	36
2.11.2	Bindungsassay Ep45-Chymotrypsin.....	37
3	ERGEBNISSE	38
3.1	Expression von Ep45 in <i>E. coli</i>	38
3.1.1	Expression von Ep45 mit dem Vektor pET25b(+)	38
3.1.1.1	Transformation und Induktion der Genexpression.....	38
3.1.1.2	Chromatographie des Zellextraktes an einer Fractogel EMD SO ₃ ⁻ -Säule	39
3.1.1.3	Präparation und Denaturierung der <i>inclusion bodies</i> , Renaturierungsversuche.....	40
3.1.2	Expression von Ep45 mit dem pMal™-Fusionsprotein-System.....	47
3.1.2.1	Herstellung des Plasmids pMalp2X-Ep45	48
3.1.2.2	Isolierung von MBP-Ep45 durch verschiedene Chromatographie-Verfahren.....	49
3.2	Expression von Ep45 in <i>Sf9</i>-Zellen	53
3.2.1	Herstellung des Plasmids pIZT/V5-xEp45	53
3.2.2	Transiente Expression von Ep45 in <i>Sf9</i> -Zellen	54
4	DISKUSSION	56
4.1	Expression von Ep45 in <i>E. coli</i>	56
4.1.1	Expression von Ep45 mit dem Vektor pET25b-xEp45.....	57
4.1.2	Expression von Ep45 mit dem pMal™-Fusionsprotein-System.....	59
4.2	Expression von Ep45 in <i>Sf9</i>-Zellen	61
5	ZUSAMMENFASSUNG	63
6	LITERATURVERZEICHNIS	65

7	ANHANG.....	70
7.1	Abkürzungsverzeichnis	70
7.2	Vektoren.....	72
7.2.1	pET25b-xEP45	72
7.2.2	pMalp2X-EP45	73
7.2.3	pIZT/V5-xEP45	74

Danksagung

Lebenslauf

1 Einleitung

1.1 Die Knochenentwicklung der Wirbeltiere

Das Skelettsystem stellt zusammen mit knorpeligen Bestandteilen und dem Bandapparat den passiven Teil des Bewegungsapparats der Wirbeltiere dar. Die Knochenentwicklung während der Embryogenese ist ein komplexer Prozess, dessen molekulare Mechanismen ein interessantes Gebiet für die biochemische und medizinische Forschung darstellt. Verschiedenste Zelltypen müssen dabei interagieren, wobei Wachstums- und Differenzierungsfaktoren eine wichtige Rolle spielen. Knochen ist kein lebloses Gewebe, sondern erfährt während des ganzen Lebens Auf- und Abbauprozesse, die auf molekularer Ebene gesteuert werden müssen.

Knochen gehört zum Bindegewebe und besteht aus Knochenzellen und Interzellulärsubstanz. Zu den Knochenzellen gehören die Vorläuferzellen mesenchymaler Herkunft, die zeitlebens vorhanden sind und eine starke proliferative Aktivität aufweisen. Eine weitere Zellart sind die Osteoblasten, die die organischen Bestandteile der Interzellulärsubstanz, das Osteoid, synthetisieren. Aus Osteoblasten entstehen Osteozyten, die von verkalkter Interzellulärsubstanz umgeben sind und für die Erhaltung des Knochens sorgen. Vielkernige Osteoklasten sind die größten Knochenzellen und dienen dem Abbau von Interzellulärsubstanz. Sie entstehen aus der Verschmelzung mononukleärer Monozyten des hämatopoetischen Systems und gehören somit zum mononukleären Phagozytosesystem. Die Interzellulärsubstanz des Knochens besteht aus ca. 50 % Mineralien, ca. 25 % organischen Verbindungen und ca. 25 % Hydratationswasser. Der Mineralienanteil setzt sich hauptsächlich aus anorganischem Phosphat (ca. 50 %) und Kalzium (ca. 35 %) zusammen, daneben kommen geringe Mengen von Ziträt, Karbonat, Nitrat, Natrium, Magnesium, Fluor und Spurenelemente vor. Die Mineralien liegen überwiegend in Form von Hydroxylapatitkristallen ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) vor. Die organischen Bestandteile des Knochens umfassen Kollagenfasern (ca. 90-95 %), Proteine wie Osteonektin und Osteocalcin und Glykosaminoglykane (v.a. Chondroitin-4-sulfat, Chondroitin-6-sulfat, Keratansulfat). Histologisch differenziert man zwischen Geflechtknochen und Lamellenknochen. Beide Knochenarten bestehen aus den gleichen oben aufgeführten Grundsubstanzen. Im

2 Einleitung

Geflechtknochen lässt sich keine regelmäßige Anordnung von Knochenzellen und Kollagenfasern erkennen. Er entsteht bei jeder Knochenneubildung und ist besonders stabil gegenüber Zug und Biegung. Meistens wird er im Verlauf der Knochenneubildung durch Lamellenknochen ersetzt, bei dem Knochenzellen und Kollagenfasern systematisch zu Osteonen angeordnet sind.

Bei der Knochenentwicklung muss zwischen desmaler und chondraler Ossifikation unterschieden werden. Bei der desmalen Ossifikation entsteht Knochen direkt aus Mesenchym. Mesenchymzellen vermehren sich im embryonalen Bindegewebe und beginnen als Osteoblasten mit der Synthese von Interzellulärsubstanz. Durch die Mineralisation der Interzellulärsubstanz werden die Zellen, jetzt Osteozyten, ringsum von Knochengrundsubstanz umgeben und stehen nur noch durch ihre Fortsätze untereinander in Verbindung. Die Ausbildung der perichondralen Knochenmanschette der Röhrenknochen und einiger Schädelknochen sowie die Knochenbildung nach Frakturen erfolgt auf diese Art.

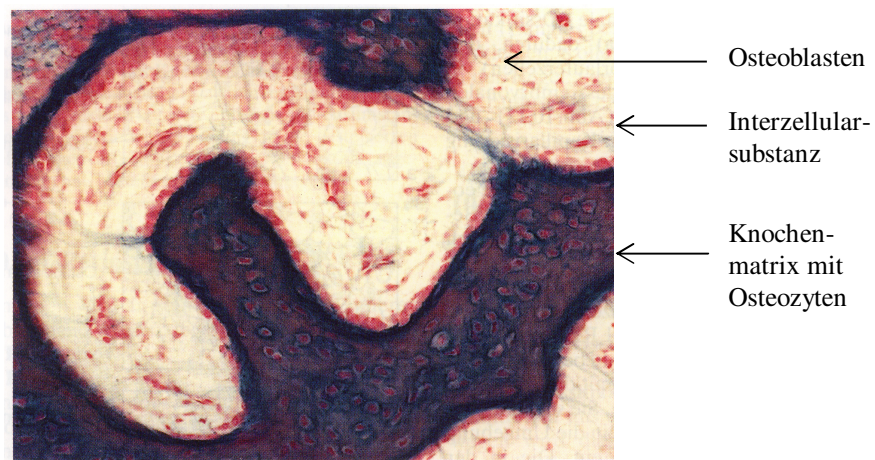


Abb. 1 Desmale Ossifikation (Mikrophotographie eines Schädels einer jungen Ratte, Azanfärbung, 600fach vergrößert). Erkennbar ist Knochenmatrix mit eingelagerten Osteozyten. Die Matrix-Oberfläche ist von Osteoblasten gesäumt. (Junqueira und Carneiro, 1996)

Bei der chondralen Ossifikation wird Knochen anhand eines Knorpelmodells gebildet. Dies findet vor allem im Bereich der Epiphysenfugen statt. Die Zellen des Modells aus hyalinem Knorpel werden durch Ablagerung von Hydroxylapatitkristallen in ihrer Ernährung gestört. Die Knorpelzellen sterben ab und der verkalkte Knorpel wird von Chondroklasten abgebaut. In dieses Gebiet wachsen Blutkapillaren und Vorläuferzellen

ein, die zu Osteoblasten differenzieren und Interzellulärsubstanz synthetisieren. Letztlich entsteht Geflechtknochen, der später von Lamellenknochen ersetzt wird. (Junqueira und Carneiro, 1996)

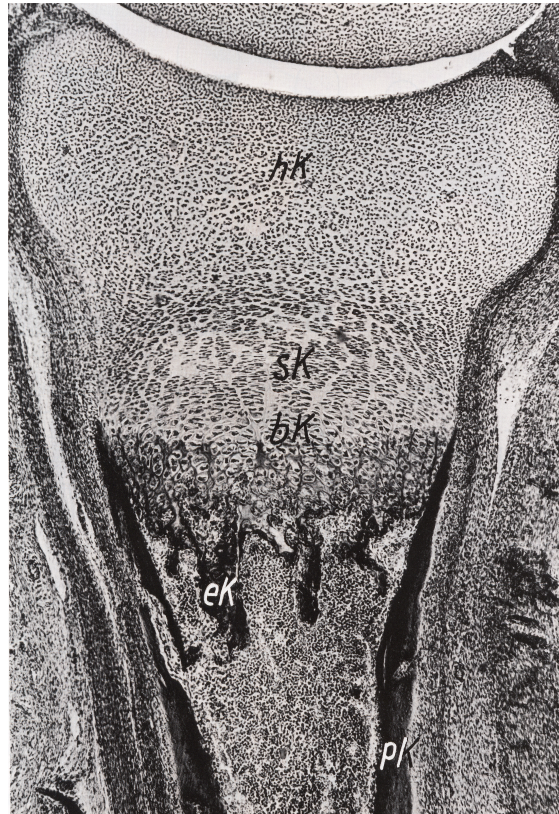


Abb. 2 Enchondrale Ossifikation (Finger-Längsschnitt eines ca. 4 Monate alten menschlichen Embryos, 100fach vergrößert). hK hyaliner Knorpel der Epiphyse, sK Säulenknorpel, bK Blasenknorpel, eK enchondraler Knochen mit Osteozyten, pK perichondraler Knochen. (Junqueira und Carneiro, 1996)

Schon 1945 postulierte Lacroix das Vorkommen von „Ostogenin“ im Knochen, das die Synthese von Knochen induziert (Lacroix, 1945). Diese Hypothese wurde 1965 von Urist bestätigt, indem er zeigte, dass die intramuskuläre Implantation von demineralisierten Knochenfragmenten die Neubildung von Knochen im Muskel induzieren kann (Urist, 1965). Eine weitere Erkenntnis war, dass Proteine, die aus der demineralisierten Knochengrundsubstanz extrahiert wurden und zusammen mit der Kollagenmatrix in Subkutangewebe implantiert wurden, zur Knochenneubildung führten (Sampath und Reddi, 1981). Diese Proteine wurden *bone morphogenetic proteins* (BMPs) bzw. *osteogenetic proteins* (OPs) genannt. 1988 gelang es schließlich Wozney

und Mitarbeitern BMP-2, BMP-3 und BMP-4 zu klonieren, denen eine osteoinduktive Funktion zugeschrieben werden konnte (Wozney *et al.*, 1988).

1.2 BMPs als Mitglieder der TGF- β Superfamilie

BMPs gehören zur *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) Superfamilie mit bisher über 40 identifizierten Mitgliedern. Dazu gehören neben den BMPs die *growth and differentiation factors* (GDFs), Inhibine, Activine, TGF β s und *Müllerian inhibiting substance* (MIS). Die Mitglieder der TGF- β Superfamilie beeinflussen viele zelluläre Prozesse wie Zellproliferation, Differenzierung, Beweglichkeit, Adhäsion und Zelltod. Sie übernehmen Aufgaben in Entwicklungsprozessen, der Homöostase und der Regeneration verschiedener Gewebe und sind an der Wundheilung, immunologischen und endokrinen Prozessen beteiligt (Massagué *et al.*, 1994; Massagué, 1998). Zusätzlich nehmen sie Einfluss auf krankhafte Prozesse, wie zum Beispiel fibrotische Veränderungen der Niere, Leber und Lunge, hervorgerufen durch eine TGF- β -Überexpression. Mutationen in der Kaskade der Signaltransduktion von Mitgliedern der TGF- β Superfamilie (z.B. Mutation der TGF- β Rezeptoren bzw. der SMADs) führen zu verschiedensten Krebserkrankungen des Menschen, unter anderem Magen-, Colon-, Pankreas-, hepatozelluläres, Endometrium-, Mamma-Carcinom und myelodysplastische Syndrome. Auch andere Erkrankungen des Menschen sind auf Mutationen von Mitgliedern der TGF- β Superfamilie zurückzuführen: Chondrodysplasie Typ Hunter-Thompson bei Mutation des *cartilage-derived morphogenetic protein 1* (CDMP1 bzw. GDF5), hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie bei Mutation des Typ I Rezeptors ALK1 (*activin receptor-like kinase-1*) usw. (Massagué, 1998).

Allen Mitgliedern der TGF- β Superfamilie ist gemeinsam, dass sie als lange Vorläufermoleküle synthetisiert werden, von denen das reife Protein proteolytisch abgespalten und sezerniert wird (Groeneveld und Burger, 2000). Sie sind Dimere und besitzen am C-Terminus meist sieben Cystein-Reste. Sechs dieser Cystein-Reste bilden untereinander drei Disulfidbrücken aus, die eine stabile Struktur, den sogenannten Cystin-Knoten, bilden. Der siebte Cystein-Rest bildet eine intermolekulare Disulfidbrücke aus, die für die Stabilität der Dimere verantwortlich ist (Dale und Jones, 1999).

Als Mitglieder der TGF- β Superfamilie sind die BMPs ebenfalls Dimere, wobei sowohl Homodimere als auch Heterodimere funktionell aktiv sind. Heute sind über 30 Mitglieder der BMP-Familie bekannt, die gemäß ihren strukturellen Ähnlichkeiten in mehrere Subklassen eingeteilt werden (Ducy und Karsenty, 2000). BMP-1, das keine Knocheninduktion bewirkt, gehört nicht zur BMP-Familie, sondern wurde als Prokollagen-C-Proteinase identifiziert (Hofbauer und Henfelder, 1996).

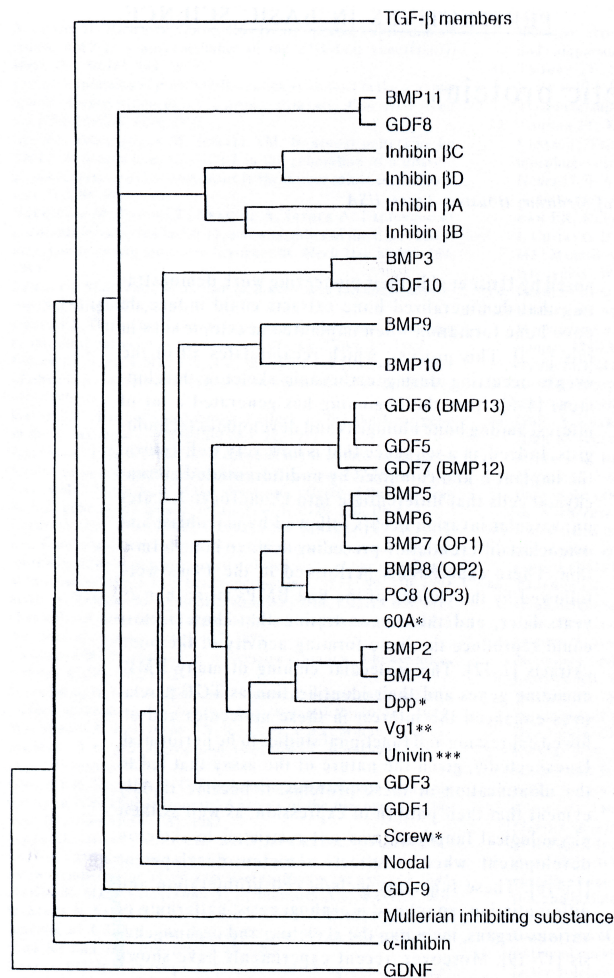


Abb. 3 Stammbaum der BMP-Familie (Ducy und Karsenty, 2000)

Zur Signalerzeugung in der Zelle werden zwei Rezeptortypen auf der Zelloberfläche nach Ligandenbindung oligomerisiert: Typ I Rezeptoren (BRIA, BRIB und ActRI) und Typ II Rezeptoren (BRII und ActRII) (Kirsch *et al.*, 2000c). Beide sind membrangebundene Serin/Threonin-Kinasen, wobei Typ II Rezeptoren konstitutiv aktiv sind, während Typ I Rezeptoren nur nach Liganden-Bindung aktiv werden (Ducy und Karsenty, 2000). Nach Binden von BMP an die extrazelluläre Domäne des Typ II Rezeptors aktiviert dessen

Serinkinase durch Transphosphorylierung den Typ I Rezeptor. Der so aktivierte Typ I Rezeptor phosphoryliert daraufhin Mitglieder der Smad Familie (SMAD 1, 5, 8) (Massagué, 1998). Die aktivierten SMADs bilden mit SMAD4 stabile Komplexe, die in den Zellkern wandern und dort zur Expression von Zielgenen führen, indem sie zum einen mit anderen Transkriptionsfaktoren kooperieren, aber auch direkt an Promotor-Regionen der DNA binden (Derynck *et al.*, 1998). Inhibitorische SMADs (SMAD 6, 7) verhindern die Signaltransduktion, indem sie mit dem Typ I Rezeptor interagieren bzw. kompetitiv die Bindung zwischen den SMADs 1, 5, 8 und SMAD4 hemmen (Balemans und Van Hul, 2002).

1.3 BMPs als wichtige Faktoren in der Knochenentwicklung

BMPs regulieren die wichtigsten Schritte in der Kaskade der Knocheninduktion, nämlich Chemotaxis, Mitose und Differenzierung. BMPs können allerdings nur multipotente Zellen stimulieren, reife Osteoblasten dagegen reagieren nicht auf BMPs. Dabei spielt die Fähigkeit der BMPs an die Knochengrundsubstanz zu binden eine wichtige Rolle. In multiplen Tierversuchen konnte eine erfolgreiche Knochenneubildung durch BMPs erreicht werden. Auch erste Versuche an Menschen, durch BMPs Knochenneubildung zu induzieren, zeigten sich erfolgreich (Groeneveld und Burger, 2000; Reddi, 1998). So konnte z.B. eine deutliche Knochenneubildung durch *rhOp-1* (rekombinantes humanes *osteogenic protein-1*, auch als BMP7 bezeichnet) bei fünf von sechs Patienten mit einer Fibula-Osteotomie nachgewiesen werden (Geesink *et al.*, 1999). Allerdings ist die osteoinduktive Aktivität der BMPs von vielen Faktoren abhängig, unter anderem von der BMP-Konzentration, den Eigenschaften des Trägermaterials, der Beeinflussung durch Hormone und der Anwesenheit von Zielzellen. Die notwendige BMP-Konzentration ist abhängig von der Umgebung, in der das Knochenwachstum induziert werden soll. So scheint gut durchblutete Muskulatur gute Bedingungen für Knochenwachstum zu bieten, so dass hier eine geringere BMP-Konzentration ausreicht. Die Eigenschaften des Trägermaterials spielen eine wichtige Rolle in der Freisetzungskinetik der BMPs. Bisher wurde in klinischen Studien Kollagen als Trägermaterial eingesetzt, das initial sehr viel

BMP freisetzt, so dass der BMP-Abbau sich zum Teil schneller ereignet als die Knochenneusynthese. Ein ideales Trägermaterial würde BMP in geringerer Menge über einen längeren Zeitraum konstant abgeben. Neben lokal vorkommenden Hormonen, u.a. *basic fibroblast growth factor* (bFGF), Prostaglandine und TGF β , zeigen auch systemische Faktoren, wie Glucocorticoide, Vitamin D und β -Östradiol, synergistische Effekte mit den BMPs (Groeneveld und Burger, 2000).

In Mäusen mit veränderten bzw. deletierten BMP-Genen zeigen sich multiple Skelett-Anomalien, die weitere Hinweise auf die Rolle der BMPs geben. Diese Mäuse haben z.B. verkürzte Knochen, eine verminderte Körpergröße, eine verminderte Anzahl von Rippen usw. Homozygote Deletionen von BMP2 oder BMP4 in Mäusen sind für die Embryonen letal, noch bevor die Knochenentwicklung beginnt (Ducy, 2000).

1.4 BMPs als wichtige Faktoren in der Embryogenese

BMPs sind nicht nur an der Knochenentwicklung beteiligt, sondern haben auch wichtige Funktionen in der Embryogenese von Säugetieren, Vögeln, Amphibien und Insekten (Dale und Jones, 1999). Zum besseren Verständnis dieser Funktionen sollen im folgenden Abschnitt in Kürze die wichtigsten Schritte der Embryogenese am Beispiel des südafrikanischen Froschs *Xenopus laevis* dargestellt werden.

Man kann die Embryogenese grob in drei Abschnitte untergliedern: In der ersten Phase teilt sich das befruchtete Ei in viele Zellen, die sich zu einem Epithel organisieren und nach komplizierten Gastrulations- und Neurulations-Bewegungen eine Bauchhöhlenanlage und ein Neuralrohr bilden. Die zweite Phase besteht in der Organogenese, bei der die diversen Organe entstehen. Die dritte Phase stellt eine Wachstumsphase dar, in der die gebildeten Strukturen an Größe zunehmen.

Das unbefruchtete Ei hat einen vegetativen Pol, an dem das Eidotter konzentriert ist, und einen animalen Pol. Nach der Befruchtung erfolgt eine Rotation der Rinde gegen den Kern, wodurch die ventral-dorsale Achse bestimmt wird. Anschließend wird die Eizelle durch zahlreiche Mitosen in viele Zellen, sog. Blastomeren unterteilt. Im Inneren des Embryos entsteht eine Höhle, das sog. Blastocoel und der Embryo wird jetzt als Blastula bezeichnet. Als nächstes folgen die Gastrulationsbewegungen. Dabei lösen sich die zukünftigen Mesodermzellen vom vegetativen Pol ab und wandern in das Blastocoel

8 Einleitung

hinein, wo sie sich an der Innenwand anheften. Gleichzeitig stülpt sich das Epithel seitlich des vegetativen Pols in das Blastocoel hinein und bildet das Darmrohr. Dort, wo das blinde Ende des Darmrohrs das gegenüberliegende Ende des Embryos erreicht, entsteht der Mund. Letztlich entsteht bei der Gastrulation eine dreilagige Struktur. Die innerste Lage ist das Entoderm, das die Darmröhre bildet, die äußerste Lage ist das Ektoderm und die mittlere Lage ist das Mesoderm, bestehend aus primären und sekundären Mesenchymzellen. Entoderm, Ektoderm und Mesoderm sind die drei primären Keimblätter, aus denen später die verschiedenen Gewebe hervorgehen. Aus dem Entoderm entstehen die epithelialen Anteile des Verdauungstrakts, bestehend aus Rachen, Ösophagus, Magen und Darm, aber auch die Epithelien von Speicheldrüsen, Leber, Pankreas, Luftröhre und Lunge. Die stützende Muskulatur und das Bindegewebe dieser Organe entstehen hingegen aus Mesoderm. Nach der Gastrulation teilen sich die Mesodermzellen auf die rechte und linke Körperseite auf, dazwischen befindet sich das Notochord, ein Stab aus Mesodermzellen. Das Notochord stellt den Vorläufer für die Wirbelsäule dar. Aus dem Mesoderm entstehen zunächst Mesenchymzellen, die sich später zu den Bindegeweben differenzieren, zu denen Knorpel, Knochen, Muskel und Fasergewebe gehören. Vom Mesoderm stammen außerdem die Dermis, die Röhren des Urogenital- und Gefäßsystems und die Blutzellen ab. Aus dem Ektoderm entstehen die Epidermis und das Nervengewebe. Während der Neurulation trennt sich eine Region des Ektoderms vom restlichen Ektoderm ab und bildet eine Röhre, das sog. Neuralrohr, das der Vorläufer für das Rückenmark und das Gehirn ist. An der Grenze von Ektoderm und Neuralrohr bildet sich eine Schicht von Ektodermzellen aus, die die Neuralleiste bilden, aus der das periphere Nervensystem entsteht. Rechts und links des Neuralrohres liegt eine Schicht Mesodermzellen, die sich in Somiten aufgliedern. Aus den Somiten entstehen die Wirbelsäule, die Rippen, die Dermis und die Muskulatur des Rumpfs (Alberts *et al.*, 1994).

BMPs spielen während der Embryogenese eine wichtige Rolle für die Ausbildung der dorso-ventralen Körperachse, da sie für die Differenzierung der Keimblätter in ventrale Gewebe verantwortlich sind (Lemaire und Yasuo, 1998).

Während der Gastrulation sind BMPs wichtig für die Musterbildung von Mesoderm. Man unterscheidet in der Blastula von *Xenopus laevis* zwei mesodermale Gebiete: Ein kleines dorsales Gebiet, als *Spemann Organizer* bezeichnet, besteht aus dorsalem

Mesoderm, aus dem das Notochord und Muskulatur hervorgehen. Ein größeres ventrolaterales Gebiet enthält ventrales Mesoderm, aus dem Blutzellen und Mesenchym hervorgehen. BMPs sind für die Induktion von ventralem Mesoderm in *Xenopus laevis* verantwortlich, wobei die Konzentration der BMPs den Grad der Ventralisation bestimmt. Wird BMP4 in niedriger Konzentration in Embryonen injiziert, verlieren diese das Notochord. Mit steigender BMP4-Konzentration fehlen zusätzlich die Muskulatur und letztlich alle Abkömmlinge des dorsalen Mesoderms. Dies deutet darauf hin, dass BMP4 als Morphogen wirkt. Morphogene induzieren in Abhängigkeit ihrer Konzentration die Differenzierung in unterschiedliche Zellarten. Im *Spemann Organizer* von *Xenopus laevis* werden die Gene für Chordin, Noggin und Follistatin exprimiert, die an BMPs binden, sie dadurch inaktivieren und dazu führen, dass ventrales Mesoderm zu dorsalem Mesoderm wird. Diese Funktion ist wiederum abhängig von ihrer Konzentration. Eine mögliche Erklärung ist, dass die BMP-Inhibitoren Chordin, Noggin und Follistatin im *Organizer* synthetisiert werden und in das umliegende Gewebe diffundieren, wobei ihre Konzentration mit zunehmender Entfernung abnimmt. Dies könnte dazu führen, dass der Gradient der BMP-Aktivität genau umgekehrt ist, so dass ventral eine hohe Konzentration von BMP erreicht wird und dorsal eine niedrige Konzentration. Neben der Ventralisation des Mesoderms sind BMPs auch für die Differenzierung des Ektoderms in Epidermis verantwortlich. Auch hier wirken die BMPs als Morphogene, indem sie in hoher Konzentration die Ausbildung von Epidermis (als ventraler Abkömmling des Ektoderms) induzieren und in niedrigerer Konzentration die Ausbildung von *cement gland*. In Abwesenheit der BMPs entwickelt sich Nervengewebe (als dorsaler Abkömmling des Ektoderms) (Dale und Jones, 1999). Der heutige Stand der Forschung lässt die Frage offen, in wieweit die Differenzierung des Entoderms auf ähnlichen Mechanismen beruht wie die von Mesoderm und Ektoderm (Graff, 1997).

Während der Organogenese werden BMPs in vielen Organanlagen, wie z.B. Neuralrohr, Meningen, Augen, Ohrbläschen, Zahnknospen, Lunge, Myokard, Niere, Ureteren, Darm, Haut usw. exprimiert, wobei sie besonders an den Orten eine Rolle spielen, an denen mesenchymale und epitheliale Zellen miteinander interagieren (Ducy und Karsenty, 2000; Hogan, 1996b). Die Expression von BMP2, BMP4, BMP7, GDF1 und GDF11 im sich entwickelnden Gehirn könnte darauf hinweisen, dass die BMPs eine wichtige Funktion für die Entwicklung des gesamten zentralen Nervensystems haben. Ein weiterer Hinweis

für die Rolle der BMPs ergibt sich aus Untersuchungen, bei denen in Mäusen durch Deletion von BMP-Genen multiple Veränderungen im Phänotyp auftreten, wie offene Neuralrohre, Störungen der Augenentwicklung, zystische Veränderungen der Lunge, Herz-Anomalien, Nierenmissbildungen, Infertilität usw. (Ducy und Karsenty, 2000).

Zusätzlich sind BMPs an vielen zellulären Prozessen beteiligt, darunter Differenzierung, Proliferation, Apoptose, Adhäsion und Migration, sowie an der Wundheilung, der Hämatopoese, der Immunantwort und an Entzündungsreaktionen (Dale und Jones, 1999).

1.5 Extrazelluläre Liganden der BMPs

BMPs können mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix interagieren, unter anderem mit Heparinsulfatproteoglycanen und Kollagenen. Dadurch nimmt die extrazelluläre Matrix Einfluss auf die Diffusionsrate und die lokale Verteilung der BMPs. BMP2 und BMP4 binden auch an die sezernierten Proteine Chordin, Noggin, Follistatin, Cerberus, DAN und Gremlin mit der Folge, dass die Aktivität der BMPs unterbunden wird (Dale und Jones, 1999). Dies führt zur Induktion von dorsalem Mesoderm und zur Differenzierung des Ektoderms in Nervengewebe (Balemans und Van Hul, 2002). Chordin und Noggin werden beide vom *Spemann Organizer* von *Xenopus laevis* freigesetzt, wodurch die umliegenden Zellen veranlasst werden, sich in dorsales Mesoderm zu differenzieren und nicht in ventrales Mesoderm (Massagué, 1998). Chordin und Noggin binden direkt an die BMPs und hemmen kompetitiv die Bindung der BMPs an ihre Rezeptoren, wodurch die Aktivität der BMPs inhibiert wird (Iemura *et al.*, 1998). Noggin *knockout* Mäuse zeigen zahlreiche Missbildungen: eine verkürzte Körperachse, verkleinerte Somiten, ein offenes Neuralrohr, Fehlen von kaudalen Wirbeln und fehlgebildete Extremitäten (Balemans und Van Hul, 2002). Follistatin ist ein Glykoprotein, das durch seine Fähigkeit, die FSH-Produktion der Hypophyse zu inhibieren, identifiziert wurde (Massagué, 1998). Es wird in vielen embryonalen und adulten Geweben exprimiert, darunter in Gehirn, Hoden, Ovar, Knochenmark, Plazenta und Hypophyse (Balemans und Van Hul, 2002). Außerdem wird es im *Spemann Organizer* von *Xenopus laevis* Embryonen exprimiert (Massagué, 1998). Follistatin bindet ebenfalls direkt an die BMPs, diese können aber weiterhin an ihre Rezeptoren

binden, ihre ventralisierende Aktivität jedoch wird inhibiert. Dies lässt den Schluss zu, dass Follistatin mit den BMPs und deren Typ I Rezeptor einen trimeren Komplex bildet und nicht-kompetitiv die Aktivität der BMPs inhibiert (Iemura *et al.*, 1998). Follistatin *knockout* Mäuse zeigen eine Reihe von Fehlbildungen (verminderte Körpergröße, geringere Muskelmasse, Missbildungen des Skeletts und der Zähne) und sterben kurz nach der Geburt. Wird Follistatin in Mäusen überexprimiert, zeigen die Tiere eine Reduktion der Fertilität, sowohl Hoden als auch Ovar und Uterus sind verkleinert. Das deutet auf eine Schlüsselrolle von Follistatin in der Entwicklung der Geschlechtsorgane hin (Balemans und Van Hul, 2002).

1.6 Das BMP-bindende Protein Ep45

Als weiterer extrazellulärer Ligand von BMP4 konnte Ep45 identifiziert werden. Dieser Ligand stellt allerdings keinen weiteren Antagonisten für BMP4 dar, da er nicht zur Induktion von dorsalem Mesoderm führt, wie ein Antagonist hätte erwarten lassen. Nach Injektion von Ep45 mRNA in *Xenopus* Embryonen zeigt sich kein Einfluss auf den Phänotyp oder auf die Expression von Zielgenen. Trotz der direkten Bindung von Ep45 an BMP4 beeinflusst Ep45 die Bindung von BMP4 an seinen Typ I Rezeptor nicht. Jedoch verhindert die Bindung von Ep45 an BMP4 eine Bindung von Follistatin an BMP4, so dass Follistatin seine antagonistische Funktion nicht mehr ausüben kann. Andere Inhibitoren wie Chordin und Noggin hingegen werden durch Ep45 nicht an ihrer Bindung an BMP4 gehindert und können ihre Aufgaben erfüllen (Iemura *et al.*, 1999).

Ep45 ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 45 kD, das in den Leberzellen von *Xenopus laevis* synthetisiert wird. Nach der Translation besteht das Polypeptid aus 436 Aminosäuren mit einem Signalpeptid für die Proteinsekretion am N-Terminus. Ep45 enthält zudem drei potentielle Stellen für N-glykosidische Bindungen an den Aminosäuren Asn-244, -260, und -289 und eine potentielle Stelle für O-glykosidische Bindung an der Aminosäure Ser-148, wobei eine Glykosylierung *in vivo* wahrscheinlich ist, da das Molekulargewicht des reifen sezernierten Ep45 ca. 4,7 kDa größer ist als das des Vorläuferpolypeptids direkt nach der Translation (Holland *et al.*, 1992). Die Aminosäuresequenz von Ep45 zeigt eine potentielle Bindungsstelle für DNA, bestehend aus einem Lys-Lys-Lys Motiv der Aminosäuren 129-131 (Sunderman, 1993).

12 Einleitung

Ep45 ist in der Literatur auch unter dem Namen pNiXa (protein-Ni-*Xenopus*-a) bekannt, das in Embryonen von *Xenopus laevis* nachgewiesen werden konnte. Ein DNA-Vergleich von Ep45 und pNiXa konnte zeigen, dass die beiden Proteine identisch sind (Beck *et al.*, 1992).

In Proteindatenbanken konnte eine deutliche Homologie von 30-40 % zwischen Ep45 und Proteinen der *Serine Protease Inhibitor Superfamily* (*Serpins*) nachgewiesen werden, so dass Ep45 als Mitglied dieser Proteinfamilie identifiziert werden konnte. Das typische Strukturelement der *Serpins* ist eine Schleife mit einem Reaktionszentrum, an das das aktive Zentrum der Protease gebunden wird und dadurch die Aktivität der Protease inhibiert wird. *Serpins* sind an vielen biologischen Prozessen beteiligt, z.B. an Entzündungsreaktionen, der Blutgerinnung, der Fibrinolyse, der Komplementaktivierung und der Reproduktion. Zu ihnen zählen unter anderem in der Leber synthetisierte Proteine wie α_1 -Antitrypsin, α_1 -Antichymotrypsin und Protein C Inhibitor, aber auch der *Neurite-promoting factor* aus Gliazellen, Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren aus Endothelzellen, Monozyten und der Plazenta. Auch Proteine ohne bekannte Enzym-inhibitorische Aktivität wie Hormon-bindende Globuline, Ovalbumin und Angiotensinogen sind Mitglieder der *Serpin*-Familie (Holland *et al.*, 1992).

pNiXa wurde auch im Hinblick auf die Aktivität als Serinproteaseinhibitor getestet. Dabei zeigte pNiXa eine signifikante reversible *slow-binding* Hemmung der Aktivität von α -Chymotrypsin (aus Pankreas des Rinds). Der niedrige Wert von K_i (3×10^{-9} M) zeigt die starke inhibitorische Funktion von pNiXa. pNiXa zeigt eine ähnliche aber schwächere Hemmung der Aktivität von Elastase (aus Pankreas des Schweins, K_i 5×10^{-7} M), jedoch keine Aktivitätshemmung von Trypsin (aus Pankreas des Rinds) (Sunderman *et al.*, 1996). Die typische Bildung eines stabilen Komplexes zwischen *Serpin* und Serinprotease ist auch bei der Reaktion zwischen pNiXa und Chymotrypsin nachweisbar, allerdings nicht bei der Reaktion von pNiXa mit Elastase, Trypsin oder Cathepsin G (Kotyza *et al.*, 1998). Ep45 als *Serpin* könnte eine Rolle spielen für den Schutz der BMPs vor Serinproteasen. Es wurde gezeigt, dass BMP4 von Serinproteasen wie z.B. α -Chymotrypsin am N-Terminus gespalten werden kann und dass diese Reaktion durch Ep45 unterbunden wird (Iemura *et al.*, 1999).

Mitglieder der *Serpin*-Familie üben eine Schutzfunktion vor Strahlungs- bzw. Karzinogen-induzierter Zelltransformation aus, indem sie die Überexpression von

Onkogenen wie *c-myc* oder *c-fos* unterdrücken. Auch Ep 45 könnte evtl. eine solche Aufgabe ausführen (Beck *et al.*, 1992).

Eine weitere Fähigkeit von pNiXa ist die Induktion von Reifungsprozessen von *Xenopus*-Oozyten. Durch Mikroinjektion von pNiXa in Oozyten wurde bei 60 % der Oozyten der Reifungsprozess ausgelöst. Das p21 Protein, das durch das *ras*-Onkogen kodiert wird, ist bekannt durch seine Beteiligung an der Pathogenese vieler Tumoren des Menschen, ist an der malignen Transformation gesunder Zellen beteiligt und führt nach Mikroinjektion bei 79 % der *Xenopus*-Oozyten zur Reifung. Werden beide Proteine zusammen injiziert, tritt ein synergistischer Effekt auf und 92 % der Oozyten reifen. Dies legt die Vermutung nahe, dass pNiXa auch *in vivo* Einfluss auf die Eizellreifung und den Eisprung nimmt (Haspel *et al.*, 1993).

Die Synthese von Ep45 wird wie die vieler anderer Mitglieder der *Serpin*-Familie hormonell reguliert. Nur nach Estrogen-Stimulation wurde es in der Leber von *Xenopus laevis* synthetisiert, in nicht-stimulierten Fröschen konnte Ep45 nicht nachgewiesen werden (Holland *et al.*, 1992).

Das Vorkommen von pNiXa beschränkt sich auf bestimmte Entwicklungsstadien des *Xenopus*-Embryos. Auffallend ist, dass in genau diesen Entwicklungsstadien die Embryonen besonders anfällig für Fehlbildungen sind, die durch den Kontakt zu Ni^{2+} ausgelöst werden (Beck *et al.*, 1992). Auch die örtliche Verteilung von pNiXa in *Xenopus*-Embryonen zeigt Auffälligkeiten: Im Gastrulationsstadium zeigt sich ein noch diffuses Vorkommen von pNiXa, das sich in späteren Entwicklungsstadien auf die Anlagen des Hirns, der Augen, des Rückenmarks, der Myotome, des Herzens und den Dottersack konzentriert (Sunderman *et al.*, 1996). *Xenopus*-Embryonen zeigen nach Kontakt zu Ni^{2+} Missbildungen von genau aus diesen Anlagen hervorgehenden Organen. Es sind Missbildungen der Augen, des Gesichts, des Herzens, des Skeletts und des Verdauungstrakts beschrieben. Die Aminosäuresequenz von Ep45 lässt auf eine mögliche Metall-bindende Domäne am N-Terminus schließen, bestehend aus sieben Histidinen, die in $(\text{HX})_n$ -Wiederholungen zusammengefasst sind. Diese Struktur ist auch als *histidine-metal-zipper* in Transkriptionsfaktoren und Protein C Inhibitor bekannt, dessen Histidin-Seitenketten sich paarweise mit Metallionen anordnen können. pNiXa zeigt unterschiedliche Affinitäten bezüglich der Bindung von Metallionen. Die höchste Affinität besteht zu Ni^{2+} , gefolgt von Cu^{2+} , Zn^{2+} und Co^{2+} mit gleicher Affinität, gefolgt

von Cd^{2+} . Die geringste Affinität besteht zu Mn^{2+} . Ein möglicher Mechanismus für die Teratogenität von Ni^{2+} könnte der Austausch von normalerweise vorhandenem Zn^{2+} oder Cu^{2+} gegen Ni^{2+} im $(\text{HX})_n$ -Motiv sein. Durch diesen Ionen-Austausch könnten Protein-Protein-Interaktionen von Transkriptionsfaktoren oder Proteinaseinhibitoren beeinflusst werden, die für einen korrekten Ablauf der Genaktivierung während der frühen Embryogenese verantwortlich sind (Beck *et al.*, 1992). Es ist bekannt, dass Proteine mit $(\text{HX})_n$ -Motiv mit Ni^{2+} Komplexe bilden können, die unter Freisetzung freier Radikale mit Wasserstoffperoxid reagieren. Freie Radikale können DNA-Brüche, Verknüpfungen von DNA mit Proteinen und Schäden an Chromosomen verursachen, deren Folgen die Entstehung von Missbildungen sein können. Auf diese Weise könnte Ep45 Einfluss auf die Teratogenität durch Ni^{2+} nehmen (Sunderman, 1993).

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der rekombinanten Expression von Ep45 in *E. coli* bzw. SF9-Zellen und in der Aufreinigung in aktiver Form. Anschließend sollten Untersuchungen zur Identifikation der Bindungsstelle von Ep45 an BMP4 mittels BIAcore-Messungen durchgeführt werden bzw. Interaktionsanalysen zur Aufklärung des Bindungsverhaltens zwischen Ep45, BMP4 und BMP-Rezeptoren. Fernziel war hierbei die Strukturaufklärung von Ep45 und des Ep45-BMP4-Komplexes mittels Röntgenstrukturanalyse. Weiterhin sollte der Frage nachgegangen werden, ob Ep45 zu anderen Mitgliedern der BMP-Familie ein ähnliches Bindungsverhalten zeigt wie zu BMP4. Desweiteren wird die Frage nach der Funktion von Ep45 im Zusammenhang mit den BMPs, unter anderem in der Knochenentwicklung, zu beantworten sein. Weitergehende Erkenntnisse über die Aufgaben der Mitglieder der BMP-Familie könnten gewonnen werden. Ein weiteres interessantes Forschungsgebiet wird die Aufklärung der Rolle von Ep45 in der Embryogenese sein. Welche Organe werden in ihrer Entwicklung von Ep45 beeinflusst und wie funktioniert diese Einflussnahme? Welche Rolle spielt Ep45 in Zusammenhang mit nickelinduzierter Teratogenität? Vielleicht kann künftig durch die Beantwortung dieser Fragen ein tieferes Verständnis für die Vorgänge der Embryogenese und ihrer Störungen erzielt werden. Auch bisher völlig unbekannte

Aufgaben von Ep45 könnten bei der Bearbeitung dieses Forschungsgebietes aufgedeckt werden, ebenso wie die Bedeutung der Funktion von Ep45 als Serinproteaseninhibitor.

Weiterhin wird die Frage bearbeitet werden müssen, ob Ep45 bzw. ein entsprechendes Protein auch in anderen Organismen neben *Xenopus laevis* vorhanden ist. Vor allem der Nachweis eines solchen Proteins im Menschen wäre von Bedeutung im Hinblick auf die Entwicklung neuer Konzepte zum besseren Verständnis und zur Therapie von Knochenerkrankungen, wie z.B. Osteoporose oder Knochentumoren, sowie zur Verbesserung auf dem Gebiet der Frakturheilung, aber auch zur Einflussnahme eines solchen Proteins auf die menschliche Embryogenese und sein Zusammenhang mit der Entstehung von Missbildungen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Alle Chemikalien und Enzyme wurden von den folgenden Firmen bezogen: Amersham Biosciences, Invitrogen, Lifetech, MBI Fermentas, New England Biolabs, Promega, Roth, Sigma, VWR International (Merck), Qiagen.

Alle Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser (Millipore-Qualität) hergestellt.

2.2 Bakterien- und Insektenzellstämme

2.2.1 Escherichia coli-Stämme

Bezeichnung	Genotyp	Referenz
DH5 α	F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_k⁻</i> , <i>m_k⁻</i>), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , Δ (<i>argF-lac</i>)U169, λ , ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15	Bethesda Research Laboratories, 1986
BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	<i>E. coli</i> B, F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (<i>r_B⁻m_B⁻</i>), <i>dcm</i> ⁺ , Tet ^r , <i>gal</i> , λ (DE3), <i>endA</i> , Hte, [<i>argU</i> , <i>ileY</i> , <i>leuW</i> , Cam ^r]	Weiner <i>et al.</i> , 1994
JM109	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>thi</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , D(<i>lac-proAB</i>), F', <i>traD36</i> , <i>proAB</i> ⁺ , <i>lacI</i> ^q	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
XL1-Blue	<i>supE44</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA46</i> , <i>thi</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> ⁻ , F', [<i>proAB</i> ⁺ , <i>lacI</i> ^q , <i>lacZ</i> Δ M15, Tn10(<i>tet</i> ^r)]	Bullock <i>et al.</i> , 1987

Tab.1 In dieser Arbeit verwendete *Escherichia coli*-Stämme (*E.coli*-Stämme)

2.2.2 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden *Sf9*-Zellen der Firma Pharmingen verwendet. Diese stammen aus dem Ovarialepithel von *Spodoptera frugiperda*.

2.3 Vektoren

Vektor	Beschreibung	Referenz
pET25b-xEp45	Ep45 in pET-25b(+)	Holland <i>et al.</i>
X1 Ep45/2	Ep45-cDNA in pBluescript SK(-)	Holland <i>et al.</i>
pMal-p2X	Amp ^r	New England Biolabs
pMalp2X-Ep45	Ep45 in pMal-p2X	Diese Arbeit
pIZT/V5-His	Zeocin ^r	Invitrogen
pIZT/V5-xEp45	Ep45 in pIZT/V5-His	Diese Arbeit

Tab.2 In dieser Arbeit verwendete Vektoren

2.4 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Interactiva bezogen. Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen sind fettgedruckt. Nucleotide, die eingefügt wurden und keine Basenpaarung eingehen, sind unterstrichen. Sequenzierprimer sind mit ^{seq} gekennzeichnet.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
Ep45-pMal-N1	<u>GTCGGATTGAGAAGGATTTCAGTCACTGAAATTC</u>
Ep45-pMal-C2	<u>GCGACAAGCAGCTCTAGATTATCATTGTGCATTAG</u>
pMal-p2-SQ-N1 ^{seq}	TCGAGCTCGAACAACAACAAT
pMal-p2-SQ-C1 ^{seq}	ACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGC
Ep45-BEVS-N1	<u>CCAGGAGAATTCATGCATCTTTTGGTTTATCTC</u>
Ep45-BEVS-CA1	<u>GCTTCCACGAGGGACCAATTGTGCATTAGTTGGGTC</u>
Ep45-BEVS-CB1	<u>CCAGGATCTAGATTAATGGTGATGGTGATGGTGGCT</u> <u>TCCACGAGGGACCAA</u>
Ep45-BEVS-N2	CCAGGAGAATTC <u>ACC</u> ATGGATCTTTTGGTTTATCTC
Ep45-226/249-sense ^{seq}	GAGGAGAAGATCCTATCAGAGGAA
Ep45-364/387-sense ^{seq}	GCCTTGGGTGCCAAATCTGAAACT
Ep45-892/918-sense ^{seq}	CCATATAAGAATGATACAGCAATGCTG

Ep45-997/1123-antisense ^{seq}	CATATAAAGATCCACAATGCTAGTTGC
OpIE2 forward Seq. primer ^{seq}	CGCAACGATCTGGTAAACAC
OpIE2 reverse Seq. primer ^{seq}	GACAATACAAACTAAGATTTAGTCAG

Tab.3 In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

2.5 Antikörper

Bezeichnung	Eigenschaften	Referenz
Penta-His™ Antikörper	Monoklonaler Antikörper aus der Maus (IgG1);	Qiagen
Meerrettich-Peroxidase gekoppeltes Ziege-Anti-Maus IgG	Antikörper aus der Ziege; gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase; Fc-spezifisch;	Sigma

Tab.4 In dieser Arbeit verwendete Antikörper

2.6 Mikrobiologische und molekulargenetische Methoden (*E. coli*)

2.6.1 Kulturbedingungen

E. coli-Zellen wurden in LB-Medium kultiviert: 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto-Yeast Extrakt, 10 g/l NaCl (bzw. 5 g/l NaCl für Kultivierung von Zellen, die den Vektor pIZ/V5-His enthalten), pH 7,5 (20 min bei 121°C und 1,1 bar autoklaviert) (Sambrook *et al.*, 1989). Je nach Bedarf wurden folgende Antibiotika in der angegebenen Endkonzentration zugegeben:

Antibiotikum	Endkonzentration
Ampicillin	50 bzw. 100 mg/l
Chloramphenicol	20 mg/l
Zeocin™	25 mg/l

Tab.5 Verwendete Antibiotika und eingesetzte Endkonzentrationen

Für Flüssigkulturen wurde LB-Medium mit *E. coli*-Zellen angeimpft (Einzelkolonie oder aus Einzelkolonie angelegte Vorkultur) und über Nacht bei 37°C unter Schütteln (180 rpm) inkubiert. Auf LB-Agarplatten (15 g/l Agar) ausplattierte *E. coli*-Zellen wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.6.2 Plasmidisolierung

Die Plasmidisolierung wurde nach der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim und Doley, 1979) durchgeführt.

Nachfolgend aufgeführte Lösungen wurden dafür verwendet:

Lösung	Zusammensetzung
P1	50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0
P2	200 mM NaOH, 1% SDS
P3	2.8 M KAc, pH 5.1
N2	100 mM Tris/H ₃ PO ₄ , 15% Ethanol, 900 mM KCl, pH 6.3, 0.15% Triton X-100
N3	100 mM Tris/H ₃ PO ₄ , 15% Ethanol, 1150 mM KCl, pH 6.3
N5	100 mM Tris/H ₃ PO ₄ , 15% Ethanol, 1000 mM KCl, pH 8.5

Tab.6 Lösungen für Plasmidisolierung

2.6.2.1 Plasmid-Minipräparation

Für die Plasmid-Minipräparation wurde 1 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur (ÜNK) in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß abzentrifugiert (5 min, 13200 rpm). Das Pellet wurde in 100 µl Lösung P1, die mit 100 µg/µl RNase A versetzt wurde, resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µl Lösung P2 wurde der Ansatz durch Invertieren gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl Lösung P3 und Invertieren erfolgte eine weitere Inkubation für 15 min auf Eis. Danach wurde zentrifugiert (15 min, 13.2 rpm), der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 500 µl Isopropanol dazugegeben. Nach einer Inkubation für 30 min auf Eis wurde zentrifugiert (15 min, 13.2 rpm), das Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (15 min, 13.2 rpm). Nach Trocknen des Pellets (Speedvac) wurde es in 10 µl ddH₂O aufgenommen.

2.6.2.2 Plasmid-Maxipräparation

Plasmid-Maxipräparationen wurden mit Hilfe des Maxi-Präp-Kits Nucleobond AX 500 (purification of plasmids; modified alkaline/SDS lysis) von Macherey & Nagel unter Verwendung von AX 500 Kartuschen nach Herstellerangaben durchgeführt. Dafür wurde eine 200 ml-*E. coli*-ÜNK zentrifugiert (10 min, 9000 rpm, Rotor 12.500) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 12 ml Lösung P1, der 100 µg/ml RNase A beigefügt wurde, resuspendiert. Nach Überführen des Ansatzes in ein Falcon-Röhrchen wurde 12 ml Lösung P2 zugegeben, invertiert und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 12 ml Lösung P3 und Invertieren erfolgte eine weitere Inkubation für 5 min auf Eis. Anschließend wurde der Ansatz zentrifugiert (20 min, 5000 rpm, Bactifuge) und der Überstand in eine mit 5 ml Lösung N2 equilibrierte Kartusche überführt. Nach Waschen mit 2x 12 ml Lösung N3 wurde mit 12 ml Lösung N5 eluiert. Das Eluat wurde in einem Falcon-Röhrchen aufgefangen, mit 8.4 ml Isopropanol versetzt, invertiert und zentrifugiert (30 min, 5000 rpm, Bactifuge). Das Pellet wurde mit 10 ml 70 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (15 min, 5000 rpm, Bactifuge). Nach Trocknen des Pellets wurde es in 200 µl ddH₂O resuspendiert. Die Konzentration der isolierten DNA wurde spektral photometrisch bestimmt.

2.6.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen wurde bei 37°C für 1-2 Stunden durchgeführt. Als Reaktionspuffer wurde der vom Hersteller jeweils mitgelieferte 10fach Spaltpuffer verwendet. Für den Test-Verdau nach einer Plasmid-Minipräparation wurden 5 µl des Mini-Präp-Ansatzes und 10 U Enzym (20 U bei Enzymen, die blunt-end schneiden) bei einem Gesamtvolumen des Spaltansatzes von 10 µl eingesetzt, nach einer Plasmid-Maxipräparation wurde 1 µg DNA und 10 U Enzym (20 U bei Enzymen, die blunt-end schneiden) bei einem Gesamtvolumen von 20 µl eingesetzt. Sollte ein PCR-Produkt zur Verwendung bei nachfolgenden Klonierungen gespalten werden, wurde es zunächst gefällt: Dem 50 µl-PCR-Ansatz wurden 50 µl ddH₂O und 100 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben und 5 min bei RT geschüttelt. Die obere Phase wurde mit 20 µl 3 M Na-Acetat pH 5,2 und 200 µl Isopropanol versetzt, 5 min

geschüttelt, 30 min bei 4°C inkubiert und zentrifugiert (15 min, 13.2 rpm). Die DNA wurde mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (15 min, 13.2 rpm). Das Pellet wurde getrocknet (Speedvac) und nach Aufnehmen in 32 µl ddH₂O in einem 40 µl-Ansatz mit 40 U Enzym gespalten. Wurde ein Plasmid für nachfolgende Klonierungen gespalten, wurden 2 µg Plasmid-DNA für einen 30 µl-Ansatz und 40 U Enzym verwendet. Die Spaltung wurde durch eine Agarose-Gelelektrophorese eines geeigneten Aliquots überprüft.

2.6.4 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA-Agarose-Gelelektrophorese wurde nach der Methode von Herrmann *et al.*, 1980 durchgeführt. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Gele mit einer Agarose-Konzentration von 0,7 % verwendet. Die Agarose wurde mit 5 mg/ml Ethidiumbromid versetzt, um die aufgetrennte DNA unter UV-Licht sichtbar machen zu können. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte in TBE-Puffer (90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8.0) bei max. 100 V. Folgende Größenstandards wurden verwendet:

HMS		LMS	
Fragmentgröße [bp]	Gewichtanteil [%]	Fragmentgröße [bp]	Gewichtanteil [%]
23130	43	1608	21
9416	19	1201	16
6557	14	999	13
4361	9	711	9
2322	5	567	7.5
2027	4	517	6.8
564	1	396	5
125		360	5
		222 / 219 / 214	8.6
		132 / 120 / 112	5
		75 / 65 / 30 / 27	2.6

Tab.7 In dieser Arbeit verwendete Größenstandards bei der Agarose-Gelelektrophorese

2.6.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurden Vektor (nach Restriktionsverdau und Hitzeinaktivierung der Restriktionsendonukleasen) und Insert (nach Amplifizierung mittels PCR, Restriktionsverdau und DNA-Fällung) in einem molaren Verhältnis von 1:3 und 1:5 eingesetzt. Die Ligation erfolgte in der Regel in einem 20 µl-Ansatz, wobei neben 850 fmol Vektor und entsprechender Menge Insert 2 µl 10-fach T4-DNA-Ligase-Puffer und 1 µl T4-DNA-Ligase (5 U/µl) eingesetzt wurden. Bei Ligation mit Fragmenten, die *blunt-end* geschnitten wurden, wurde der Ligationsansatz zusätzlich mit 2 µl 50% PEG 4000 versetzt. Nach Inkubation bei 16°C über Nacht wurden *E. coli*-Zellen direkt mit dem Ligationsansatz transformiert.

2.6.6 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli* wurde nach Hanahan, 1983 durchgeführt.

2.6.6.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen wurden 5 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C unter Schütteln (180 rpm) wurde 1 ml dieser Kultur zu 100 ml LB-Medium gegeben. Die Zellen wurden bei 37°C unter Schütteln (180 rpm) inkubiert, bis eine OD₅₅₀ von 0.5 erreicht wurde. Nach Inkubation der Zellen für 20 min bei 4°C und Zentrifugation (5 min, 1200 g, 4°C) wurden die Zellen in 10 ml TSS-Lösung (85% LB-Medium, 10% PEG 8000, 5% DMSO, 50 mM MgCl₂ pH 6.5; eisgekühlt) resuspendiert, zu je 200 µl aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.6.6.2 Transformation kompetenter Zellen

200 µl kompetente *E. coli*-Zellen wurden mit 5 µl Ligationsansatz bzw. 5 µl Vektor-DNA (nach Mini-Präparation) vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock (90 sec, 42°C) wurden die Zellen 5 min auf Eis abgekühlt, 800 µl LB-

Medium zugegeben und 30 min bei 37°C unter Schütteln (180 rpm) inkubiert. Anschließend wurden 200 µl und 800 µl des Transformationsansatzes auf LB-Platten, die je nach Resistenz des Plasmids entsprechende Antibiotika enthielten, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Der Erfolg der Transformation wurde durch Plasmid-Minipräparation und anschließenden Restriktionsverdau überprüft.

2.6.7 Polymerase chain reaction (PCR)

Die Amplifikation von DNA-Sequenzen wurde nach der Methode von Saiki *et al.* (1988) durchgeführt. Das Gesamtvolumen eines PCR-Ansatzes betrug 50 µl, wobei 5 µl 10-fach Pfu-Puffer, 50 ng Template, 10 pMol N'-Primer, 10 pMol C'-Primer, 250 µM dNTPs (Amersham Biosciences) und 1.25 units Pfu-DNA-Polymerase (Promega Corporation) eingesetzt wurden. Es wurden zwei verschiedene PCR-Programme verwendet, wobei bei beiden Programmen je 25 Amplifikationszyklen, bestehend aus Denaturierung, Primer-Annealing und Elongation, durchgeführt wurden. Danach erfolgte ein zusätzlicher Elongationsschritt von 5 min bei 72°C.

	PCR-Programm 1		PCR-Programm 2	
	Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit
Schmelzen	94°C	2 min	95°C	5 min
Denaturierung	94°C	15 sec	95°C	1 min
Primer-Annealing	54°C	15 sec	60°C	1 min
Elongation	72°C	2.5 min	72°C	4 min

Tab.8 In dieser Arbeit verwendete PCR-Programme

2.6.8 Automatisierte DNA-Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden an einem DNA-Sequenzierer der Firma Applied Biosystems (Modell 373A) nach Angaben des Herstellers von Herrn Wolfgang Hädel durchgeführt. Diese Dideoxy-Sequenzierung nach der Methode von Sanger beruht auf dem

basenspezifischen Abbruch der DNA-Kettenverlängerung durch den statistischen Einbau von Farbstoff-beladenen ddNTPs in die von den Primern her anwachsende Kette.

Es wurden hierzu vier voneinander unabhängige Reaktionen durchgeführt, die neben gleichem Template, Primer und dNTPs jeweils verschiedene ddNTPs enthielten. Durch den statistischen Einbau der ddNTPs in die sich verlängernden Fragmente erfolgte ein Kettenabbruch. Nach Abschluß der Polymerase-Reaktion wurden die Produkte vereinigt, nach Fällung mit Ethanol in Formamid/50 mM EDTA pH 8.0 (5:1) aufgenommen und abschließend auf einem Harnstoff-Sequenziergel (7%-iges Polyacrylamid-Gel) elektrophoretisch aufgetrennt. Die einzelnen DNA-Fragmente wurden aufgrund ihrer unterschiedlichen Fluoreszenz im Argon Laserstrahl detektiert.

2.6.9 Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli*

Medium: LB-Medium

Antibiotika: Ampicillin, Chloramphenicol, ZeocinTM (je nach Resistenz des Vektors)

TBS-Puffer: 10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.0

PMSF-Lösung: 0,5 M PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid) in Ethanol (abs.)

800 ml LB-Medium, versetzt mit Antibiotika je nach Resistenz des Vektors, wurden mit 20 ml einer ÜNK von *E. coli* in einem Erlenmeyerkolben (Fassungsvermögen 2 l) angeimpft und unter Schütteln bei 37°C kultiviert. Während der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600}=0.5-1$) erfolgte die Induktion durch Zugabe von 0.3 mM IPTG. Nach weiteren 2-2.5 h Kultivierung wurden die Zellen durch Zentrifugation (6000 g, 20 min, 4°C) geerntet. Das Zellsediment wurde in TBS-Puffer resuspendiert und gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (6000 g, 20 min, 4°C) wurde das Zellpellet bei -80°C gelagert.

Für die nachfolgende Säulenchromatographie wurde das Zellpellet im entsprechenden Säulenpuffer (20 ml Puffer / 1 g Zellen) resuspendiert und die Zellwände mit Ultraschall (4x1 min beschallen mit jeweils 30 sec Pause) unter Kühlung im Eisbad aufgebrochen (LabSonic2000, 150 Watt, großer Schallkopf). Die Suspension wurde zur Abtrennung löslicher und unlöslicher Bestandteile zentrifugiert (30000 g, 30 min, 4°C).

2.6.10 Präparation von *inclusion bodies*

Proteine können in Zellen nicht nur in löslicher Form sondern auch als unlösliche Aggregate vorliegen. Diese Aggregate werden als *inclusion bodies* bezeichnet und wurden entsprechend folgenden Protokolls präpariert: Das Zellpellet wurde in TBSE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH 8.0) unter Zugabe von β -EtSH (1/1000 des Gesamtvolumens) und PMSF (0.1-0.5 mM) resuspendiert (10 ml Puffer/1 g Zellen) und die Zellwände mit Ultraschall (5x1 min mit jeweils 30 sec Pause) unter Kühlung im Eisbad aufgebrochen (LabSonic2000, 150 Watt, großer Schallkopf). Nach Zentrifugation (JA14 Rotor, 12000 rpm, 30 min, 4°C) wurde das Pellet erneut in TBSE-Puffer resuspendiert, beschallt und zentrifugiert. Durch anschließendes zweimaliges Resuspendieren und Zentrifugieren wurden die *inclusion bodies* gewaschen. Sie können bei -80°C gelagert werden.

2.6.11 Denaturierung der *inclusion bodies* mit Harnstoff

Die *inclusion bodies* wurden in 8 M Harnstoff, 10 mM β -EtSH, 50 mM Na-Acetat, pH 5.0 resuspendiert (10 ml Puffer/1 g *inclusion bodies*) und über Nacht bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Nach Zentrifugation (VTI 65.1 Rotor, Quickseal, 30000 rpm, 40 min, 4°C) wurde der Überstand zur weiteren Bearbeitung des extrahierten Proteins verwendet.

2.6.12 Denaturierung der *inclusion bodies* mit Guanidiniumhydrochlorid (Gnd·HCl)

Zur Vorextraktion wurden die *inclusion bodies* in 0.6 M Gnd·HCl, 50 mM NaOAc, 1 mM EDTA, pH 5.0 resuspendiert und unter Rühren 15 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (11500 rpm, 20 min, 4°C) wurde das Pellet der Hauptextraktion zugeführt, indem es in 6 M Gnd·HCl, 50 mM NaOAc, 1 mM EDTA, 1/1000 Volumenanteil β -EtSH, pH 5.0 resuspendiert und unter Rühren über Nacht bei RT inkubiert wurde. Der Überstand nach Zentrifugation (30000 rpm, 1 h, 18°C) wurde zur weiteren Proteinisolierung eingesetzt.

2.6.13 Renaturierung von Proteinen

Zur Renaturierung aus *inclusion bodies* extrahierten Proteins wurden Renaturierungsansätze, sogenannte Foldits (Hampton Research), verwendet. Dazu wurde die Lösung des extrahierten Proteins mit 17 verschiedenen Renaturierungsansätzen (Zusammensetzung siehe Tab. 9) 1:100 schockverdünnt und 2 Tage bei RT im Dunkeln inkubiert.

Renaturierungsansätze	1	2	3	4
Puffer	55 mM Tris pH 8.2	55 mM MES pH 6.5	55 mM MES pH 6.5	55 mM Tris pH 8.2
Salz	264 mM NaCl 11 mM KCl	10.56 mM NaCl 0.44 mM KCl	10.56 mM NaCl 0.44 mM KCl	264 mM NaCl 11 mM KCl
Kation	1.1 mM EDTA	2.2 mM MgCl ₂ 2.2 mM CaCl ₂	1.1 mM EDTA	2.2 mM MgCl ₂ 2.2 mM CaCl ₂
PEG3350 (% w/v)	0.055%	0%	0.055%	0%
Lauryl Maltoside	0 mM	0.3 mM	0 mM	0.3 mM
Gnd-HCl	0 mM	550 mM	550 mM	0 mM
Additive Polar (P) Nichtpolar (NP)	0 mM	0 mM	440 mM Sucrose (NP) 550 mM L-Arginin (P)	440 mM Sucrose (NP) 550 mM L-Arginin (P)
Oxidation/ Reduktion	1 mM DTT	1 mM GSH 0.1 mM GSSG	1 mM GSH 0.1 mM GSSG	1 mM DTT
Renaturierungsansätze	5	6	7	8
Puffer	55 mM MES pH 6.5	55 mM Tris pH 8.2	55 mM Tris pH 8.2	55 mM MES pH 6.5
Salz	264 mM NaCl 11 mM KCl	10.56 mM NaCl 0.44 mM KCl	10.56 mM NaCl 0.44 mM KCl	264 mM NaCl 11 mM KCl
Kation	2.2 mM MgCl ₂ 2.2 mM CaCl ₂	1.1 mM EDTA	2.2 mM MgCl ₂ 2.2 mM CaCl ₂	1.1 mM EDTA
PEG3350 (% w/v)	0%	0.055%	0%	0.055%
Lauryl Maltoside	0 mM	0.3 mM	0 mM	0.3 mM
Gnd-HCl	0 mM	550 mM	550 mM	0 mM
Additive Polar (P) Nichtpolar (NP)	440 mM Sucrose (NP)	440 mM Sucrose (NP)	550 mM L-Arginin (P)	550 mM L-Arginin (P)
Oxidation/Reduktion	1 mM GSH 0.1 mM GSSG	1 mM DTT	1 mM DTT	1 mM GSH 0.1 mM GSSG

Renaturierungsansätze	9	10	11	12
Puffer	55 mM MES pH 6.5	55 mM Tris pH 8.2	55 mM Tris pH 8.2	55 mM MES pH 6.5
Salz	264 mM NaCl 11 mM KCl	10.56 mM NaCl 0.44 mM KCl	10.56 mM NaCl 0.44 mM KCl	264 mM NaCl 11 mM KCl
Kation	2.2 mM MgCl ₂ 2.2 mM CaCl ₂	1.1 mM EDTA	2.2 mM MgCl ₂ 2.2 mM CaCl ₂	1.1 mM EDTA
PEG3350 (% w/v)	0.055%	0%	0.055%	0%
Lauryl Maltoside	0 mM	0.3 mM	0 mM	0.3 mM
Gnd-HCl	550 mM	0 mM	0 mM	550 mM
Additive Polar (P) Nichtpolar (NP)	440 mM Sucrose (NP)	440 mM Sucrose (NP)	550 mM L-Arginin (P)	550 mM L-Arginin (P)
Oxidation/Reduktion	1 mM DTT	1 mM GSH 0.1 mM GSSG	1 mM GSH 0.1 mM GSSG	1 mM DTT

Renaturierungs-ansätze	13	14	15	16	17
Puffer	55 mM Tris pH 8.2	55 mM MES pH 6.5	55 mM MES pH 6.5	55 mM Tris pH 8.2	55 mM Tris pH 8.2
Salz	264 mM NaCl 11 mM KCl	10.56 mM NaCl 0.44 mM KCl	10.56 mM NaCl 0.44 mM KCl	264 mM NaCl 11 mM KCl	0 mM
Kation	1.1 mM EDTA	2.2 mM MgCl ₂ 2.2 mM CaCl ₂	1.1 mM EDTA	2.2 mM MgCl ₂ 2.2 mM CaCl ₂	0 mM
PEG3350 (% w/v)	0%	0.055%	0%	0.055%	0%
Lauryl Maltoside	0 mM	0.3 mM	0 mM	0.3 mM	0 mM
Gnd-HCl	550 mM	0 mM	0 mM	550 mM	0.1 M
Additive Polar (P) Nichtpolar (NP)	0 mM	0 mM	440 mM Sucrose (NP) 550 mM L-Arginin (P)	440 mM Sucrose (NP) 550 mM L-Arginin (P)	550 mM L-Arginin (P)
Oxidation/Reduktion	1 mM GSH 0.1 mM GSSG	1 mM DTT	1 mM DTT	1 mM GSH 0.1 mM GSSG	2 mM GSH 0.2 mM GSSG

Tab.9 Zusammensetzung der verwendeten Renaturierungsansätze

2.7 Mikrobiologische und molekulargenetische Methoden (*Sf9*-Zellen)

2.7.1 Kulturbedingungen

Sf9-Zellen wurden in IPL-41 Insektenmedium (Sigma; gemäß Produktinformation hergestellt) bei 27°C kultiviert. Dazu wurden 2 ml einer bei -80°C gelagerten *Sf9*-Zellsuspension ($2 \cdot 10^6$ Zellen/ml Medium) in einer 25 cm²-CellCultureFlask (Greiner) mit 5 ml Medium kultiviert, bis eine konfluente Kultur erreicht wurde. Diese wurde in eine 75 cm²-CellCultureFlask überführt und Medium bis zu einem Gesamtvolumen von 15 ml zugegeben. Sobald die Kultur Konfluenz erreicht hatte, wurde sie in eine 175 cm²-CellCultureFlask überführt und Medium bis zu einem Gesamtvolumen von 35 ml zugegeben. Die Zellen wurden anschließend jeden 3. Tag 1:3 mit frischem Medium versetzt und in neue 175 cm²-CellCultureFlasks überführt.

2.7.2 InsectSelect™ System

Das InsectSelect™ System (Invitrogen) wurde zur transienten Expression von Proteinen in *Sf9*-Zellen eingesetzt.

Nach Klonierung des relevanten Gens in den Vektor pIZT/V5-His wurden 0.5 ml IPL-41 Insektenmedium, 1 µg, 2 µg bzw. 4 µg des pIZT/V5-His-Konstrukts und je 10 µl Insectin-Plus™ Liposomen zusammengegeben, 10 s durch Schütteln gemischt und 15 min bei RT inkubiert.

Das Medium wurde von 8×10^5 *Sf9*-Zellen in einer 60 mm-Platte abgesaugt, die Zellen wurden mit 3 x 1 ml Serum-freiem Medium gewaschen und der Transfektionsmix tropfenweise zugegeben. Nach 4 h Inkubation der Zellen bei RT unter Schwenken wurden 1.5 ml Medium zugegeben und die Zellen bei 27°C kultiviert. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen und zentrifugiert (2000 rpm, 5 min). Der Überstand wurde für den Westernblot eingesetzt. Die Zellen wurden mit 1 ml Medium von der Platte abgelöst, zentrifugiert (2000 rpm, 5 min), mit 50 µl Lysepuffer (RIPA-Puffer: 50 mM Tris, 1% NP-40, 0.25 % Nadesoxycholol, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, je 1 µg/ml Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin, pH 7.4) versetzt, zentrifugiert (2000 rpm, 5 min) und der Überstand für den Westernblot eingesetzt.

2.8 Chromatographische Verfahren zur Trennung von Proteinen

2.8.1 Kationenaustausch-Chromatographie an Fractogel EMD SO_3^- 650 (S)

Niedrigsalzpuffer: 25 mM NaOAc, 50 mM NaCl, pH 5.5

Hochsalzpuffer: 25 mM NaOAc, 1 M NaCl, pH 5.5

Säulenmaterial: Fractogel EMD SO_3^- 650 (S) (Merck)

Die Säule wurde mit 15 ml Fractogel EMD SO_3^- 650 (S) beladen und mit 20 Säulenvolumina Niedrigsalzpuffer äquilibriert. Die Proteinlösung wurde über einen Superloop mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/min aufgetragen. Anschließend wurde mit 10 Säulenvolumina Niedrigsalzpuffer gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0-75% Hochsalzpuffer in 50 min. Die Elution wurde an einem Durchflussphotometer bei 280 nm verfolgt. Die erhaltenen Fraktionen (2.0 ml) wurden für die quantitative Auswertung gegen Niedrigsalzpuffer als Referenz bei 280 nm photometrisch vermessen und mittels SDS-PAGE analysiert.

2.8.2 Größenausschluss-Chromatographie an Sephacryl S-300

Laufpuffer: 6 M Guanidiniumhydrochlorid, 50 mM NaOAc, 1 mM EDTA, pH 5.0

Säulenmaterial: Sephacryl S-300 HR (Amersham Biosciences)

Die Säule wurde mit Sephacryl S-300 beladen und bei einer Laufgeschwindigkeit von 1.8 ml/min mit Laufpuffer äquilibriert. Die Proteinlösung wurde mit der gleichen Laufgeschwindigkeit aufgetragen. Die Elution erfolgte mit Laufpuffer und wurde an einem Durchflussphotometer bei 280 nm verfolgt. Die erhaltenen Fraktionen (10.5 ml) wurden für die quantitative Auswertung photometrisch gegen Laufpuffer als Referenz bei 280 nm vermessen und mittels SDS-PAGE analysiert.

2.8.3 Amylose-Affinitäts-Chromatographie

Laufpuffer: 20 mM Tris, 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM β -EtOH, 1 mM NaN_3 ,
pH 7.4

Elutionspuffer: 20 mM Tris, 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM β -EtOH, 1 mM NaN_3 ,
10 mM Maltose

Säulenmaterial: Amylose Resin (NEB)

Die Säule wurde bei 4°C mit 10 ml Amylose Resin beladen und mit Laufpuffer äquilibriert (Laufgeschwindigkeit 1 ml/min). Die Proteinlösung wurde 1:5 mit Laufpuffer verdünnt und auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgt mit Elutionspuffer. Die erhaltenen Fraktionen (1 ml) wurden für die quantitative Auswertung photometrisch gegen Elutionspuffer als Referenz bei 280 nm vermessen und mittels SDS-PAGE analysiert. Die relevanten Fraktionen wurden vereinigt und Faktor Xa (1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ Protein) zugegeben. Nach Inkubation (2 h, RT) und Zentrifugation (14000 g, 20 min) konnte der Überstand für die weitere Bearbeitung eingesetzt werden.

2.8.4 Chromatographie an Ni-NTA-Agarose

Laufpuffer I: 20 mM Tris, 5 mM CaCl_2 , pH 7.4

Elutionspuffer I: 20 mM Tris, 5 mM CaCl_2 , 200 mM Imidazol, pH 7.4

Laufpuffer II: 50 mM Na-Phosphat, 10 mM Imidazol, 300 mM NaCl, pH 8.5

Elutionspuffer II: 50 mM Na-Phosphat, 300 mM Imidazol, 300 mM NaCl, pH 8.5

Säulenmaterial: Ni-NTA-Agarose (Qiagen)

Die Säule wurde mit 8 ml Ni-NTA-Agarose beladen und mit Laufpuffer äquilibriert. Die Proteinlösung wurde auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit Elutionspuffer. Die erhaltenen Fraktionen (1 ml) wurden mittels SDS-PAGE analysiert.

Als Alternative wurde die Proteinlösung zu einer geeigneten Menge Ni-NTA-Agarose gegeben und 30 min bei 4°C unter Schwenken inkubiert. Nach Überführen in eine Säule und Absetzen des Säulenmaterials wurde mit 10 Säulenvolumina Laufpuffer gewaschen

und mit Elutionspuffer eluiert. Die erhaltenen Fraktionen (1 ml) wurden mittels SDS-PAGE analysiert.

2.8.5 Chromatographie an Phenyl Sepharose (Hydrophobe Säule)

Laufpuffer: 1 M Ammoniumsulfat, 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM Azid, 1 mM β -EtOH, pH 7.4

Säulenmaterial: Phenyl Sepharose High Performance (Amersham Biosciences)

Die Säule wurde mit 1 ml Phenyl Sepharose High Performance beladen und mit Laufpuffer äquilibriert. Die Proteinlösung wurde auf die Säule aufgetragen. Die Elution des Proteins erfolgte mit einem Stufengradienten von 0.9-0 M Ammoniumsulfat in Schritten von 0.1 M. Die erhaltenen Fraktionen (1 ml) wurden für die quantitative Auswertung gegen Laufpuffer als Referenz bei 280 nm photometrisch vermessen und mittels SDS-PAGE analysiert.

2.8.6 Anionenaustausch-Chromatographie an Fractogel EMD TMAE

Niedrigsalzpuffer: 20 mM NaCl, 10 mM Hepes, 3.4 mM EDTA, pH 7.4

Hochsalzpuffer: 1 M NaCl, 10 mM Hepes, 3.4 mM EDTA, pH 7.4

Säulenmaterial: Fractogel EMD TMAE (Merck)

Die Säule wurde mit 5 ml Fractogel EMD TMAE beladen und mit Niedrigsalzpuffer äquilibriert. Die Proteinlösung wurde auf die Säule aufgetragen. Die Elution des Proteins erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0-100% Hochsalzpuffer in 50 min. Die Elution wurde an einem Durchflussphotometer bei 280 nm verfolgt. Die erhaltenen Fraktionen (1.8 ml) wurden für die quantitative Auswertung gegen Niedrigsalzpuffer als Referenz bei 280 nm photometrisch vermessen und mittels SDS-PAGE analysiert.

2.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

(Laemmli, 1970)

In der denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte in dem Vertikal Gel Elektrophorese System Mini-V 8.10 (Gibco BRL).

Lösung 1: 29:1 Acrylamid:N,N'-Methylenbisacrylamid 40%

Lösung 2: 1.5 M Tris-HCl, 0.4% SDS, pH 8.8

Lösung 3: 0.5 M Tris-HCl, 0.4% SDS, pH 6.7,

	Sammelgel 4%	Trenngel 12%
Lösung 1	0.25 ml	1.5 ml
Lösung 2	-	1.25 ml
Lösung 3	0.625 ml	-
ddH ₂ O	1.6 ml	1.25 ml
Glycerin (87 %)	-	1.0 ml
TEMED	9 µl	10 µl
40% APS (w/v)	9 µl	10 µl

Die Angaben beziehen sich auf ein Gel mit der Schichtdicke 0.75 mm.

SDS-Probenpuffer: 12.5 ml Lösung 3, 20 ml 10% SDS, 30 ml Glycerin (87%),
47.5 ml ddH₂O, 0.1% BPB

(für reduzierenden SDS-Probenpuffer wurde 5% β-Mercaptoethanol zugegeben)

SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris-HCl, pH 8.6, 190 mM Glycin, 0.15% SDS

Für das Gießen der Gele wurden zwei Glasplatten mit Hilfe von Spacern im Abstand von 0.75 mm durch Klammern fixiert und mit durch Erhitzen flüssiger Agarose (1 %) abgedichtet. Nach dem Füllen dieser Apparatur mit Trenngel bis etwa 2 cm unter den Rand wurde das Gel mit Wasser überschichtet, um eine gerade Oberfläche zu erreichen. Nach dem Polymerisieren des Trenngels wurde das Wasser entfernt, bis zum oberen

Rand Sammelgel eingefüllt und ein geeigneter Kamm zur Ausbildung der Taschen eingesetzt.

Die Proteinproben wurden im Verhältnis 1:1 mit SDS-Probenpuffer gemischt (sofern nicht anders angegeben wurde reduzierender SDS-Probenpuffer verwendet) und zu ihrer vollständigen Denaturierung 3 min auf ca. 100°C erhitzt. Das Gel wurde in die mit SDS-Laufpuffer gefüllte Laufkammer eingesetzt, der Kamm entfernt und die Taschen mit den Proben beladen. Es wurde eine Spannung von 120 V angelegt.

2.9.1 Coomassie-Blau-Färbung

Färbelösung: 0.25% Coomassie Brilliant Blue R250, 1 Vol. Essigsäure, 1 Vol. Isopropanol, 8 Vol. H₂O, filtriert

Entfärber: 1 Vol. Essigsäure, 1 Vol. Isopropanol, 8 Vol. H₂O

Nach Beendigung der Gelektrophorese wurde das Trenngel abgetrennt, das Sammelgel 1 h in Färbelösung unter Schwenken inkubiert und anschließend mehrere Stunden in Entfärber unter Schwenken inkubiert.

Durch Trocknen wurden die Gele konserviert. Dazu wurde das Gel 30 min in 20 % Glycerin unter Schwenken inkubiert und anschließend zwischen Zellophanfolie in einem Trockenrahmen aufgespannt.

2.9.2 Silberfärbung

(Wray *et al.*, 1981)

Lösung 1: 50 % (v/v) Aceton in ddH₂O

Lösung 2: 50 % (w/v) TCA in ddH₂O

Lösung 3: 20 % (w/v) AgNO₃ in ddH₂O (im Dunkeln lagern)

Lösung 4: 10 % (w/v) Natrium Thiosulfat pentahydrat in ddH₂O

Lösung 5: 1 % (v/v) Essigsäure

Lösung 6: 37 % (w/w) Formaldehyd

34 Material und Methoden

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Trenngel abgetrennt und nach folgendem Protokoll in der jeweiligen Lösung unter Schwenken inkubiert.

Lösung	Inkubationszeit
30 ml Lösung 1, 0.75 ml Lösung 2, 12.5 µl Lösung 6	5 min
ddH ₂ O	3 x 5 s
ddH ₂ O	5 min
ddH ₂ O	3 x 5 s
30 ml Lösung 1	5 min
50 µl Lösung 4 in 30 ml ddH ₂ O	1 min
ddH ₂ O	3 x 5 s
0.4 ml Lösung 3, 0.3 ml Lösung 6, 30 ml ddH ₂ O	8 min
ddH ₂ O	5 x 5 s
0.6 g Na ₂ CO ₃ , 12.5 µl Lösung 6, 12.5 µl Lösung 4, 30 ml ddH ₂ O	30 s
Lösung 5	30 s
ddH ₂ O	10 s

2.9.3 Protein-Größenstandards für SDS-PAGE

Das Molekulargewicht der analysierten Proteine wurde durch den Vergleich mit einem Größenstandard, bestehend aus einem Gemisch von Proteinen bekannter Größe, bestimmt.

Protein	Molekulargewicht
	[kDa]
Phosphorylase b	94
Albumin	67
Ovalbumin	43
Carboanhydrase	30
Trypsin-Inhibitor	20.1
Lactalbumin	14.4

2.10 Western Blot

Transfer-Puffer:	26 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol
Waschpuffer:	10 mM Tris pH 7.9, 150 mM NaCl, 0.5% Tween
Blocking-Puffer:	3% BSA in Waschpuffer
TBS-Puffer:	10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.0
Luminollösung:	2.5 mM Luminol in 0.1 M Tris pH 8.5, 1% DMSO
Enhancerlösung:	90 mM p-Cumarsäure in DMSO
H ₂ O ₂ -Lösung:	5.4 mM H ₂ O ₂ in 0.1 M Tris pH 8.5
Entwicklungslösung:	10 ml Luminollösung, 22 µl Enhancerlösung, 5 ml H ₂ O ₂ -Lösung

Nach der elektrophoretischen Auftrennung des Proteingemischs in der SDS-PAGE wurde es auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu wurde eine Nitrozellulose-Transfermembran (Protran©, 0.45 µm, Schleicher & Schuell) 2 min in Wasser eingeweicht und anschließend 5 min zusammen mit zwei Whatman-Papieren und Transfermatten in Transferpuffer gelegt. Danach wurde daraus zusammen mit dem SDS-Polyacrylamidgel ein „Sandwich“ hergestellt und in eine mit Transferpuffer gefüllte Blotting-Apparatur (Blot Module Mini-V8.10, Gibco BRL) eingelegt. Das Blotting erfolgte bei 140 mA für 1 h.

Die Nitrozellulosemembran wurde mit Blockpuffer gewaschen und 1 h unter Schwenken in Blockpuffer inkubiert. Der Primärantikörper (Penta-His™ Antikörper, 0.5 µg) wurde in 5 ml Blockpuffer zugegeben und über Nacht bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde 5 x je 10 min mit Blockpuffer gewaschen, der Sekundärantikörper (Ziege-Anti-Maus IgG, Meerrettich-Peroxidase konjugiert, 5.7 µg) in 5 ml Blockpuffer zugegeben und 1 h bei RT unter Schütteln inkubiert. Es folgte ein erneuter Waschschriff 5 x je 10 min mit TBS-Puffer. Im Dunkeln wurde die Entwicklungslösung hergestellt und auf die Nitrozellulosemembran gegeben. Nach 5 min Inkubation wurde die Membran getrocknet und der Film aufgelegt. Dieser wurde nach entsprechend langer Exposition entwickelt.

2.11 Tests zur Überprüfung der Aktivität von Ep45

2.11.1 Enzym-Assay

(modifiziert nach Walsh, *et al.* 1970)

Lösung A: 80 mM Tris, pH 7.8

Lösung B: 1.18 mM N-Benzoyl-L-Tyrosin Ethyl Ester (BTEE)–Lösung (18.5 g BTEE wurden in 31.7 ml Methanol gelöst; ad 50 ml ddH₂O)

Lösung C: 2 M CaCl₂

Lösung D: 1 mM HCl

Lösung E: 5 u/ml Chymotrypsin in kalter Lösung D (1 mg Chymotrypsin in 10.52 ml kalter Lösung D)

Lösung F: Foldit 1-17 ohne Zusatz von Protein

Vorinkubationslösung: Folditansatz + Lösung A + Lösung E (Menge je nach gewünschter Ep45-Konzentration in der Küvette; s. Tab);
(20 min bei 25°C inkubiert)

Ep45-Menge in Küvette [µg]	Folditansatz [µl] (aufkonzentriert auf Ep45-Konzentration von 1 µg/10 µl)	Lösung A [µl]	Lösung E [µl]
0.33	10	90	100
0.66	20	80	100
1.2	40	60	100

Tab.10 Vorinkubationslösungen

In einer Küvette wurden folgende Lösungen gemischt, wobei die Lösung, die Chymotrypsin enthält, jeweils als letztes zugegeben wurde.

Lösung	Probe _{Ch} [μ l]	Blank _{Ch} [μ l]	Probe _{Ch+Ep45} [μ l]	Blank _{Ch+Ep45} [μ l]
Lösung A	473	473	473	473
Lösung B	466	466	466	466
Lösung C	26.6	26.6	26.6	26.6
Lösung D	-	33.3	-	33.3
Lösung E	33.3	-	-	-
Lösung F	-	-	-	33.3
Vorinkubationslösung	-	-	66.6	-
ddH ₂ O	33.3	33.3	-	-

Tab.11 Enzym-Assay

Die Konzentrationszunahme des Produkts n-Benzoyl-L-Tyrosin (Extinktionskoeffizient 0.964) wurde photometrisch bei 256 nm über 5 min alle 30 sec gemessen.

2.11.2 Bindungsassay Ep45-Chymotrypsin

Dieser Assay beruht darauf, dass bei der Interaktion zwischen Chymotrypsin und Ep45 ein stabiler Komplex aus den beiden Proteinen entsteht, der unter nicht-reduzierenden Bedingungen stabil ist und in der SDS-PAGE nachgewiesen werden kann. Dazu wurden 70 pmol Ep45 in 100 mM Tris·HCl, pH 8.3, 20 mM CaCl₂, 0.005% (v/v) Triton X-100 mit 16 pmol Chymotrypsin 1 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von nicht-reduzierendem SDS-Probenpuffer wurden die Proben 1 min auf 100°C erhitzt und anschließend in der SDS-PAGE analysiert (Methode modifiziert nach Kotyza *et al.* 1998).

3 Ergebnisse

3.1 Expression von Ep45 in *E. coli*

3.1.1 Expression von Ep45 mit dem Vektor pET25b(+)

Zur Expression von Ep45 in *E. coli*-Zellen wurde der Vektor pET25b(+) benutzt. Dieser Vektor enthält den T7 Promotor, eine *multiple cloning site*, ein Gen für Ampicillinresistenz und das *lacI^q* Gen, welches für den Lac Repressor codiert. Dieser bewirkt, dass die Genexpression erst nach Zugabe von IPTG erfolgt. Dieser Vektor enthält in der *multiple cloning site* ein [*NdeI/EcoRI*]-DNA-Fragment mit Sequenzen des zuerst beschriebenen Ep45-Klons XI_{Ep45/2} von bp 85-1454 (freundlicherweise von L. J. Holland, Department of Physiology, University of Missouri School of Medicine, Columbia zur Verfügung gestellt), so dass bei der Expression Ep45 als Einzelprotein synthetisiert wird.

3.1.1.1 Transformation und Induktion der Genexpression

Kompetente BL21-CodonPlus(DE3)-RIL-Zellen wurden mit dem Plasmid pET25b-xEp45 transformiert. Mit einer Übernachtskultur dieser transformierten Zellen wurde LB-Medium beimpft und bei 37°C kultiviert. Nachdem eine OD₆₀₀ von 1 erreicht war, wurde 0.3 mM IPTG zugegeben, um die Induktion zu starten. Nach 2.5 h bei 37°C (OD₆₀₀ = 1.55) wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet. In der anschließend durchgeführten SDS-PAGE ist eine Bande bei 45 kD sichtbar, entsprechend der Größe von Ep45 (vergleiche Abb. 4).

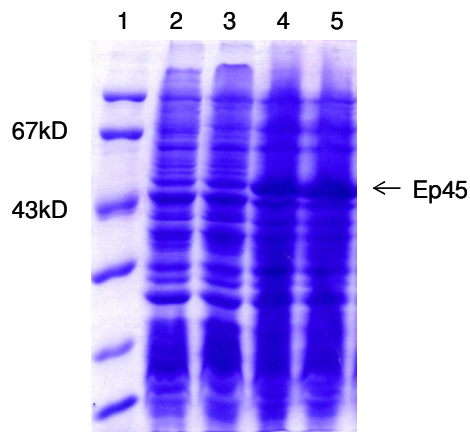


Abb. 4 SDS-PAGE der Induktion der Ep45-Expression: BL21-CodonPlus(DE3)-RIL-Zellen, transformiert mit pET25b-xEp45, wurden bei 37°C kultiviert. Bei einer OD_{600} von 1 wurde mit 0.3 mM IPTG induziert. Nach 2.5 h bei 37°C wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet. Vor Induktion und 2.5 h nach Induktion wurden jeweils 1 ml der Zellen zentrifugiert, in 2fach SDS-Probenpuffer (3 μ l/0.1 OD) resuspendiert, aufgeköcht und auf das Gel aufgetragen. (1) Größenmarker, (2) + (3) vor Induktion, (4) + (5) nach Induktion

3.1.1.2 Chromatographie des Zellextraktes an einer Fractogel EMD SO_3^- -Säule

Zur Aufreinigung von Ep45 aus dem Proteingemisch der Zellen sollte zunächst nach dem Protokoll verfahren werden, nach dem Ep45 aus *Xenopus laevis* Embryonen isoliert wird. Dabei wird der Extrakt aus *Xenopus laevis* Embryonen zunächst dialysiert und einer Kationenaustauschchromatographie zugeführt. Die Fraktionen, in denen Ep45 vorhanden ist, werden vereinigt und mittels Gelfiltrationschromatographie weiter aufgereinigt, bevor ein dritter Reinigungsschritt über eine Nickelsäule erfolgt. (Iemura, 1999) Um in gleicher Weise zu verfahren, wurde als erster Reinigungsschritt eine Kationenaustauschchromatographie an einer Fractogel EMD SO_3^- -Säule durchgeführt. Hierfür wurden die induzierten *E. coli*-Zellen in Niedrigsalzpuffer resuspendiert und die Zellwände mit Ultraschall aufgebrochen. Unter der Annahme, dass sich Ep45 als lösliches Protein, das von den Zellen sezerniert wird, im Überstand befindet, wurde nach Zentrifugation der Überstand auf die Fractogel EMD SO_3^- -Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0% auf 75% Hochsalzpuffer in 50 min. Nach Proteinfällung wurde eine SDS-PAGE durchgeführt (siehe Abb. 5). Diese zeigte, dass Ep45 kaum in den Eluatensondern sondern überwiegend im Durchlauf zu finden ist

und dass keine Isolierung von Ep45 von den anderen exprimierten Proteinen erzielt werden konnte.

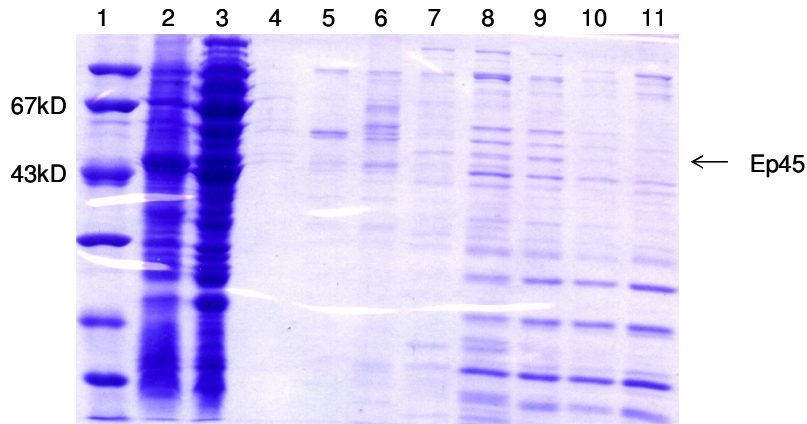


Abb. 5 SDS-PAGE der Chromatographie des Zellextraktes an einer EMD-Säule: Nach Aufbrechen der Zellen durch Ultraschall und Zentrifugation wurde der Überstand auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0% auf 75% Hochsalzpuffer in 50 min. Es wurden Proben mit je ca. 4 µg Ep45 entnommen und gefällt. Die Pellets wurden in je 10 µl 2fach SDS-Probenpuffer resuspendiert, aufgekocht und auf das Gel aufgetragen. (1) Größenmarker, (2) Auftrag, (3) Durchlauf, (4) Fraktion 10, (5) Fraktion 15, (6) Fraktion 17, (7) Fraktion 20, (8) Fraktion 25, (9) Fraktion 28, (10) Fraktion 30, (11) Fraktion 32

3.1.1.3 Präparation und Denaturierung der *inclusion bodies*, Renaturierungsversuche

Nach Ultraschallbehandlung und Zentrifugation der induzierten Zellen befand sich ein Grossteil von Ep45 im Pellet. Aus dieser Beobachtung ließ sich die Vermutung ableiten, dass Ep45 in den Zellen überwiegend als unlösliche Aggregate, sogenannte *inclusion bodies*, vorliegt und nicht, wie zunächst erwartet, als lösliches Protein. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden die *inclusion bodies* präpariert.

Die präparierten *inclusion bodies* wurden mit 8 M Harnstoff denaturiert, um die in den *inclusion bodies* enthaltenen Proteine in Lösung zu bringen. Die Zugabe von 10 mM β-EtSH bewirkt eine Reduktion der Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten, so dass eine vollständige Entfaltung der Proteine erreicht wird. Zur Rückfaltung von Ep45 wurden Renaturierungsansätze der Firma Hampton Research, sogenannte Foldits, eingesetzt. Hierbei handelt es sich um 17 Lösungen, die verschiedene Puffer, Salze, Kationen und teilweise Detergenzien, chaotrope Substanzen, polare oder nichtpolare Zusätze und

oxidierende bzw. reduzierende Substanzen enthalten, um Bedingungen zu schaffen, die eine Proteinrückfaltung ermöglichen. Die denaturierte Proteinlösung wurde in diesen Foldits schockverdünnt und 2 d bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Folditansätze auf ein SDS-Gel aufgetragen (vergleiche Abb. 6).

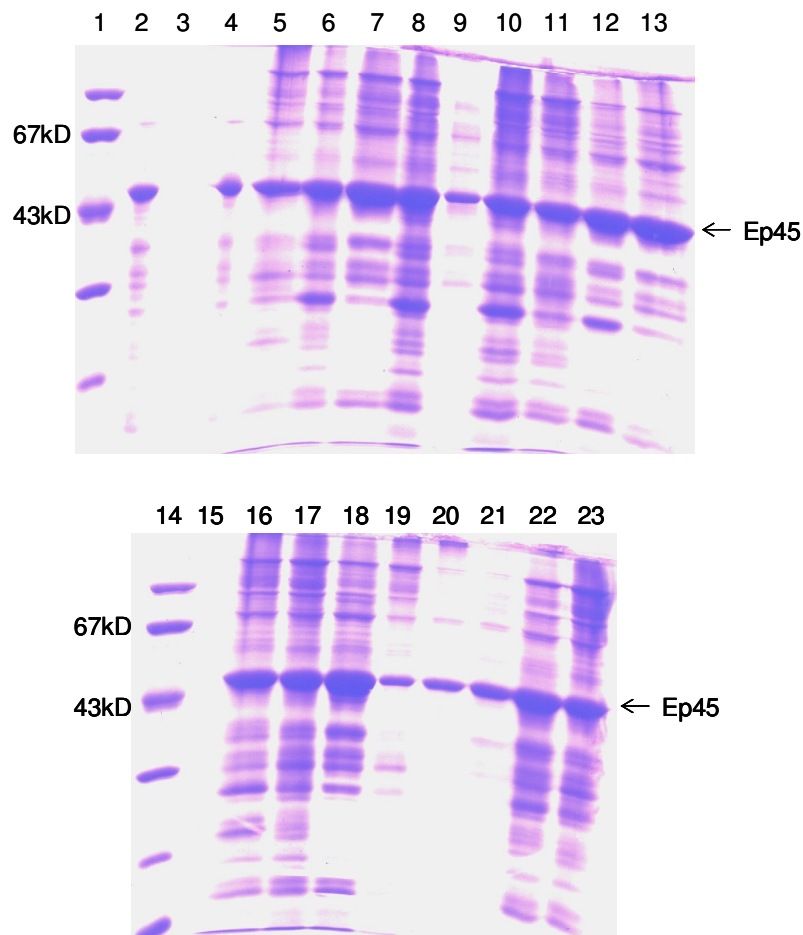


Abb. 6 SDS-PAGE der Renaturierung von Ep45 durch Foldits: Nach Denaturierung der *inclusion bodies* mit Harnstoff und anschließender Zentrifugation wurde der Überstand in den Foldits schockverdünnt und 2 d inkubiert. Anschließend wurden je 500 μ l aus den Folditansätzen entnommen und eine Proteinfällung durchgeführt. Die Pellets wurden in je 10 μ l 2fach SDS-Probenpuffer (nicht-reduzierend) resuspendiert und auf das Gel aufgetragen. (1) Größen-marker, (2) Überstand nach Denaturierung (1 μ l) in reduzierendem SDS-Probenpuffer, (3) leer, (4) Überstand nach De-naturierung (1 μ l) in nicht-reduzierendem SDS-Probenpuffer, (5) Foldit 1, (6) Foldit 2, (7) Foldit 3, (8) Foldit 4, (9) Foldit 5, (10) Foldit 6, (11) Foldit 7, (12) Foldit 8, (13) Foldit 9, (14) Größen-marker, (15) leer, (16) Foldit 10, (17) Foldit 11, (18) Foldit 12, (19) Foldit 13, (20) Foldit 14, (21) Foldit 15, (22) Foldit 16, (23) Foldit 17

Der nächste Schritt bestand im Nachweis von aktivem Ep45 aus der Renaturierung. Dafür wurde ein Enzymassay eingesetzt, in dem die Funktion von Ep45 als Serinproteaseinhibitor den Aktivitätsnachweis liefert. Als Reaktion diente die durch Chymotrypsin katalysierte Umsetzung von N-Benzoyl-L-Tyrosin-Ethyl-Ester (BTEE) in N-Benzoyl-L-Tyrosin (BT) und Ethanol. Die zunehmende Konzentration des farbigen Produkts N-Benzoyl-L-Tyrosin wurde im Photometer alle 30 s für 5 min gemessen. Bei Vorhandensein von aktivem Ep45 wird die Serinprotease Chymotrypsin inhibiert und dadurch die Konzentrationszunahme von N-Benzoyl-L-Tyrosin vermindert.

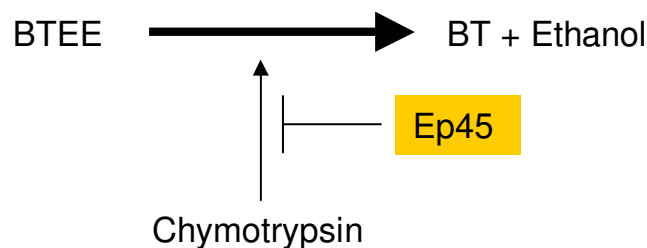


Abb. 7 Enzymassay: Chymotrypsin katalysiert die Umsetzung von N-Benzoyl-L-Tyrosin-Ethyl-Ester (BTEE) in N-Benzoyl-L-Tyrosin (BT) und Ethanol. Durch Ep45 erfolgt eine Inhibition von Chymotrypsin.

Dieser Assay wurde mit den Folditansätzen 1, 2, 13, 14 und 15 durchgeführt, wobei die Konzentration von Ep45 variiert wurde (0.33 µg, 0.66 µg, 1.2 µg Ep45) ebenso wie die Konzentration von Chymotrypsin (2.5 U, 5 U). Es konnte jedoch keine signifikante Inhibition der oben dargestellten Reaktion durch Ep45 nachgewiesen werden.

Um die Rückfaltung in aktives Ep45 zu erleichtern, sollte nach der Denaturierung der *inclusion bodies* zunächst eine Isolierung von Ep45 aus dem Proteingemisch der *inclusion bodies* erfolgen und anschließend die Renaturierung mittels Foldits versucht werden. Hierzu erfolgte die Denaturierung mit 6 M Harnstoff und eine anschließende Chromatographie an einer Kationenaustauschersäule. Als Säulenmaterial wurde Fractogel EMD COO⁻ 650 (S) (Merck) verwendet. Der Harnstoffaufschluss wurde zentrifugiert und der Überstand auf die mit Nidrigsalzpuffer (6 M Harnstoff, 10 mM β-EtSH, 50 mM Na-Acetat, 20 mM NaCl, pH 5.0) equilibrierte Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte über einen linearen Gradienten von 20 mM NaCl auf 1 M NaCl. In der anschließend durchgeführten SDS-PAGE wurde deutlich, dass der Harnstoffaufschluss

sehr ineffektiv war, da der Grossteil von Ep45 nicht im Überstand sondern im Pellet vorlag. Weiterhin zeigte sich, dass Ep45 durch diese Chromatographie nicht aufgereinigt werden konnte, da in den Eluaten neben einer nicht eindeutig zu identifizierenden Ep45-Bande eine Vielzahl weiterer Protein-Banden nachweisbar ist (siehe Abb. 8).

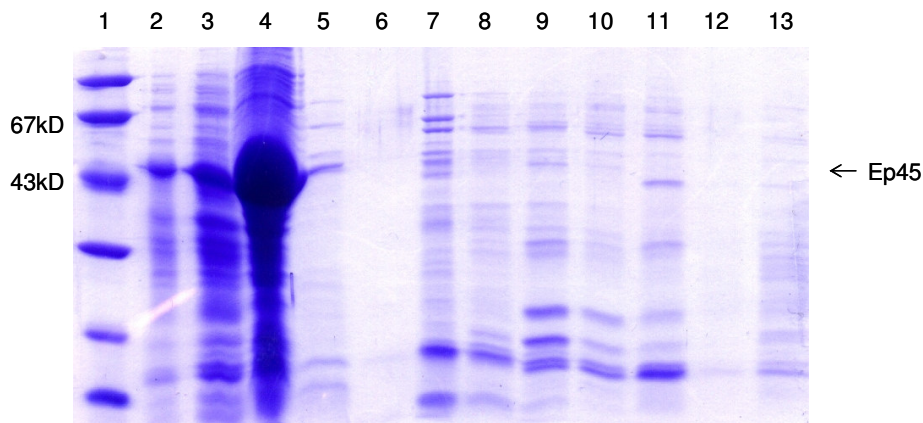


Abb. 8 SDS-PAGE der Chromatographie des Harnstoffaufschlusses an einer EMD-Säule: Nach Zentrifugation des Harnstoffaufschlusses wurde der Überstand auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 20 mM NaCl auf 1 M NaCl. Von den Fraktionen 2, 3, 11-14 und 16 wurden je 50 μ l als Proben entnommen, von den Fraktionen 4-9 wurden je 10 μ l und von Fraktion 10 20 μ l als Proben entnommen und einer Proteinfällung unterzogen. Die Pellets wurden in je 10 μ l 2fach SDS-Probenpuffer resuspendiert, aufgeköcht und auf das Gel aufgetragen. (1) Größenmarker, (2) Auftrag (1 μ l), (3) Auftrag (5 μ l), (4) Pellet (nach Zentrifugation resuspendiert in 20 μ l SDS-Probenpuffer, davon wurden 5 μ l aufgetragen), (5) Durchlauf (10 μ l), (6) Fraktion 2, (7) Fraktion 3, (8) Fraktion 4, (9) Fraktion 5, (10) Fraktion 6, (11) Fraktion 7, (12) Fraktion 8, (13) Fraktion 9

Wegen der Ineffizienz der Harnstoffdenaturierung wurden als Alternative dazu die *inclusion bodies* mit Gnd·HCl extrahiert. Nach Zentrifugation der denaturierten *inclusion bodies* wurde der Überstand einer S300-Gelchromatographie zugeführt, bei der die Proteine entsprechend ihrer Größe aufgereinigt werden. Hierbei konnte eine deutliche Anreicherung von Ep45 erreicht werden (siehe Abb. 9).

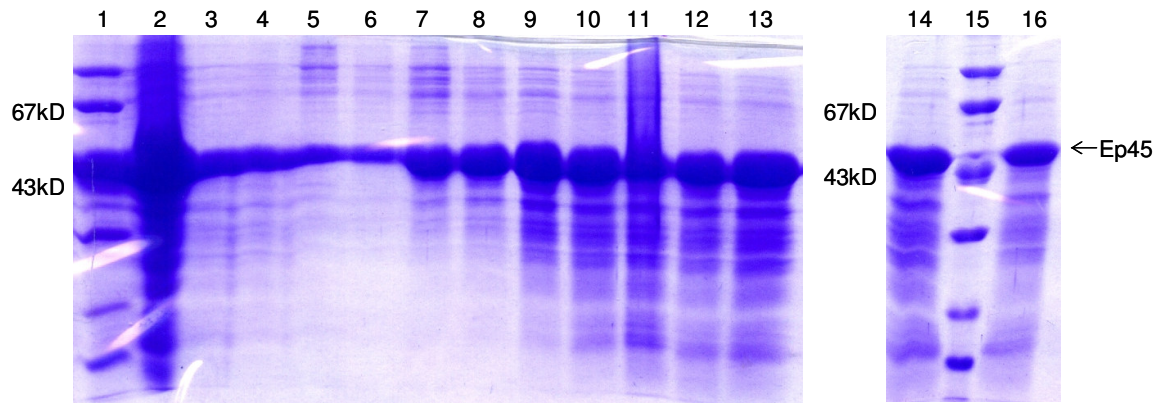


Abb. 9 SDS-PAGE der Chromatographie des Gnd-HCl-Aufschlusses an einer S300-Säule: Nach Zentrifugation des Gnd-HCl-Aufschlusses wurde der Überstand auf die Säule aufgetragen. Nach der Elution wurden jeweils 10 μ l des Auftrags und der Fraktionen als Proben entnommen und einer Proteinfällung unterzogen. Anschließend wurden die Pellets in 10 μ l 2fach SDS-Probenpuffer (reduzierend) resuspendiert, aufgeköcht und auf das Gel aufgetragen. (1) Größenmarker, (2) Auftrag, (3) Fraktion 1, (4) Fraktion 2, (5) Fraktion 3, (6) Fraktion 4, (7) Fraktion 5, (8) Fraktion 6, (9) Fraktion 7, (10) Fraktion 8, (11) Fraktion 9, (12) Fraktion 10, (13) Fraktion 11, (14) Fraktion 12, (15) Größenmarker, (16) Fraktion 13

Die Fraktionen 5 bis 13 wurden vereinigt und zu Renaturierungsversuchen eingesetzt, indem sie in den oben beschriebenen Foldits schockverdünnt und anschließend inkubiert wurden. Nach 2 d Inkubation bei RT wurden die Folditansätze mittels SDS-PAGE analysiert (siehe Abb. 10).

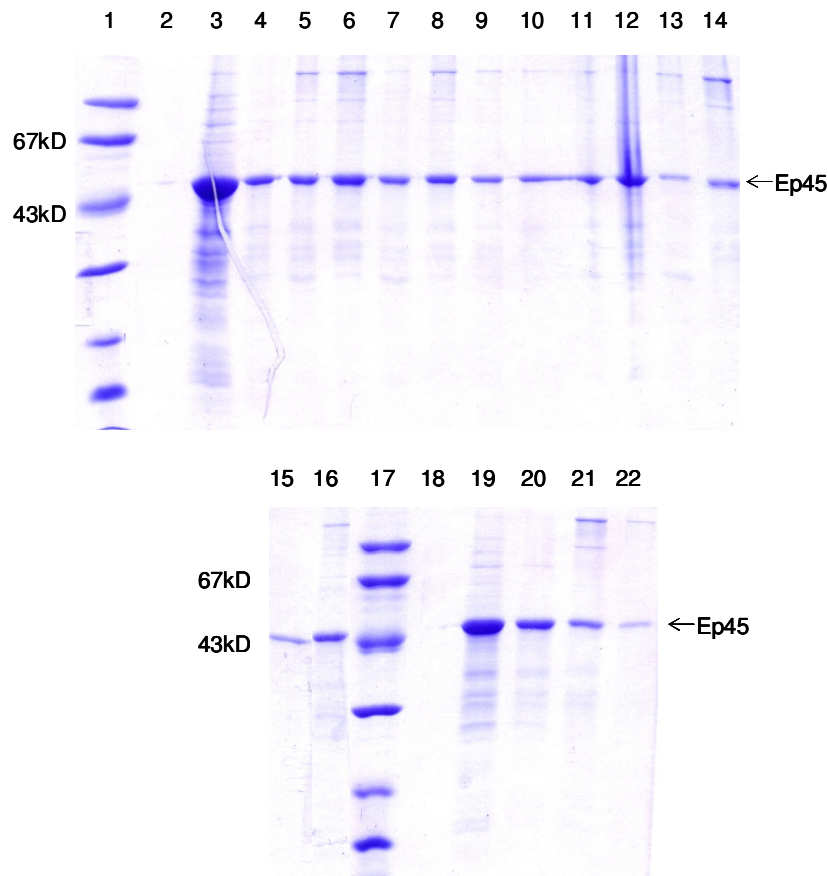


Abb. 10 SDS-PAGE der Renaturierung von Ep45 durch Foldits: Die vereinigte Eluate der S300-Säule wurden in den Foldits schockverdünnt und 2 d bei RT inkubiert. Anschließend wurden jeweils 100 μ l aus den Folditansätzen entnommen und einer Proteinfällung unterzogen. Die Pellets wurden in jeweils 10 μ l 2fach SDS-Probenpuffer (nicht-reduzierend) resuspendiert und auf das Gel aufgetragen. Von den vereinigte Eluate der S300-Säule wurden 10 μ l als Probe entnommen, einer Proteinfällung unterzogen und das Pellet in 10 μ l 2fach SDS-Probenpuffer (nicht-reduzierend) resuspendiert und ebenfalls auf das Gel aufgetragen. (1) Größenmarker, (2) leer, (3) vereinigte Eluate der S300-Säule, (4) Foldit 1, (5) Foldit 2, (6) Foldit 3, (7) Foldit 4, (8) Foldit 5, (9) Foldit 6, (10) Foldit 7, (11) Foldit 8, (12) Foldit 9, (13) Foldit 10, (14) Foldit 11, (15) Foldit 12, (16) Foldit 13, (17) Größenmarker, (18) leer, (19) Foldit 14, (20) Foldit 15, (21) Foldit 16, (22) Foldit 17

Dabei zeigte sich, dass keine signifikanten qualitativen Unterschiede zwischen den verschiedenen Renaturierungsansätzen auftraten. Daher ließ sich kein Hinweis darauf finden, welche Renaturierungsansätze erfolgreich zu einer Rückfaltung von Ep45 geführt haben.

Um dennoch zu überprüfen, ob in den Renaturierungsansätzen aktives Ep45 vorhanden ist, wurde wiederum der Enzymassay verwendet. In keinem Folditansatz konnte damit eine Aktivität nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde ein Bindungsassay durchgeführt. Dieser nutzt die Tatsache aus, dass bei der Interaktion zwischen Chymotrypsin und Ep45

die beiden Proteine einen Komplex bilden, der unter nichtreduzierenden Bedingungen stabil ist. In der SDS-PAGE zeigt sich dieser als Proteinbande bei ~70 kD. Zusätzlich treten Banden bei 45 kD (Ep45), 41 kD (ein Spaltprodukt, das bei der Spaltung von Ep45 durch Chymotrypsin entsteht) und 25 kD (Chymotrypsin) auf (Kotyza et al., 1998). Um zu überprüfen, ob in den Folditansätzen aktives Ep45 vorhanden ist, wurden Ep45 (aus den Folditansätzen 1, 2, 4; je 70 pmol) und Chymotrypsin (16 pmol) 1 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde nichtreduzierender SDS-Probenpuffer hinzugefügt, die Proben 1 min auf 100°C erhitzt und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Bei Auftrag der reinen Folditansätze zeigte sich Ep45 als Bande bei 45 kD. Bei Zugabe von Chymotrypsin trat diese Bande nicht mehr auf, sondern es wurden die 25 kD-Chymotrypsin-Bande und Spaltprodukte mit niedrigerem Molekulargewicht sichtbar. Ein Komplex aus Ep45 und Chymotrypsin (erwartetes Molekulargewicht 70 kD) konnte hingegen nicht nachgewiesen werden (siehe Abb. 11).

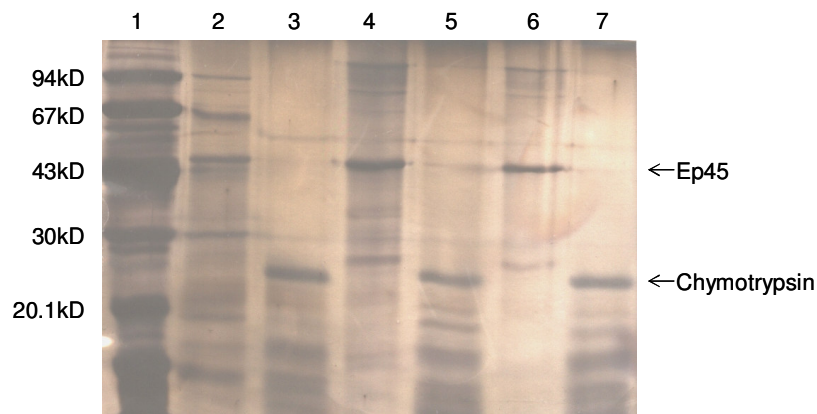


Abb. 11 SDS-PAGE des Bindungsassays (Silberfärbung): Von den Folditansätzen 1, 2 und 4 wurden Proben mit einem Ep45-Gehalt von 70 pmol entnommen und mit 16 pmol Chymotrypsin 1 min bei RT inkubiert. Es wurden 3 µl 6fach SDS-Probenpuffer (nicht-reduzierend) hinzugefügt, die Proben aufgeköcht und auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich wurden jeweils 10 µl der Folditansätze mit 3 µl 6fach SDS-Probenpuffer (nicht-reduzierend) vermischt, aufgeköcht und aufgetragen. Das Molekulargewicht von Chymotrypsin beträgt 25 kD, das Molekulargewicht des Komplexes aus Ep45 und Chymotrypsin beträgt 70 kD. (1) Größenmarker, (2) Folditansatz 1, (3) Folditansatz 1 plus Chymotrypsin, (4) Folditansatz 2, (5) Folditansatz 2 plus Chymotrypsin, (6) Folditansatz 4, (7) Folditansatz 4 plus Chymotrypsin

3.1.2 Expression von Ep45 mit dem pMal™-Fusionsprotein-System

Da zwar eine Expression von Ep45 mittels des Vektors Ep45pET25b(+) möglich war, nicht jedoch die Isolierung von Ep45 in korrekt gefalteter Form und in aktivem Zustand, wurde das pMal™-Fusionsprotein-System als alternatives Expressionssystem eingesetzt. Der hierbei benutzte Vektor pMal™-p2X enthält das Gen *malE*, das für das *maltose binding protein* (MBP) codiert, die Signalsequenz von *malE* zur Sekretion, den P_{tac} Promotor, das *lacI^q* Gen für den Lac Repressor, wodurch die Transkription nur nach Zugabe von IPTG erfolgt, einen Polylinker mit Schnittstellen für Restriktionsenzyme zur Insertion des Gens des zu untersuchenden Proteins, eine Sequenz zwischen *malE* und dem Polylinker, die für die Schnittstelle von Faktor Xa codiert und ein Gen für Ampicillinresistenz. Nach Klonierung des zu untersuchenden Gens hinter *malE* entsteht durch Transkription und Translation ein Fusionsprotein aus MBP und dem zu untersuchenden Protein. Aufgrund der Affinität von MBP für Amylose kann das Fusionsprotein durch eine Chromatographie an einer Amylosesäule isoliert und anschließend durch die Protease Faktor Xa gespalten werden.

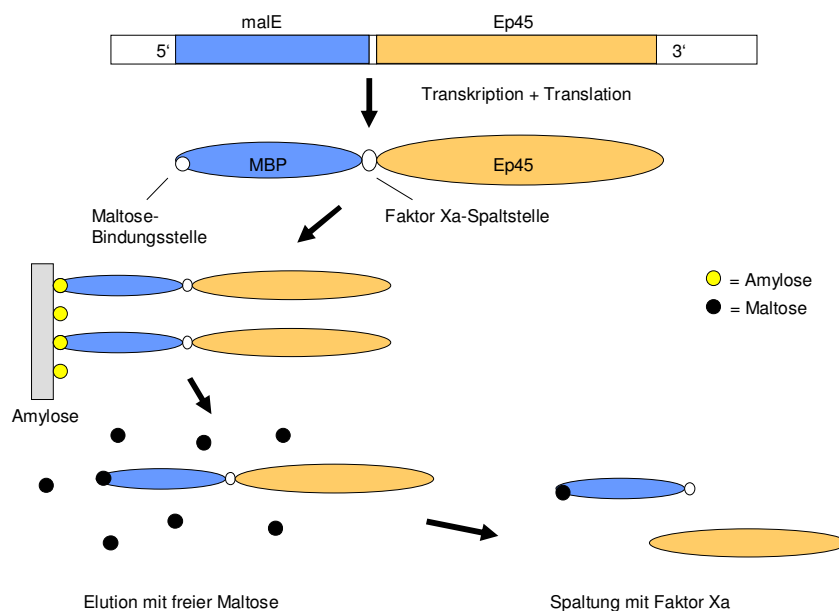


Abb. 12 pMal™-Fusionsprotein-System: Nach Klonierung von Ep45 hinter *malE* entsteht durch Transkription und Translation ein Fusionsprotein aus MBP und Ep45. Aufgrund der Affinität von MBP für Amylose kann das Fusionsprotein durch eine Chromatographie an einer Amylosesäule isoliert und anschließend durch die Protease Faktor Xa gespalten werden.

3.1.2.1 Herstellung des Plasmids pMalp2X-Ep45

Das *Ep45*-Gen wurde mittels PCR (PCR-Programm 1) mit den Primern PMalN1 und PMalC2 amplifiziert. PMalN1 enthält Sequenzen von bp 85-101 (+Strang) und eine Schnittstelle für *XMNI*, PMalC2 enthält Sequenzen von bp 1343-1347 (-Strang), ein Stop-Codon und eine Schnittstelle für *XbaI*. Als Template diente das Plasmid pET25b-xEp45. Die DNA wurde mittels des Cycle Pure Kits aufgereinigt und mit den Restriktionsenzymen *XMNI* und *XbaI* verdaut. Daraufhin erfolgte die Ligation des [*XMNI/XbaI*]-*Ep45*-Fragments in den [*XMNI/XbaI*]-gespaltenen Vektor pMalTM-p2X. Mit dem Ligationsansatz pMalp2X-Ep45 wurden kompetente XL1-Blue-Zellen transformiert. Zur Identifizierung positiver Klone wurde eine DNA-Minipräparation und ein Testverdau mit den Restriktionsenzymen *XMNI* und *XbaI* durchgeführt (siehe Abb. 13).

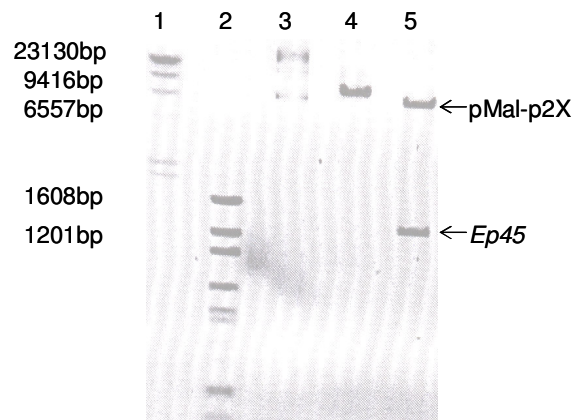


Abb. 13 Agarose-Gel des Testverdaus von pMalp2X-Ep45 (Größe: 7972 bp) mit *XMNI* und *XbaI*: Mittels Testverdau konnte die erfolgreiche Integration von *Ep45* (erwartete Fragmentgröße: 1262 bp) in den Vektor pMal-p2X nachgewiesen werden. (1) HMS, (2) LMS, (3) pMalp2X-Ep45 ungeschnitten (3 μ l), (4) pMalp2X-Ep45 *XbaI*-verdaut (10 μ l), (5) pMalp2X-Ep45 [*XMNI/XbaI*]-verdaut (10 μ l)

Die korrekte DNA-Sequenz wurde durch Sequenzierung der Plasmid-DNA mit Hilfe der Primer PMalP2-SQ-N1 und PMalP2-SQ-C1 verifiziert. Mit dem Plasmid pMalp2X-Ep45 wurden kompetente BL21-CodonPlus(DE3)-RIL-Zellen transformiert. Mit einer Übernachtskultur dieser transformierten Zellen wurde LB-Medium beimpft und bei 37°C kultiviert. Nachdem nach 2.5 h eine OD₆₀₀ von 0.5 erreicht war, wurde 0.3 mM IPTG

zugegeben, um die Induktion der Ep45-Expression zu starten. Nach weiteren 2 h bei 37°C wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet. In der SDS-PAGE ist eine Bande bei 95 kD sichtbar (Abb. 14), entsprechend der Größe des Fusionsproteins MBP-Ep45.

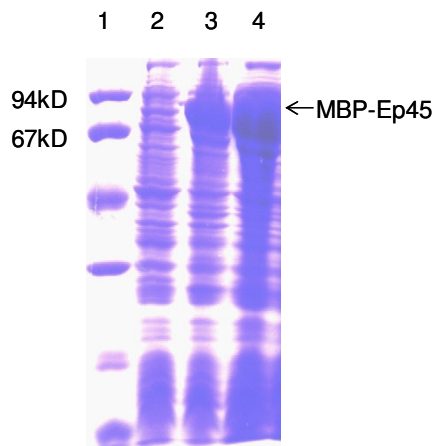


Abb. 14 SDS-PAGE der Induktion der Expression des Fusionsproteins MBP-Ep45: BL21-CodonPlus(DE3)-RIL-Zellen, transformiert mit pMalp2X-Ep45, wurden bei 37°C kultiviert. Bei einer OD_{600} von 0.5 wurde mit 0.3 mM IPTG induziert. Nach 2 h bei 37°C wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet. Vor Induktion und 2 h nach Induktion wurden jeweils 1 ml der Zellen zentrifugiert, in 2fach SDS-Probenpuffer (3 μ l/0.1 OD) resuspendiert, aufgekocht und auf das Gel aufgetragen. (1) Größenmarker, (2) vor Induktion, (3) nach Induktion, (4) Auftrag der Amylosesäule (5 μ l; siehe 4.1.2.2.)

3.1.2.2 Isolierung von MBP-Ep45 durch verschiedene Chromatographie-Verfahren

Zur Isolierung des Fusionsproteins MBP-Ep45 aus dem Proteingemisch der *E. coli*-Zellen wurde eine Chromatographie an einer Amylosesäule durchgeführt. Hierfür wurden die induzierten Zellen in Laufpuffer der Amylosesäule resuspendiert und die Zellwände mit Ultraschall aufgebrochen. Nach Zentrifugation wurde der Überstand 1:5 mit Laufpuffer verdünnt und auf die Amylosesäule aufgetragen. Nach Elution mit 10 mM Maltose wurde das Vorhandensein des Fusionsproteins in den Fraktionen mittels SDS-PAGE ermittelt (siehe Abb. 15).

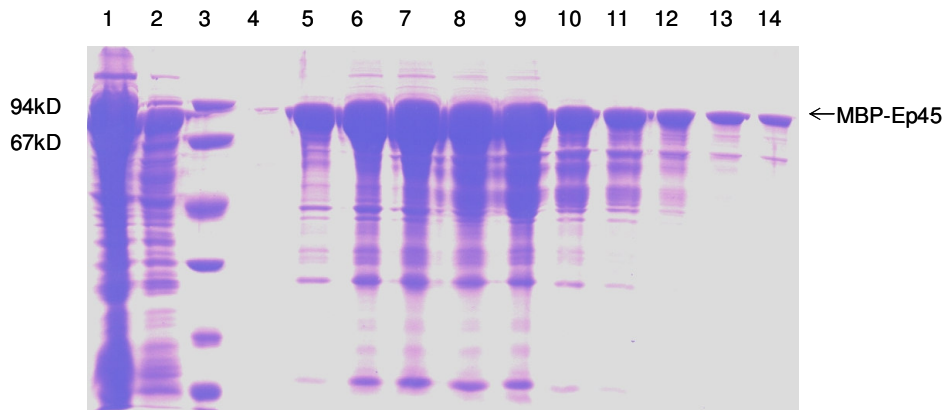


Abb. 15 SDS-PAGE der Chromatographie des Zellextraktes an der Amylosesäule: Nach Zentrifugation der mit Ultraschall behandelten Zellen wurde der Überstand 1:5 mit Laufpuffer verdünnt und auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 10 mM Maltose. Von Durchlauf, Waschen und den Fraktionen wurden jeweils 10 µl als Probe entnommen, mit 2 µl 6fach SDS-Probenpuffer versetzt, aufgeköcht und auf das Gel aufgetragen. (1) Durchlauf, (2) Waschen, (3) Größenmarker, (4) Fraktion 3, (5) Fraktion 4, (6) Fraktion 5, (7) Fraktion 6, (8) Fraktion 7, (9) Fraktion 8, (10) Fraktion 9, (11) Fraktion 10, (12) Fraktion 11, (13) Fraktion 12, (14) Fraktion 13

Aus der SDS-PAGE ging hervor, dass der Hauptanteil des Fusionsproteins in den Fraktionen 4-12 enthalten war. Diese Fraktionen wurden vereinigt und einer Spaltung durch Faktor Xa unterzogen (siehe Abb. 16)

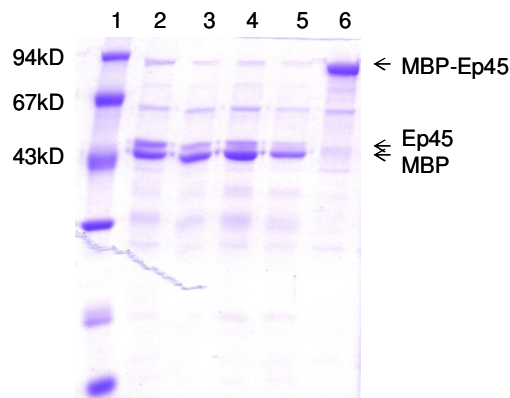


Abb. 16 SDS-PAGE der Spaltung des Fusionsproteins MBP-Ep45 mit Faktor Xa: Zu den vereinigten Fraktionen der Amylosesäule wurde Faktor Xa im Verhältnis 1:100 hinzugefügt und bei RT inkubiert. Nach 2/4/8/24 h wurden jeweils 5 µl des Spaltansatzes entnommen, mit SDS-Probenpuffer versetzt, aufgeköcht und auf das Gel aufgetragen. Das Molekulargewicht von MBP beträgt 43 kD. (1) Größenmarker, (2) nach 2 h Spaltung, (3) nach 4 h Spaltung, (4) nach 8 h Spaltung, (5) nach 24 h Spaltung, (6) vereinigte Fraktionen der Amylosesäule (5 µl)

In Abbildung 16 wird gezeigt, dass das Fusionsprotein MBP-Ep45 (95 kD) durch Faktor Xa in Ep45 (45 kD) und MBP (43 kD) gespalten wurde. Außerdem wird deutlich, dass eine Verlängerung der Inkubationszeit des Spaltansatzes keine Erhöhung des Spaltumsatzes bewirkte und dass auch nach 24 h Inkubationszeit noch ungespaltenes Fusionsprotein vorhanden war (Lane 5).

Um Ep45 von MBP zu trennen, sollte aufgrund der Affinität von Ep45 für Ni^{2+} eine Aufreinigung über eine Nickelsäule durchgeführt werden. Der Faktor Xa-Spaltansatz wurde deshalb gegen Laufpuffer I der Nickelsäule dialysiert. Während der Dialyse trat eine deutliche Präzipitation auf, weshalb das Dialysat zentrifugiert wurde und der Überstand auf die Nickelsäule aufgetragen wurde. Nach Elution mit 200 mM Imidazol konnte kein Ep45 in den Fraktionen detektiert werden. Um die Präzipitation während der Dialyse zu verhindern, wurde der Spaltansatz direkt auf die Nickelsäule aufgetragen. Bei diesem Vorgehen konnten die beiden Proteine MBP und Ep45 allerdings nicht voneinander getrennt werden.

Da eine Trennung der Spaltprodukte MBP und Ep45 über die Nickelsäulen-Chromatographie nicht möglich war, sollte als Alternative eine Isolierung über eine TMAE-Säule erfolgen. Wie oben beschrieben, wurde eine Chromatographie an der Amylosesäule durchgeführt, anschließend erfolgte die Spaltung durch Faktor Xa. Der Spaltansatz wurde gegen Laufpuffer der TMAE-Säule dialysiert und auf die Säule aufgetragen. In den Eluaten war weder Ep45 noch MBP nachweisbar.

Nachdem auch die Chromatographie an der TMAE-Säule nicht zur gewünschten Trennung von MBP und Ep45 geführt hatte, sollte als weitere Möglichkeit eine Isolierung über eine hydrophobe Säule erfolgen. Nach der Chromatographie an der Amylosesäule erfolgte zunächst eine geringgradige Denaturierung. Dafür wurden die vereinigten Eluate der Amylosesäule mit 500 mM Gnd·HCl, 20 mM Tris, 0.2 M NaCl, 1 mM Azid, pH 7.4 versetzt und 5 d bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde dieser Ansatz gegen 20 mM Tris, 0.2 M NaCl, 1 mM Azid, 10 mM 2-ME, 1 mM CaCl_2 , pH 7.4 dialysiert und das Dialysat mit Faktor Xa gespalten. Der Spaltansatz wurde zentrifugiert und der Überstand auf eine hydrophobe Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 90% auf 0% Ammoniumsulfat. In den Eluaten konnte kein Ep45 nachgewiesen werden.

Ein letzter Versuch der Expression und Isolierung von Ep45 mit dem pMal™-Fusionsprotein-System war die Umkehr des bisher verfolgten Protokolls. Das Fusionsprotein MBP-Ep45 sollte zunächst über eine Chromatographie an der Nickelsäule isoliert werden, dann die Spaltung durch Faktor Xa erfolgen und schließlich MBP und Ep45 durch eine Chromatographie an der Amylosesäule getrennt werden. Hierfür wurden die induzierten Zellen in Laufpuffer II der Nickelsäule resuspendiert und die Zellwände mit Ultraschall aufgebrochen. Nach Zentrifugation wurde der Überstand auf die Nickelsäule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 300 mM Imidazol (Elutionspuffer II). In der SDS-PAGE wurde deutlich, dass sich ein Großteil des Fusionsproteins MBP-Ep45 im Durchlauf befand. Deshalb wurde der Durchlauf gegen Niedrigsalzpuffer der TMAE-Säule dialysiert. Das Dialysat wurde auf die TMAE-Säule aufgetragen, die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 20 mM NaCl auf 1 M NaCl. SDS S. 68 Die Fraktionen 8-11 wurden vereinigt und gegen 20 mM Tris, 200 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, pH 7.4 dialysiert. Das Dialysat wurde durch Faktor Xa gespalten, zentrifugiert und der Überstand auf die Amylosesäule aufgetragen. Nach Elution mit 10 mM Maltose ging aus der SDS-PAGE hervor, dass keine Trennung von Ep45 und MBP erzielt werden konnte (siehe Abb. 17).

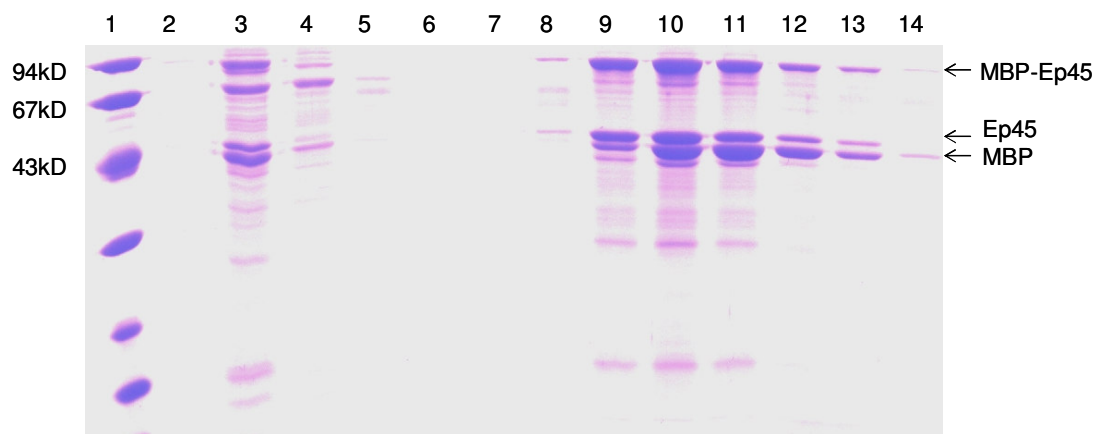


Abb. 17 SDS-PAGE der Chromatographie an der Amylosesäule: Nach der Chromatographie des Zellextraktes an der Nickelsäule und nach Chromatographie des Durchlaufs der Nickelsäule an der TMAE-Säule wurden die vereinigten Fraktionen der TMAE-Säule dialysiert. Dieses Dialysat wurde mit Faktor Xa gespalten, zentrifugiert und der Überstand auf die Amylosesäule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 10 mM Maltose. Von Durchlauf und Waschen wurden 100 µl als Probe entnommen, einer Proteinfällung unterzogen und das Pellet in jeweils 10 µl 2fach SDS-Probenpuffer resuspendiert, aufgeköcht und auf das Gel aufgetragen. Von den Fraktionen wurden jeweils 10 µl als Probe entnommen. (1) Größenmarker, (2) leer, (3) Auftrag (10 µl), (4) Durchlauf, (5) Waschen, (6) Fraktion 1, (7)

Fraktion 2, (8) Fraktion 3, (9) Fraktion 4, (10) Fraktion 5, (11) Fraktion 6, (12) Fraktion 7, (13) Fraktion 8, (14) Fraktion 9

3.2 Expression von Ep45 in Sf9-Zellen

Nachdem in *E. coli* zwar eine Expression von Ep45 aber keine Isolierung in aktiver Form erreicht werden konnte, wurde ein Expressionssystem unter Verwendung von Insektenzellen, also eukaryontischen Zellen, eingesetzt. Dies erfolgte unter der Annahme, dass eukaryontische Zellen im Gegensatz zu Bakterienzellen in der Lage sein könnten, Ep45, dessen Gen aus dem eukaryontischen Organismus *Xenopus laevis* stammt, in aktiver Form zu exprimieren, indem sie es richtig falten und glykosylieren.

Als Expressionssystem wurde das InsectSelect™ System (Invitrogen) verwendet. Dieses System erlaubt sowohl eine transiente als auch eine stabile Expression von Proteinen in Insektenzellen. Dafür wird der Vektor pIZT/V5-His (Invitrogen) verwendet. Dieser enthält den OpIE2 Promotor, ein Resistenzgen für Zeocin™, das mit dem Gen für *green fluorescent protein* (GFP) fusioniert ist, eine *multiple cloning site* mit Schnittstellen für Restriktionsenzyme, das V5 Epitop und den 6xHis tag. Nach Klonierung des zu untersuchenden Gens in pIZT/V5-His erfolgt die lipidvermittelte Transfektion des Konstrukts in Sf9-Zellen.

3.2.1 Herstellung des Plasmids pIZT/V5-xEp45

Zunächst wurde das *Ep45*-Gen mittels PCR (PCR-Programm 2) mit den Primern Ep45-BEVS-N1 und Ep45-BEVS-CA1 amplifiziert. Als Template diente der Vektor XI Ep45/2. In diesen Vektor ist die komplette cDNA von *Ep45* (23 => 1476) an der Restriktionsschnittstelle der *multiple cloning site* für *EcoRI* von Holland integriert und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden. Der Primer Ep45-BEVS-N1 enthält Sequenzen von bp 37-57 (+Strang) und eine *EcoRI*-Schnittstelle, die direkt vor das *Ep45*-Gen eingefügt wurde, der Primer Ep45-BEVS-CA1 enthält Sequenzen von bp 1327-1344 (-Strang) und eine Thrombin-Schnittstelle, die direkt hinter das *Ep45*-Gen eingefügt wurde. In einem zweiten Schritt wurde durch PCR (PCR-Programm 2) mit den Primern Ep45-BEVS-N1 und Ep45-BEVS-CB1 hinter die Thrombin-Schnittstelle ein His-Tag, ein Stopcodon und eine *XbaI*-Schnittstelle eingefügt. In einem dritten Schritt

wurde durch PCR (PCR-Programm 2) mit den Primern Ep45-BEVS-N2 und Ep45-BEVS-CB1 die Kozak-Translations-Initiations-Sequenz ACCATGG hinter die *EcoRI*-Schnittstelle eingefügt. Der Primer Ep45-BEVS-N2 enthält Sequenzen von bp 37-57 (+Strang), eine *EcoRI*-Schnittstelle und die Kozak-Translations-Initiations-Sequenz. Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XbaI* verdaut und in den [*EcoRI/XbaI*]-gespaltenen Vektor pIZ-V5-His kloniert. Mit dem Ligationsansatz wurden JM109-Zellen transformiert und der korrekte Klon pIZT/V5-xEp45 durch DNA-Minipräparation und anschließenden Testverdau identifiziert (siehe Abb. 18).

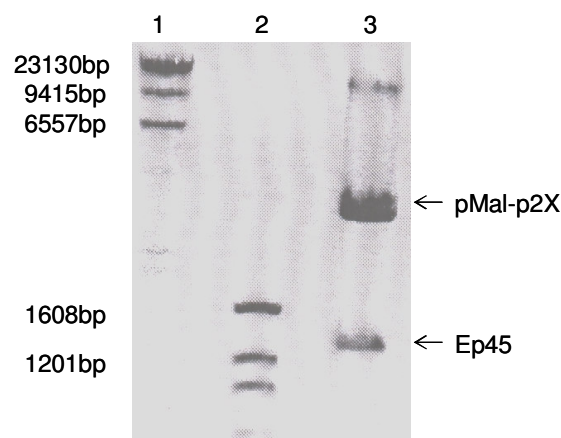


Abb. 18 Agarose-Gel des Testverdaus von pIZT/V5-xEp45 (Größe: 4653 bp) mit *EcoRI* und *XbaI*: Mittels Testverdau konnte die erfolgreiche Integration von *Ep45* (erwartete Fragmentgröße: 1304 bp) in den Vektor pIZT/V5-His (Größe: 3349 bp) nachgewiesen werden. (1) HMS, (2) LMS, (3) pIZT/V5-xEp45 [*EcoRI/XbaI*]-verdaut

Die korrekte DNA-Sequenz von pIZT/V5-xEp45 wurde durch Sequenzierung mit den Primern OpIE2-forward-seq.-primer und OpIE2-reverse-seq.-primer überprüft. Von einer Übernachtskultur von pIZT/V5-xEp45 in JM109-Zellen wurde das Plasmid mittels einer Maxipräparation gewonnen.

3.2.2 Transiente Expression von Ep45 in Sf9-Zellen

Um zu überprüfen, ob die Sf9-Zellen Ep45 exprimieren, wurde eine transiente Expression durchgeführt. Dazu wurden verschiedene Mengen des Plasmids pIZT/V5-xEp45 mit Insektenmedium und Insectin-Plus™ Liposomen inkubiert. Sf9-Zellen wurden 4 h mit diesem Transfektionsmix inkubiert und anschließend bei 27°C kultiviert. Sowohl

das Medium als auch die Zellen wurden nach 24 h auf das Vorhandensein von Ep45 untersucht. Dazu wurde das Medium zentrifugiert und der Überstand mittels Westernblot analysiert. Um den Inhalt der Zellen zu untersuchen, wurden die Zellwände mittels Lysepuffer zerstört. Nach Zentrifugation wurde der Überstand für den Westernblot eingesetzt. Für den Westernblot wurden als Primärantikörper Maus-anti-his-Antikörper, der an den eingefügten His-Tag bindet, und als Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus-Antikörper verwendet. Weder in den Zellen noch im Medium konnte Ep45 nachgewiesen werden.

Aus zeitlichen Gründen wurde meine praktische Arbeit zu diesem Zeitpunkt beendet. Das Projekt wird in der Arbeitsgruppe weiter bearbeitet.

4 Diskussion

4.1 Expression von Ep45 in *E. coli*

Die Signalvermittlung der BMPs erfolgt wie bei den anderen Vertretern der TGF- β Superfamilie durch die Bindung und Oligomerisierung zweier verschiedener Typen membranständiger Serin/Threonin-Kinase Rezeptorketten, welche als Typ I- und Typ II-Rezeptoren bezeichnet werden. Durch die Liganden vermittelte Oligomerisierung wird die so genannte GS-Box der Typ I-Rezeptorkette phosphoryliert und dadurch aktiviert. Die aktivierte Typ I-Rezeptorkette kann nun nachgeschaltete Proteine, die SMADs, aktivieren, welche letztendlich in den Zellkern wandern und dort die Expression responsiver Gene regulieren. Die Signalvermittlung wird sowohl auf intrazellulärer Seite, auf der Membranebene als auch auf extrazellulärer Ebene beeinflusst.

Auch für Ep45 wurde die extrazelluläre Bindung an ein Mitglied der BMP-Familie, nämlich BMP4, nachgewiesen (Iemura *et al.*, 1999). Anders als die bekannten BMP-Liganden wie zum Beispiel Chordin, Noggin oder Follistatin führt Ep45 nicht zur Inhibition der BMP-Funktion. Trotz Bindung von Ep45 an BMP4 kann BMP4 an seinen Typ I Rezeptor binden und die Signalvermittlung wie oben beschrieben ablaufen. Allerdings kann Follistatin nicht an BMP4, gekoppelt an Ep45, binden. Diese Fakten werfen die Frage der Bindungsstelle von Ep45 an BMP4 auf. Außerdem stellt sich die Frage nach der Struktur sowie der Funktion von Ep45.

Für Bindungsanalysen und insbesondere die Strukturaufklärung werden größere Mengen hochreinen Proteins benötigt, welches am besten durch rekombinante Expressionsverfahren hergestellt wird. Eine rekombinante Expression von Ep45 in *E. coli* wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben.

Beschrieben ist lediglich die Isolierung von Ep45 aus *Xenopus laevis*-Oozyten (Beck *et al.*, 1992). Dafür müssen die Ovarien von *Xenopus laevis*-Weibchen in Narkose entnommen werden, aus denen die Eizellen isoliert werden können. Eine weitere Möglichkeit ist die Isolierung von Ep45 aus *Xenopus laevis*-Embryonen (Beck *et al.*, 1992). Dazu wird mittels Gonadotropin-Injektion die Ovulation bei *Xenopus laevis*-Weibchen ausgelöst, die Eizellen werden mit Spermien, die aus den Hoden von *Xenopus laevis*-Männchen gewonnen werden, befruchtet und die Embryonen kultiviert.

Sowohl aus den Oozyten als auch aus den Embryonen wird Ep45 durch verschiedene Reinigungs-Schritte gewonnen.

Um diese aufwendigen Verfahren zu umgehen und eine einfachere Methode der Gewinnung von Ep45 zu etablieren, sollte Ep45 in dieser Arbeit in *E. coli* exprimiert und isoliert werden. Ein Vorteil der Expression in *E. coli* liegt in der wenig zeitaufwendigen und kostengünstigen Gewinnung großer Mengen an Protein. Daher stellt die Expression in *E. coli* die erste Wahl zur Herstellung von Ep45 dar.

4.1.1 Expression von Ep45 mit dem Vektor pET25b-xEp45

Zur Expression von Ep45 in *E. coli* wurden BL21-CodonPlus(DE3)-RIL-Zellen (Stratagene) ausgewählt. Diese besitzen spezielle Gene für tRNA, die Problemen des seltenen Codon-Gebrauchs entgegenwirken. Zusätzlich zeichnen sie sich durch eine hohe Ertragsmenge aus. BL21-CodonPlus(DE3)-RIL-Zellen wurden mit dem Vektor pET25b-xEp45, der von L. J. Holland zur Verfügung gestellt wurde, transformiert. Nach Induktion der Genexpression wurde die Ep45-Synthese mittels SDS-PAGE überprüft (Abb.4). Darin war eine deutliche Bande bei ca. 45 kD sichtbar. Das entspricht dem Molekulargewicht von Ep45, so dass auf eine korrekte Expression geschlossen werden konnte.

Zur Isolierung von Ep45 aus dem Proteingemisch wurde entsprechend dem Verfahren vorgegangen, nach dem Ep45 aus den *Xenopus laevis*-Embryonen gewonnen wird (Iemura, 1999). Nach Ernten der Bakterien wurden diese aufgeschlossen und der nach Zentrifugation erhaltene lösliche Überstand mittels Kationenaustauschchromatographie getrennt. Die im Anschluss daran durchgeführte SDS-PAGE (Abb. 5) zeigte jedoch, dass Ep45 in den Eluaten nicht nachweisbar ist, sondern sich überwiegend im Durchlauf befindet. Aus unbekanntem Gründen konnte keine Bindung von Ep45 an die Säule erreicht werden und somit auch keine Abtrennung von Ep45 von den anderen exprimierten Proteinen erfolgen.

Ein Großteil des induzierten Ep45 lag in Form unlöslicher *inclusion bodies* vor. Um dennoch nach dem vorgegebenen Protokoll der Ep45-Isolierung (Iemura, 1999) zu verfahren, wurde Ep45 durch Harnstoff aus den *inclusion bodies* extrahiert. Bei diesem Verfahren kommt es zu einer vollständigen Denaturierung von Ep45. Zur Rückfaltung

von Ep45 in seine native Form mit korrekt ausgebildeten Disulfidbrücken sind in der Literatur bisher keine Protokolle beschrieben, so dass der Ansatz in verschiedenen Renaturierungsansätzen der Firma Hampton Research, sogenannte *Foldits* (Tab. 9), inkubiert wurde. Diese bieten ein breites Spektrum an Bedingungen, die zur Renaturierung von Proteinen geeignet sind. Die zur Kontrolle der Renaturierung durchgeführte nicht-reduzierende SDS-PAGE (Abb. 6) ließ in allen Ansätzen eine deutliche 45 kD-Bande erkennen, wobei allerdings auch weitere Proteine nachweisbar waren. Die Reinheit von Ep45 betrug ca. 85%. Es fiel auf, dass die einzelnen Ep45-Banden vor und nach Renaturierung sich nicht in ihrem Laufverhalten voneinander unterscheiden. Eine korrekte Renaturierung verändert jedoch in der Regel das Laufverhalten des Proteins. Das ist ein erster Hinweis dafür, dass keine erfolgreiche Renaturierung von Ep45 erreicht werden konnte.

Um trotzdem die funktionelle Aktivität von Ep45 zu überprüfen, wurde ein Enzymassay angewandt, der auf der Serinproteaseinhibitor-Funktion von Ep45 beruht. Mit einem vergleichbaren Test konnte Beck die Aktivität von Ep45 als Serpin nachweisen (Beck *et al.*, 1992). Dabei inhibiert Ep45 die Serinprotease Chymotrypsin, so dass Chymotrypsin ein spezifisches Substrat nicht mehr in das jeweilige Produkt umsetzen kann, dessen Konzentration photometrisch bestimmt wird. Beck verwendete als Substrat für Chymotrypsin N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Leu-*p*-Nitroanilin, während hier gemäß dem Protokoll von Walsh *et al.*, 1970 N-Benzoyl-L-Tyrosin Ethyl Ester eingesetzt wurde. Der Enzymassay wurde mit verschiedenen Renaturierungsansätzen durchgeführt. Dabei konnte kein aktives Ep45 nachgewiesen werden. Das bedeutet, dass in den Renaturierungsansätzen kein Ep45 in aktiver Form vorhanden war. Die Renaturierungsansätze scheinen nicht die richtigen Bedingungen geboten haben, um eine korrekte Rückfaltung von Ep45 zu ermöglichen. Da Ep45 nicht rein genug in den *inclusion bodies* vorlag, kann dies die Renaturierung verhindert haben. Es wurde versucht, Ep45 aus dem Proteingemisch der denaturierten *inclusion bodies* aufzureinigen und anschließend die Renaturierung durchzuführen. Zur Isolierung wurde eine Kationenaustauschchromatographie eingesetzt. Die SDS-PAGE (Abb.8) zeigte jedoch, dass Ep45 scheinbar auf der Säule präzipitiert, da weder im Durchlauf noch in den Eluaten Ep45 nachweisbar war. Hier zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen Ep45 in löslicher bzw. in unlöslicher Form. Lösliches Ep45 befand sich nach

Kationenaustauschchromatographie im Durchfluss während unlösliches Ep45 auf der Säule präzipitierte.

Da alle Versuche mit den durch Harnstoff denaturierten Ansätzen scheiterten, wurde als Alternative die in unserer Arbeitsgruppe etablierte Methode der Denaturierung der *inclusion bodies* mit Gnd-HCl durchgeführt. Daran schloss sich eine Gelchromatographie zur Isolierung von Ep45 aufgrund seiner Größe an. In Abb. 9 ist eine wesentlich bessere Anreicherung von Ep45 als in den vorhergehenden Versuchen erkennbar. In den anschließend durchgeführten Renaturierungsversuchen zeigte sich ein weitgehend reines Ep45 (Abb. 10). Zur Prüfung der funktionellen Aktivität wurde wie oben beschrieben der Enzymassay angewandt, ohne jedoch aktives Ep45 nachweisen zu können.

Als Alternative zum Enzymassay wurde ein weiterer Aktivitätstest durchgeführt. Dieser Bindungsassay ist in der Literatur von Kotyza (1998) beschrieben worden. Er beruht auf der Tatsache, dass Ep45 mit Chymotrypsin einen unter nichtreduzierenden Bedingungen stabilen Komplex bildet, der durch SDS-PAGE nachweisbar ist. Doch auch damit konnte keine Ep45-Aktivität nachgewiesen werden. Dies könnte wiederum darauf beruhen, dass in den Ansätzen Ep45 nicht korrekt rückgefaltet wurde und deshalb nicht funktionell aktiv sein konnte.

4.1.2 Expression von Ep45 mit dem pMal™-Fusionsprotein-System

Alle Versuche, bakteriell hergestelltes Ep45 zu isolieren, waren nicht erfolgreich. Ep45 wurde nicht als lösliches Protein exprimiert, sondern lag in Form unlöslicher Aggregate, den *inclusion bodies*, vor. Aus diesen konnte kein aktives Ep45 zurückgefaltet werden. Um Ep45 in löslicher Form zu exprimieren, wurde das pMal™-Fusionsprotein-System eingesetzt.

Das *Ep45*-Gen wurde in den Vektor pMal-p2X inkloniert und die erhaltenen Klone sequenziert. Nach Induktion der Genexpression wurde die Synthese des Fusionsproteins MBP-Ep45 mittels SDS-PAGE überprüft (Abb. 14). Darin ist eine deutliche Bande bei ca. 95 kD erkennbar, entsprechend dem Molekulargewicht von MBP-Ep45, so dass auf eine korrekte Expression zu schließen ist. Die nachfolgende Isolierung von MBP-Ep45 durch Affinitäts-Chromatographie an einer Amylosesäule konnte nur teilweise erreicht

werden. In der SDS-PAGE (Abb. 15) sind in den Eluaten neben der Bande von MBP-Ep45 noch weitere Banden sichtbar, so dass von einer Verunreinigung der Eluate mit anderen Proteinen ausgegangen werden muss.

Um nun Ep45 von MBP zu trennen, erfolgte eine Spaltung des Fusionsproteins mit Faktor Xa. Diese Spaltung konnte erfolgreich durchgeführt werden, was durch eine SDS-PAGE gezeigt werden konnte (Abb. 16). Allerdings war die Spaltung nicht vollständig, da weiterhin die Bande des Fusionsproteins erkennbar blieb. Weder eine Verlängerung der Inkubationszeit noch eine Erhöhung der Menge des eingesetzten Faktors Xa konnte eine komplette Spaltung bewirken.

Ziel des nächsten Schrittes war die Trennung der beiden Einzelproteine Ep45 und MBP voneinander. Dies sollte durch Affinitätschromatographie an einer Nickelsäule erfolgen. Während der vorbereitenden Dialyse des Spaltansatzes kam es jedoch zu einer deutlichen Präzipitation. Das deutet darauf hin, dass Ep45 als Einzelprotein nicht in Lösung gehalten werden konnte. Eine Pufferinkompatibilität oder eine kinetische Komponente könnten dafür die Ursache sein.

Als Alternative zur Affinitätschromatographie an der Nickelsäule wurde die Chromatographie an einer TMAE-Säule durchgeführt, um Ep45 von MBP zu isolieren. Dabei präzipitierte jedoch der Auftrag auf der Säule, da weder im Durchlauf noch in den Eluaten Ep45 bzw. MBP nachgewiesen werden konnten.

Auch ein weiterer Versuch der Trennung der beiden Proteine, nämlich die Chromatographie an einer hydrophoben Säule, konnte keinen Erfolg erzielen. Wieder präzipitierte Ep45 auf der Säule.

Solange Ep45 noch an MBP gebunden war, konnte es in Lösung gehalten werden. Die sofortige Präzipitation von Ep45, sobald es nicht mehr als Fusionsprotein sondern als Einzelprotein vorlag, deutete darauf hin, dass es mit Hilfe des pMal™-Fusionsprotein-System nicht in stabiler Form exprimiert werden konnte. Auch die Umkehr des angewandten Protokolls (Kapitel 3.1.2.5) führte nicht zu einer erfolgreichen Isolierung von Ep45.

In den diversen Versuchen zeigte sich eine mangelnde Affinität von Ep45 an die Nickelsäule. Das könnte ein Hinweis dafür sein, dass Ep45 nicht korrekt gefaltet vorlag und daher auch die Metallbindungsstelle, der sogenannte *histidine-metal-zipper*, nicht in ihrer richtigen Struktur vorhanden war.

Zusammenfassend lässt sich aussagen, dass Ep45 sowohl als Einzelprotein als auch als Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert werden konnte. Die Proteine waren jedoch biologisch inaktiv.

4.2 Expression von Ep45 in Sf9-Zellen

All diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass Bakterienzellen nicht in der Lage sind, Ep45, das ja aus dem eukaryontischen Organismus *Xenopus laevis* stammt, in korrekter Faltung zu exprimieren. Daraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass eukaryonte Zellen eher in der Lage sein könnten, dieses Protein richtig gefaltet und in aktiver Form zu synthetisieren. In eukaryonten Zellen erfolgt eine sekundäre Modifikation der exprimierten Proteine, unter anderem durch Glykosylierung. Diese wird in prokaryonten Zellen jedoch nicht durchgeführt. Ep45 sollte bewusst ohne Glykosylierung synthetisiert werden, da diese ein Hindernis für die Kristallisation darstellt, die Voraussetzung zur Aufklärung der Struktur von Ep45 und des Ep45-BMP4-Komplexes mittels Röntgenstrukturanalyse ist. Ep45 scheint allerdings zu den Proteinen zu gehören, die ohne Glykosylierung ihre Stabilität verlieren, so dass eine Isolierung von Ep45 aus Bakterienzellen nicht möglich ist.

Um dennoch das aufwendige Verfahren der Gewinnung von Ep45 aus *Xenopus laevis*-Oozyten bzw. –Embryonen zu umgehen, sollte Ep45 in Sf9-Zellen, eukaryonte Zellen aus Insekten, exprimiert werden. Dazu wurde das InsectSelect™ System benutzt.

Die Integration des *Ep45*-Gens in den Vektor pIZT/V5-His inklusive einer Thrombin-Schnittstelle und eines His-Tags wurde erfolgreich durchgeführt, was durch Sequenzierung der Plasmid-DNA verifiziert werden konnte. Anschließend wurden Versuche zur transienten Expression von Ep45 in Sf9-Zellen durchgeführt. Dies erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers Invitrogen, ohne dass jedoch eine Expression von Ep45 erreicht werden konnte. Aus zeitlichen Gründen musste die praktische Arbeit zu diesem Zeitpunkt beendet werden, so dass keine weiteren Expressionssysteme für Ep45 getestet werden konnten. Um eine erfolgreiche Expression von Ep45 zu realisieren, könnten diverse weitere Strategien zur Anwendung kommen. Dabei kommt neben der Optimierung der Renaturierung von Ep45 aus *inclusion bodies* der Einsatz anderer Fusionsprotein-Systeme in Frage, z.B. das Thioredoxin-Fusionsproteinsystem, welches in

unserem Labor etabliert ist und womit beispielsweise auch die extrazelluläre Domäne von BMPR-IA exprimiert werden konnte (Kirsch et al., 2000b), oder das GST-Fusionsproteinsystem. Weiterhin könnten andere Bakterienzellen in Frage kommen, ebenso wie die Expression in anderen eukaryonten Zellen wie z.B. Säugetierzellen (CHO, NS0, NIH293T).

5 Zusammenfassung

Die BMPs (*Bone morphogenetic proteins*) sind Zytokine, die in fast allen Tieren exprimiert werden und zur TGF- β Superfamilie gehören. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Knochenentwicklung, unter anderem auf Grund ihrer Fähigkeit, die Neubildung von Knochen auszulösen. Eine weitere Aufgabe der BMPs liegt in der Beeinflussung der Embryogenese. Hier tragen sie zur Differenzierung der einzelnen Keimblätter bei und werden während der Organogenese in vielen Organanlagen exprimiert.

Ep45, ein Protein aus *Xenopus laevis*, gehört zur Familie der Serinproteaseinhibitoren und ist ein extrazellulärer Ligand von BMP4, ohne jedoch dessen Rezeptorbindung bzw. dessen Aktivität zu beeinflussen. Ep45, auch bekannt unter dem Namen pNiXa, wird in der Embryogenese von *Xenopus laevis* wirksam: Es induziert die Reifung von Oozyten, kann im weiteren Verlauf in verschiedenen Organanlagen nachgewiesen werden und wird in Zusammenhang gebracht mit Teratogenität, die durch Ni^{2+} hervorgerufen wird. Um auf die aufwendige Isolierung von Ep45 aus *Xenopus*-Oozyten bzw. -Embryonen verzichten zu können, sollte in dieser Arbeit eine Methode zur rekombinanten Expression und Isolierung von aktivem Ep45 entwickelt werden.

Zunächst wurde die Expression von Ep45 in *E. coli* als lösliches Einzelprotein mit dem Vektor pET25b(+) angestrebt. Da sich jedoch zeigte, dass das Protein zum Großteil als unlösliche Aggregate in Form von *inclusion bodies* vorlag, wurden diese präpariert, denaturiert und eine Isolierung von Ep45 durch verschiedene Chromatographie-Verfahren (Kationenaustauschersäule, Gelchromatographie) unternommen. Durch die nachfolgenden Renaturierungsversuche konnte jedoch kein aktives Protein gewonnen werden. Zum Nachweis von aktivem Ep45 dienten ein Enzymassay, der auf der Serinproteaseinhibitor-Funktion von Ep45 beruht, sowie ein Bindungsassay. Dieser weist den Ep45-Chymotrypsin-Komplex nach, der bei der Inhibition von Chymotrypsin durch Ep45 entsteht. Als alternatives Expressionssystem kam deshalb das pMalTM-Fusionsprotein-System zur Anwendung. Dazu wurde Ep45 an MBP gekoppelt, so dass eine Aufreinigung mittels Chromatographie an einer Amylosesäule möglich werden sollte. Nach Spaltung durch Faktor Xa sollten die beiden Proteine durch Chromatographie voneinander getrennt werden, so dass schließlich Ep45 als reines aktives Protein vorliegt. Trotz des Einsatzes diverser Chromatographie-Verfahren

(Ionentauschersäule, hydrophobe Säule, Nickelsäule) gelang keine Isolierung von Ep45. Da in *E. coli* zwar eine Expression jedoch keine Aufreinigung von aktivem Ep45 gelang, wurde ein Expressionssystem unter Verwendung von Sf9-Zellen (Insektenzellen) eingesetzt. Nach Herstellung des Plasmids pIZT/V5-xEp45 wurden Versuche zur transienten Expression von Ep45 in Sf9-Zellen mittels des InsectSelect™ Systems durchgeführt, die jedoch nicht zum gewünschten Erfolg führten. Zu diesem Zeitpunkt wurde meine Arbeit beendet, so dass künftig nach weiteren Strategien gesucht werden muss, um eine rekombinante Expression von aktivem Ep45 zu ermöglichen. Damit könnten dann weiterführende Untersuchungen zur Struktur von Ep45, zur Interaktion zwischen Ep45, BMP4 und den BMP-Rezeptoren, zum Wirkungsmechanismus und zur Funktion von Ep45 durchgeführt werden. Im weiteren könnten neue Erkenntnisse in den Funktionsabläufen der Knochenbildung und der Embryogenese gewonnen werden, die eventuell auch auf den Menschen übertragbar sind, so dass daraus diagnostische und therapeutische Konsequenzen im Bereich von Knochenerkrankungen und embryonalen Entwicklungsstörungen zu ziehen sind.

6 Literaturverzeichnis

1. **Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. (1994)** Molekularbiologie der Zelle. VCH Weinheim
2. **Balemans W., Van Hul W. (2002)** Extracellular regulation of BMP signaling in in vertebrates: A cocktail of modulators. *Developm. Biology* 250: 231-250
3. **Beck B. L., Henjum D. C., Antonijczuk K., Zaharia O., Korza G., Ozols J., Hopfer S. M., Barber A. M., Sunderman F. W. Jr. (1992)** pNiXa, a Ni²⁺-binding protein in *Xenopus* oocytes and embryos, shows identity to Ep45, an Estrogen-regulated hepatic serpin. *Res. Com. in chem. Path. and pharm.*, Vol. 77, No.1
4. **Birnboim H. C., Doly J. (1979)** Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid-DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-1523
5. **Bullock W. O., Fernandez J. M., Short J. M. (1987)** XL1-blue: a high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with β -galactosidase selection. *Biotechniques* 5: 376-379
6. **Dale L., Jones C. M. (1999)** BMP signalling in early *Xenopus* development. *BioEssays* 21: 751-760
7. **Derynck R., Zhang Y., Feng X. (1998)** Smads: transcriptional activators of TGF- β responses. *Cell*, Vol 95: 737-740
8. **Ducy P., Karsenty G. (2000)** The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney International* Vol 57: 2207-2214
9. **Geesink R. G. T., Hoefnagels N. H. M., Bulstra S. K. (1999)** Osteogenic activity of Op-1, bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) in a human fibulas defect model. *J. of Bone and Joint Surgery, British* Vol. 81: 710-718
10. **Goto N., Muto S., Sugimoto I., Ikawa-Kitayama K., Igarashi K., Ito S., Hashimoto E. (2001)** A serpin with M_r 43,000 is a binding protein of M_r 25,000 protein, a substrate for protein ser/thr kinase detected in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Biochem.* 129: 229-236

11. **Graff J.M. (1997)** Embryonic patterning: To BMP or not to BMP, that is the question. *Cell* 89: 171-174
12. **Groeneveld E. H. J., Burger E. H. (2000)** Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *European J. of Endocr.* 142: 9-21
13. **Hanahan D. (1983)** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 166(4): 557-580
14. **Harland R. M. (1994)** The transforming growth factor β family and induction of the vertebrate mesoderm: Bone morphogenetic proteins are ventral inducers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10243-10246
15. **Haspel J., Sunderman F. W. Jr., Hofper S. M., Henjum D. C., Brandt-Rauf P. W., Weinstein I. B., Nishimura S., Yamaizumi Z., Pincus M. R. (1993)** A nickel-binding serpin, *pNiXa*, induces maturation of *Xenopus* oocytes and shows synergism with oncogenic *ras*-p21 protein. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 79, No. 2, 131-140
16. **Herrmann R. G., Whitfeld P. R., Bottomley W. (1980)** Construction of a *Sall/PstI* restriction map of spinach chloroplast DNA using low-gelling-temperature-agarose electrophoresis. *Gene* 8(2): 179-191
17. **Hofbauer L. C., Henfelder A. E. (1996)** Updating the metalloprotease nomenclature: bone morphogenetic protein-1 identified as procollagen C proteinase. *Europ. J. of Endocr.* 135: 35-36
18. **Hogan B. L. M. (1996a)** BMP: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes and Dev.* 10: 1580-1594
19. **Hogan B. L. M. (1996b)** Bone morphogenetic proteins in development. *Curr. Op. In gen. and dev.* 6: 432-438
20. **Holland L. J., Suksang C., Wall A. A., Roberts L. R., Moser D. R., Bhattacharya A. (1992)** A major estrogen-regulated protein secreted from the liver of *X. laevis* is a member of the serpin superfamily. *JBC* 267: 7053-7059
21. **Iemura S., Yamamoto T. S., Takagi C., Kobayashi H., Ueno N. (1999)** Isolation and characterization of bone morphogenetic protein-binding proteins from the early *Xenopus* embryo. *J. Biol. Chem.* 274: 26843-26849

22. **Iemura S., Yamamoto T. S., Takagi C., Uchiyama H., Natsume T., Shimasaki S., Sugino H., Ueno N. (1998)** Direct binding of follistatin to a complex of bone-morphogenetic protein and its receptor inhibits ventral and epidermal cell fates in early *Xenopus* embryo. Proc Natl Acad Sci 95: 9337-9342
23. **Josso N., di Clemente N. (1997)** Serine / threonine kinase receptors and ligands. Curr Op in Gen and Dev 7: 371-377
24. **Junqueira L. C., Carneiro J. (1996)** Histologie. Schiebler T. H. (Hrsg) 4. Auflage Springer Berlin Heidelberg New York
25. **Kirsch T., Nickel J. Sebald W. (2000a)** BMP2 antagonists emerge from alterations in the low affinity binding epitope for receptor BMPR-II. EMBO 19, No. 13: 3314-3324
26. **Kirsch T., Nickel J., Sebald W. (2000b)** Isolation of recombinant BMP receptor IA ectodomain and its 2:1 complex with BMP-2. FEBS Letters 468: 215-219
27. **Kirsch T., Sebald W., Dreyer M. K. (2000c)** Crystal structure of the BMP-2-BRIA ectodomain complex. Nature structural biology 7, No. 6: 492ff.
28. **Kotyza J., Verghese A. H., Korza G., Sunderman F. W. (1998)** Interactions of serine proteinases with pNiXa, a serpin of *Xenopus* oocytes and embryos. Biochim Biophys Acta 1382 (2): 266-276
29. **Lacroix P. (1945)** Recent investigations on the growth of bone. Nature 156: 576
30. **Laemmli U. K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685
31. **Lemaire P., Yasuo H. (1998)** Developmental signalling: A careful balancing act. Current Biology 8: R228-R231
32. **Liu F., Ventura F., Doody J., Massagué J. (1995)** Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): Extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. Mol Cell Biol 15, No. 7: 3479-3486
33. **Massagué J. (1998)** TGF- β signal transduction. Annu. Rev. Biochemistry 67, 753-791
34. **Massagué J., Attisano L., Wrana J. L. (1994)** The TGF- β family and its composite receptors. Trends in Cell biology 4: 172ff.

35. **Reddi A. H. (1998)** Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nature Biotechnology* 16: 247-252
36. **Ruppert R., Hoffmann E., Sebald W. (1996)** Human bone morphogenetic protein 2 contains a heparin-binding site which modifies its biological activity. *Eur. J. Biochem.* 237: 295-302
37. **Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Erlich H. A. (1988)** Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA-Polymerase. *Science* 239: 487-491
38. **Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989)** *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
39. **Sampath T. K., Reddi A. H. (1981)** Dissociative extraction and reconstitution of bone matrix components involved in local bone differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 7599-7603
40. **Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467
41. **Sive H. L. (1993)** The frog princess: A molecular formula for dorsoventral patterning in *Xenopus*. *Genes dev.* 7: 1-12
42. **Smith W. C. (1999)** TGF β inhibitors new and unexpected requirements in vertebrate development. *TIG* Vol 15, No. 1: 3-5
43. **Sunderman F. W. Jr. (1993)** Search for molecular mechanisms in the genotoxicity of nickel. *Scand J Work Environ Health* 19 suppl I: 75-80
44. **Sunderman F. W. Jr., Varghese A. H., Kroftova O. S., Grbac-Ivankovic S., Kotyza J., Datta A. K., Davis M., Bal W. Kasprzak K. S. (1996)** Characterization of pNiXa, a serpin of *Xenopus laevis* oocytes and embryos, and its histidine-rich, Ni(II)-binding domain. *Mol Reprod Dev* 44: 507-524
45. **Urist M. R. (1965)** Bone: Formation by autoinduction. *Science* 150: 893-899
46. **Walsh K. A., Wilcox P. E. (1970)** *Methods in Enzymology* XIX, 31-41
47. **Weiner M. P., Anderson C., Jerpseth B., Wells S., Johnson-Browne B., Vaillancourt P. (1994)** *Strategies* 7(2): 41-43

48. **Wilson P. A., Hemmati-Brivanlou A. (1995)** Induction of epidermis and inhibition of neural fate by BMP-4. *Nature* 376: 331-333
49. **Wozney J. M., Rosen V., Celeste A. J., Mitsock L. M., Whittiers M., Kriz W. R. et al. (1988)** Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242: 1528-1534
50. **Wrana J. L., Attisano L., Wieser R., Ventura F. Massagué J. (1994)** Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature* 370: 341ff.
51. **Wray W., Boulikas T., Wray V. P., Hancock R. (1981)** Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem.* 118(1): 197-203
52. **Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J. (1985)** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33(1): 103-119

7 Anhang

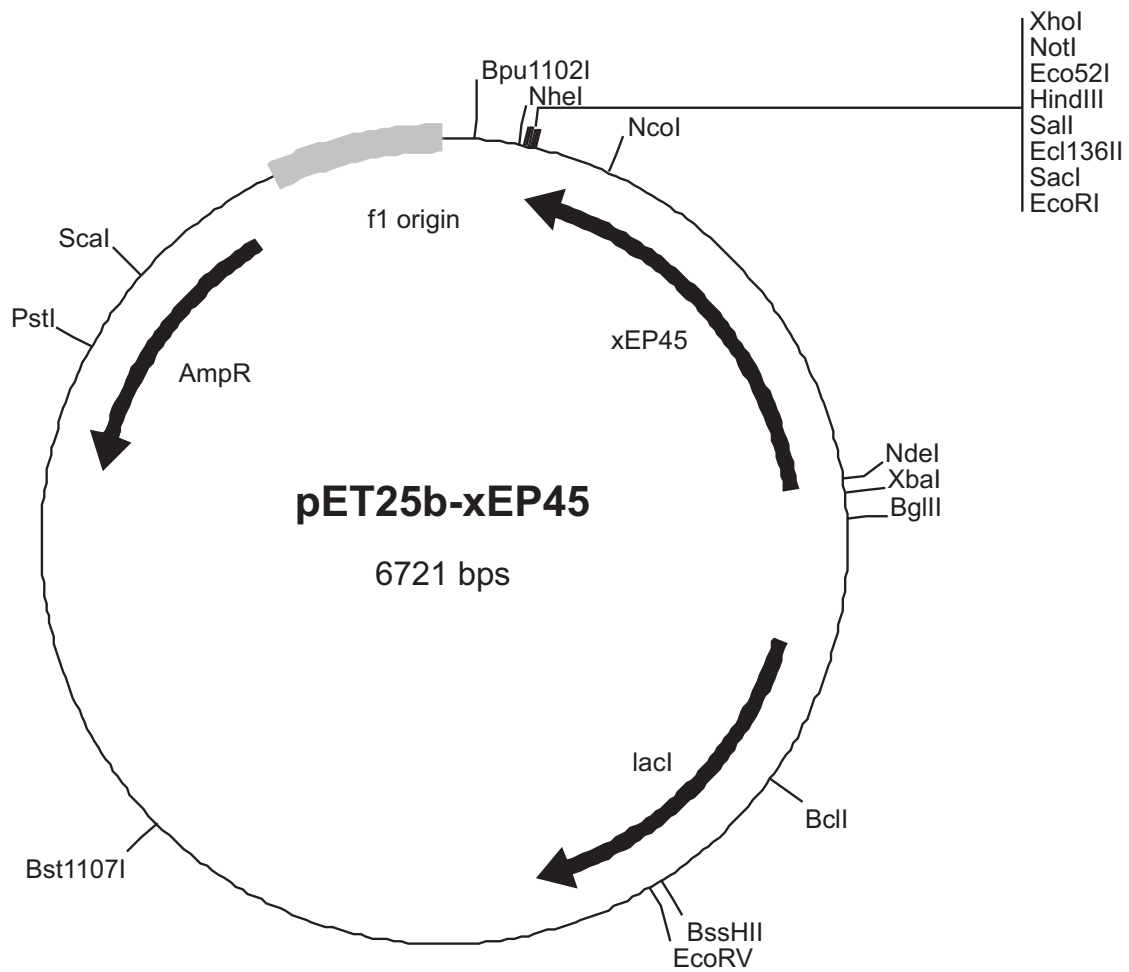
7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abs.	absolut
APS	Ammoniumpersulfat
BMP	Bone morphogenetic protein
Bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumine
BT	n-Benzoyl-L-Tyrosin
BTEE	n-Benzoyl-L-Tyrosin Ethyl Ester
D	Dalton
ddNTP	Didesoxynucleosid-5'-phosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleosid-5'-phosphat
DTT	Dithiothreit
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Gnd·HCl	Guanidiniumhydrochlorid
GSH	Glutathion reduziert
GSSG	Glutathion oxidiert
HMS	hochmolekularer DNA-Größenstandard
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
LMS	niedermolekularer DNA-Größenstandard
MBP	Maltose binding protein
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
OAc	Acetat
OD _x	Optische Dichte bei x nm
Ox.	oxidiert

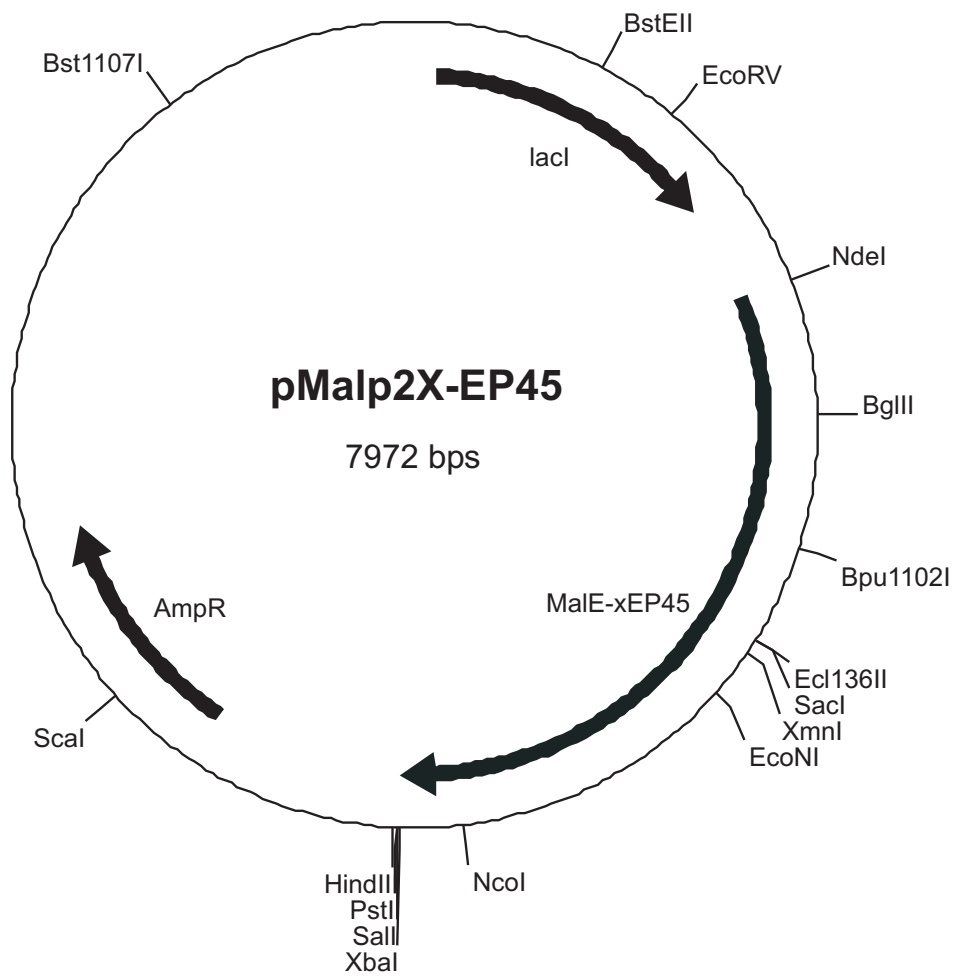
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
Red.	reduziert
RNA	Ribonucleinsäure
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylenethylendiamin
TGF- β	Transforming growth factor- β
Tris	Tris(-hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
ÜNK	Übernachtkultur
β -EtSH	β -Mercaptoethanol

7.2 Vektoren

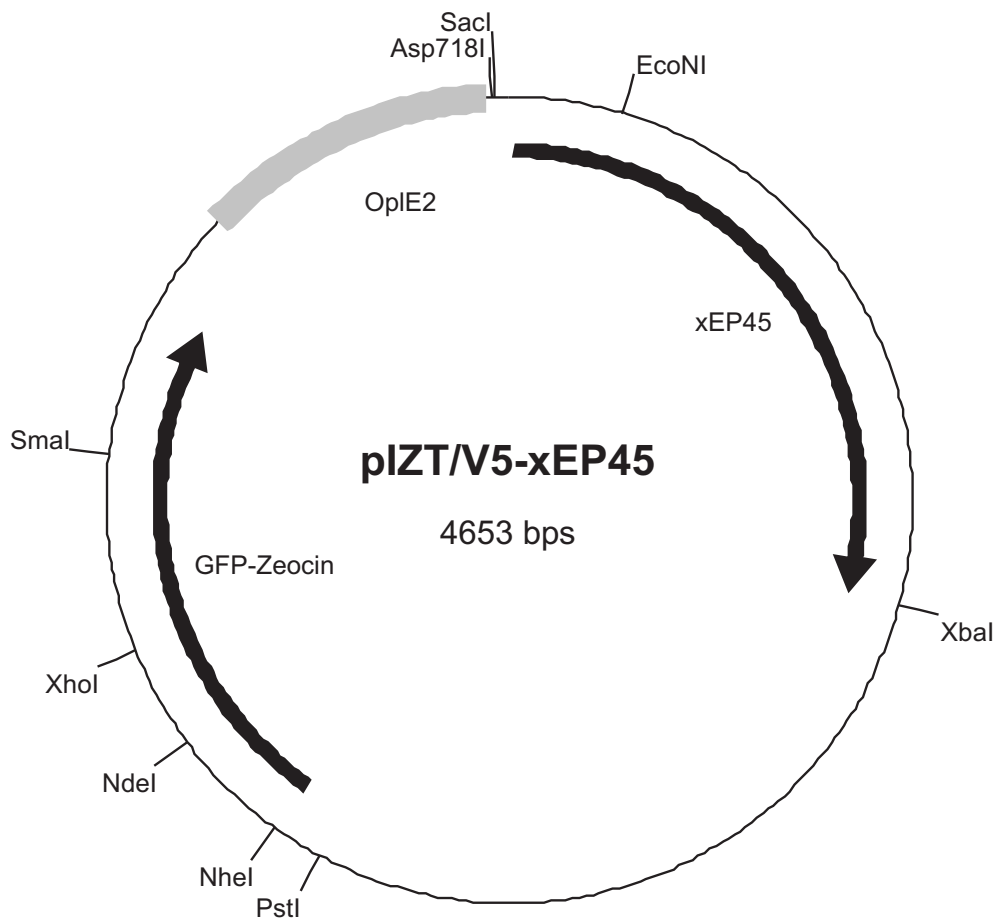
7.2.1 pET25b-xEP45



7.2.2 pMalp2X-EP45



7.2.3 pIZT/V5-xEP45



Danksagung

Prof. Dr. W. Sebald danke ich herzlich für die Überlassung des Themas sowie für die entgegenkommende und wertvolle Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit. Zudem danke ich ihm für die Übernahme des Referates.

Dr. J. Nickel danke ich für die Betreuung meiner Arbeit, seine ständige Hilfsbereitschaft, seine Unterstützung mit wertvollen Ratschlägen sowie seine Geduld.

Dr. M. Dreyer danke ich für die Vermittlung und die Betreuung der praktischen Durchführung meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt **Maike Gottermeier**, die mir stets hilfreich zur Seite stand und mich mit viel Engagement bei der praktischen Durchführung meiner Arbeit unterstützt hat.

Priv.-Doz. Dr. Dr. K. Würzler danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Insgesamt möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Lehrstuhls bedanken, vor allem bei Alexandra Will, Wolfgang Hädelt, Markus Klein, Sascha Keller und Christian Hahn.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Nussel
Vorname: Nikola
Geburtsdatum/-ort: 29.08.1978, Würzburg
Familienstand: ledig

Schulbildung:

09/1984 – 07/1988 Grundschole, Uffenheim
09/1988 – 06/1997 Christian-von-Bomhard-Gymnasium, Uffenheim
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung:

10/97-05/2004 Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg:
Studiengang Humanmedizin
09/1999 Ärztliche Vorprüfung
09/2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr:

05/2003 – 06/2003 Innere Medizin, Allgemeines Regionalkrankenhaus Bozen
(Italien)
06/2003 – 08/2003 Innere Medizin, Missionsärztliche Klinik Würzburg
08/2003 – 12/2003 Chirurgie, Missionsärztliche Klinik Würzburg
12/2003 – 02/2004 Gynäkologie/Geburtshilfe, Kantonales Spital Heiden
(Schweiz)

Ärztin im Praktikum:

08/2004-09/2004 Gynäkologie/Geburtshilfe, Krankenhaus Rothenburg/Tauber

Assistenzärztin:

Seit 10/2004 Gynäkologie/Geburtshilfe, Krankenhaus Rothenburg/Tauber

Würzburg, 31. März 2005

