

**Die Pro-Form des Knochenwachstumsfaktors BMP-2 -
Präklinische Untersuchungen zur Anwendung als
Wirkstoff zur Knochenheilung**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von
Sabrina von Einem
geb. am 25. April 1980 in Schönebeck/Elbe

Gutachter/in

1. Prof. Dr. Elisabeth Schwarz
2. Prof. Dr. Karsten Mäder
3. Prof. Dr. Jay Groppe

Halle/Saale, 03.11.2011
(Tag der Verteidigung)

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	6
1.1	Die Proteinfamilie der <i>bone morphogenetic proteins</i>	6
1.1.1	Strukturelle Besonderheiten	7
1.1.2	BMP-Rezeptoren und Signaltransduktion	9
1.1.3	Biologische Funktionen der <i>bone morphogenetic proteins</i>	12
1.1.4	Regulation der biologischen Funktionen von BMPs	13
1.2	<i>Bone Morphogenetic Protein-2</i>	15
1.2.1	Knochen-spezifische Markerproteine	17
1.2.2	Bedeutung von BMP-2 als therapeutischem Protein	18
1.3	Die Rolle der Pro-Formen und Propeptide	20
1.3.1	Das Propeptid von BMP-2	22
1.4	Ausgangspunkt und Ziele der Arbeit	23
2	MATERIAL UND METHODEN	24
2.1	Material	24
2.1.1	Chemikalien	24
2.1.2	Kits und Testsysteme	25
2.1.3	Standards	25
2.1.4	Enzyme und Proteine	26
2.1.5	Oligonukleotide	26
2.1.6	Plasmide und Vektoren	27
2.1.7	Antikörper	28
2.1.8	Bakterienstämme	28
2.1.9	Zellmasse	28
2.1.10	Säulen und Säulenmaterialien	28
2.1.11	Reagenzien und Materialien für die Zellkultur	29
2.1.12	Zelllinien	29
2.1.13	Sonstige Materialien	30
2.1.14	Geräte	30
2.2	Methoden	32
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	32
2.2.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA	32
2.2.1.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	32
2.2.1.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	32

2.2.1.4	Agarose-Gelelektrophorese	34
2.2.1.5	Gelextraktion von DNA-Fragmenten	34
2.2.1.6	<i>Blunt End</i> -Klonierung von DNA-Fragmenten	35
2.2.1.7	Restriktionsverdau	35
2.2.1.8	Dephosphorylierung geschnittener Vektoren	35
2.2.1.9	Ligation von DNA-Fragmenten	36
2.2.1.10	Isolation von RNA aus mammalischen Zellen	36
2.2.1.11	Reverse Transkription – cDNA-Synthese	36
2.2.1.12	DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)	37
2.2.1.13	Kapillar-Elektrophorese	38
2.2.1.14	<i>Real-time</i> PCR	38
2.2.2	Statistische Auswertung	40
2.2.3	Mikrobiologische Methoden	40
2.2.3.1	Herstellung elektrokompetenter Zellen	40
2.2.3.2	Transformation durch Elektroporation	41
2.2.3.3	Rekombinante Genexpression in <i>Escherichia coli</i>	41
2.2.4	Proteinchemische Methoden	42
2.2.4.1	Zellaufschluss	42
2.2.4.2	Solubilisierung von <i>Inclusion bodies</i> (nach (Rudolph, 1997)	43
2.2.4.3	Renaturierung und Reinigung von BMP-2 und proBMP-2	44
2.2.4.4	Renaturierung und Reinigung von Noggin	45
2.2.4.5	Lyophilisation	47
2.2.4.6	Test auf Endotoxin-Kontamination	47
2.2.4.7	Ellman-Test	48
2.2.4.8	Protein-Alkylierung	49
2.2.4.9	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	49
2.2.4.10	Western Blot	50
2.2.4.11	Aufkonzentrieren von Proteinlösungen	51
2.2.5	Spektroskopische Methoden	51
2.2.5.1	UV-Spektroskopie	51
2.2.6	Zellkultur-Techniken	52
2.2.6.1	Kultivierung mammalischer Zellen	52
2.2.6.2	Passagierung von adhärennten Zellen	53
2.2.6.3	Anlegen und Auftauen von Kryokulturen	53
2.2.6.4	Alkalische Phosphatase (AP)-Assay	54
2.2.6.5	Proliferationstest	55
2.2.6.6	Cytotoxizitätstest	56
2.2.6.7	Apoptose-Assay	57
2.2.6.8	Test auf Internalisierung von proBMP-2 und BMP-2	58

3	ERGEBNISSE	59
3.1	Rekombinante Herstellung von proBMP-2.....	59
3.1.1	Herstellung des Expressionskonstruktes für proBMP-2	59
3.1.2	Heterologe Genexpression und Reinigung von proBMP-2.....	60
3.2	Optimierung der <i>in vitro</i>-Rückfaltung von proBMP-2 und BMP-2.....	61
3.2.1	Optimierung des Faltungspuffers.....	61
3.2.2	Optimierung des Faltungs-Protokolls: Etablierung des Zwei-Stufen-Protokolls für die Rückfaltung	63
3.3	Charakterisierung der AP-Aktivität nach Zugabe von BMP-2 oder proBMP-268	
3.3.1	Die durch BMP-2-Zugabe induzierte AP-Aktivität	68
3.3.2	Stimulation von C2C12-Zellen mit proBMP-2 und isoliertem Propeptid	69
3.3.3	Zeitabhängige Induktion der AP-Aktivität nach Zugabe von BMP-2 und proBMP-2	72
3.4	Stabilität von proBMP-2 und BMP-2 unter Zellkulturbedingungen und Internalisierung in C2C12-Zellen.....	73
3.4.1	Inhibierung der Internalisierung von BMP-2 und proBMP-2	76
3.5	Die Wirkung von proBMP-2 auf die Transkription knochen-spezifischer Markergene	78
3.5.1	Transkription von knochenspezifischen Markergenen in C2C12-Zellen – semi-quantitative Bestimmung	78
3.5.1.1	Die konzentrationsabhängige Induktion mit proBMP-2 oder BMP-2.....	78
3.5.1.2	Die zeitabhängige Stimulation mit proBMP-2 oder BMP-2	80
3.5.2	Transkription von knochenspezifischen Markergenen in C2C12-Zellen – Quantifizierung durch <i>real-time</i> -PCR	82
3.5.2.1	Die konzentrationsabhängige Stimulation mit proBMP-2.....	83
3.5.2.2	Die zeitabhängige Induktion mit proBMP-2.....	84
3.5.2.3	Die konzentrationsabhängige Stimulation mit GDF-5 und proGDF-5.....	87

4	DISKUSSION	90
4.1	Die Optimierung der Rückfaltung von BMP-2 und proBMP-2	90
4.2	Vergleichende Betrachtung der durch proBMP-2 oder BMP-2 induzierten AP-Aktivität	92
4.3	Stabilität von proBMP-2 und BMP-2 unter Zellkulturbedingungen und Internalisierung in C2C12-Zellen.....	94
4.4	Die durch Zugabe von proBMP-2 induzierte Transkription knochenspezifischer Markergene	96
5	ZUSAMMENFASSUNG	99
6	LITERATURVERZEICHNIS	101
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	118
8	ANHANG	120
8.1	Ergänzende Daten und Schlussfolgerungen	120
8.1.1	Inhibierung der BMP-2-induzierten AP-Aktivität durch Noggin	120
8.1.2	Inhibierung der BMP-2-induzierten AP-Aktivität durch Interaktion mit der BMPRII-ECD	121
8.2	Ergänzende Abbildungen und Tabellen	122

1 Einleitung

1.1 Die Proteinfamilie der *bone morphogenetic proteins*

Die Proteinfamilie der *bone morphogenetic proteins* (BMPs) wurde erstmals 1965 von Marshall Urist (1914-2001) an der Los Angeles School of Medicine der Universität Kalifornien (UCLA), beschrieben. Ihm gelang es, aus der Knochenmatrix von Ratten Proteine zu isolieren, die die ektope Neubildung von Knorpel- und Knochengewebe induzierten (Urist, 1965). In den nachfolgenden Jahrzehnten wurden einzelne BMPs isoliert und charakterisiert (Luyten *et al.*, 1989; Wang *et al.*, 1988; Wozney, 1992; Wozney *et al.*, 1988). Durch Klonierung und Sequenzierung der entsprechenden cDNAs konnte schließlich die nahe Verwandtschaft zu Vertretern der *transforming growth factor- β* (TGF- β)-Superfamilie nachgewiesen werden (ten Dijke, 2006).

Die TGF- β -Superfamilie kann in vier untergeordnete Proteinfamilien eingeteilt werden. Die BMPs bilden zusammen mit den Vertretern der *growth and differentiation factors* (GDFs) bzw. der *cartilage-derived morphogenetic proteins* (CDMPs) eine dieser Proteinfamilien. Daneben wurden die Activin/Inhibin-Familie, die TGF- β -Familie und die phylogenetisch weiter entfernte Familie der *glial-derived neurotrophic factors* (GDNFs) beschrieben (Weiskirchen *et al.*, 2009).

Innerhalb der BMP-Familie sind hinsichtlich der Sequenzhomologie und den Ähnlichkeiten in der Funktion der Proteine weitere Unterscheidungen möglich (Reddi, 1998). Diese vier Subfamilien werden in der Regel nach ihrem wichtigsten Vertreter benannt:

- BMP-2-Subfamilie (bestehend aus BMP-2 und BMP-4)
- BMP-3-Subfamilie
- BMP-5-Subfamilie (BMP-5, -6, -7, 8, -8B, -9, -10 und -11)
- BMP-12-Subfamilie (BMP-12 [auch GDF-7, CDMP-3], BMP-13 [auch GDF-6, CDMP-2], BMP-14 [auch GDF-5, CDMP-1] und BMP-15)

Allein BMP-1 wird trotz der Bezeichnung nicht zur TGF- β -Superfamilie gezählt. Es handelt sich hier um eine sezernierte Metalloproteinase aus der Familie der Astacine, die in der extrazellulären Matrix die Funktion einer Pro-Protein-Konvertase übernimmt (Mussano *et al.*, 2007). Durch Proteolyse von BMP-Antagonisten, wie z.B. Chordin, kann BMP-1 unter anderem indirekt die Aktivität von Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie regulieren (Ge und Greenspan, 2006; Jasuja *et al.*, 2007).

1.1.1 Strukturelle Besonderheiten

Besonderheiten aller Mitglieder der TGF- β -Superfamilie sind die Biosynthese als großes Vorläufer- bzw. Pro-Protein, worauf im Abschnitt 1.3 näher eingegangen werden soll, sowie das Strukturmotiv des Cystinknotens. Am Aufbau des Cystinknoten sind sechs konservierte Cysteine beteiligt, die intramolekulare Disulfidbrücken bilden. Zwei Cysteine bilden zusammen mit dem Proteinerückgrat einen aus acht Aminosäureresten bestehenden Ring, durch den die dritte Disulfidbrücke hindurch tritt. Am Aufbau des Cystinknotens sind somit zehn Reste beteiligt (McDonald und Hendrickson, 1993).

Durch Anwesenheit des Cystinknotens gehören die Wachstumsfaktoren der TGF- β -Superfamilie zur übergeordneten Proteinfamilie der Cystinknoten-Proteine, zu der auch die Neurotrophine und *platelet-derived growth factors* (PDGFs), aber auch die pflanzlichen Cyclotide zählen. Trotz geringer Sequenzhomologie zwischen diesen Proteinfamilien ist die strukturelle Ähnlichkeit im Bereich des Cystinknotens bemerkenswert. In jedem Fall wird der Ring durch Disulfidverbrückung von Cys²-Cys⁵ und Cys³-Cys⁶ gebildet, während Cys¹-Cys⁴ das Cystin darstellt, das die Ringstruktur durchdringt. Abbildung 1.1 zeigt schematisch die Lage der Cysteine und die entsprechende Disulfidverbrückung am Beispiel von BMP-2.

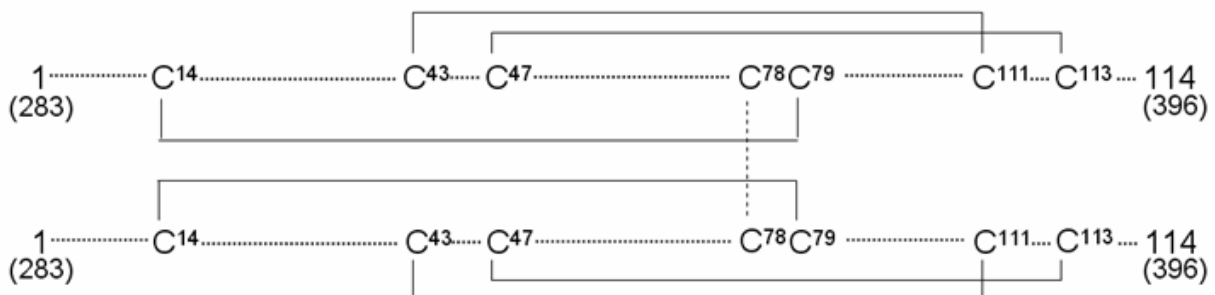


Abbildung 1.1. Schematische Darstellung der Disulfidverbrückung in BMP-2. Zahlen in Klammern kennzeichnen die Lage im Pro-Protein (proBMP-2). Durchgezogene Linien stellen intramolekulare Disulfidbrücken dar, die gestrichelte Linie die intermolekulare Disulfidbrücke zur Stabilisierung des Dimers.

Die Anordnung der Cysteine zum gemeinsamen Strukturmotiv des Cystinknotens bestimmt wahrscheinlich die ähnlichen Eigenschaften und Funktionen der Proteine (Vitt *et al.*, 2001). Alle bekannten Cystinknoten-Proteine, deren Ringe aus acht Aminosäureresten bestehen, sind extrazelluläre Proteine mit ähnlichen Strukturmerkmalen. Die Aminosäuren zwischen Cys¹ und Cys² sowie zwischen Cys⁵ und Cys⁶ bilden β -Stränge aus, während zwischen Cys³ und Cys⁴ eine α -Helix gebildet wird (Griffith *et al.*, 1996; Scheufler *et al.*, 1999).

Die dreidimensionale Anordnung wird als „zweifingrige Hand“ bezeichnet. In Abbildung 1.2 ist der allgemeine Aufbau eines Wachstumsfaktors der TGF- β -Superfamilie schematisch dargestellt.

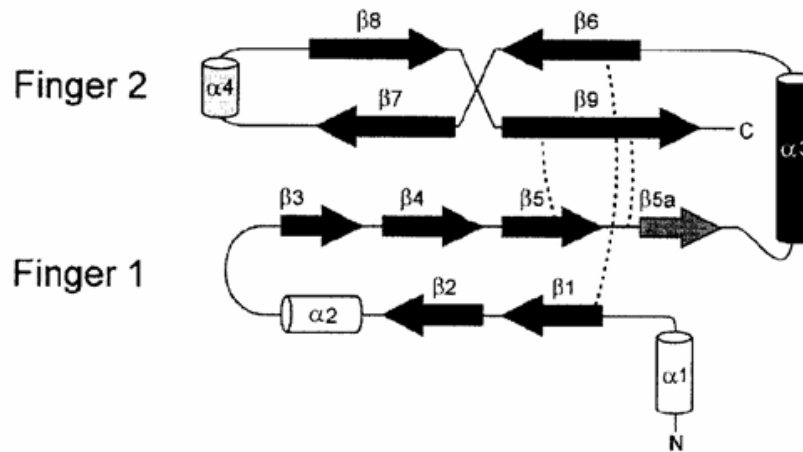


Abbildung 1.2. Allgemeine Anordnung von Sekundärstrukturelementen in Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie. Das Schema basiert auf den Strukturanalysen von BMP-2 und -7, sowie TGF- β 1-3. Pfeile repräsentieren β -Faltblatt-Strukturen, Zylinder α -Helices. Schwarz gekennzeichnete Sekundärstruktur-Motive wurden in allen untersuchten Proteinen gefunden. β -Strang 5a (grau) wurde nur in BMP-2 gefunden. Die Helices α 1, 2 und 4 (weiß) sind typisch für TGF- β 1-3. Intramolekulare Disulfidbrücken sind als gepunktete Linie dargestellt (entnommen aus Rider und Mulloy, 2010).

Neben den Gemeinsamkeiten in ihrer Tertiärstruktur besitzen Cystinknoten-Proteine der TGF- β -Superfamilie außerdem Analogien in ihrer Quartärstruktur. Da durch Ausbildung des Cystinknotens hydrophobe Seitenketten exponiert werden, sind Protein-Protein-Interaktionen zur Maskierung dieser hydrophoben Bereiche notwendig. Homo- oder Hetero-Dimerisierungen wurden für verschiedene Mitglieder aller Familien der TGF- β -Superfamilie beschrieben (Scheufler *et al.*, 1999; Sun und Davies, 1995). Ein zusätzliches Cystein, das nicht an der Ausbildung des Cystinknotens beteiligt ist, bildet eine intermolekulare Disulfidbrücke und verbindet die Monomer-Untereinheiten kovalent miteinander. Dieses Cystein ist N-terminal vom Cys⁴ gelegen und bei allen bekannten Proteinen der TGF- β -Superfamilie, mit Ausnahme von GDF-3, GDF-9 und BMP-15, konserviert (Rider und Mulloy, 2010). Das Dimer stellt die biologisch aktive Einheit dar (Sun und Davies, 1995).

Mitglieder der BMP-Familie unterscheiden sich in ihrer Struktur von anderen TGF- β -Proteinen vermutlich vor allem durch das Fehlen eines C-terminalen variablen Bereiches. Sie besitzen das Stop-Codon an zweiter Position nach dem Cys⁶ des Cystinknotens. Daher ist wahrscheinlich hauptsächlich der variable N-terminale Bereich der Proteine für die unterschiedlichen biologischen Funktionen der verschiedenen Wachstumsfaktoren dieser Proteinfamilie verantwortlich (Sebald *et al.*, 2004).

1.1.2 BMP-Rezeptoren und Signaltransduktion

Die zelluläre Signalwirkung von Proteinen der TGF- β -Superfamilie wird durch Zelloberflächenrezeptoren vermittelt. Nach Bindung ihrer spezifischen Liganden werden intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst, wodurch letztlich Transkriptionsfaktoren und somit die eigentlichen Zielgene beeinflusst werden. (Massagué, 1998)

TGF- β -Rezeptoren sind Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren. Sie können in zwei Gruppen eingeteilt werden: Typ I- und Typ II-Rezeptoren. In Mammalia konnten bislang sieben Typ I- und fünf Typ II-Rezeptoren identifiziert und anhand von Sequenzhomologien klassifiziert werden (Newfeld *et al.*, 1999; Sebald *et al.*, 2004). Sie sind in Abbildung 1.3 zusammengefasst und hinsichtlich ihrer phylogenetischen Verwandtschaft geordnet. Bei dem ersten Rezeptor, der für ein Protein der TGF- β -Superfamilie identifiziert werden konnte, handelte es sich um einen Activin-Rezeptor (Mathews und Vale, 1991). Dementsprechend wurden alle später entdeckten Rezeptoren der gleichen Proteinfamilie zunächst als *activin-like receptor kinases* (Alk) bezeichnet (ten Dijke *et al.*, 1993). Durch Zuordnung der spezifischen Liganden wurden sie nachfolgend dementsprechend umbenannt, z.B. Alk-3 und Alk-6 in BMPR-IA und -IB (Koenig *et al.*, 1994).

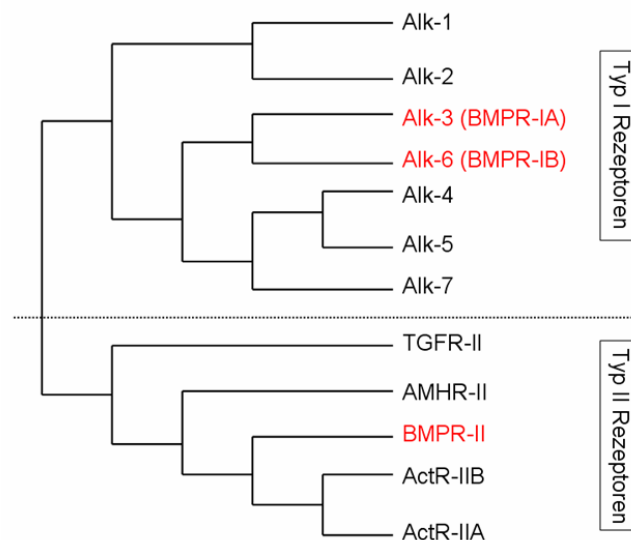


Abbildung 1.3. Rezeptoren der TGF- β -Superfamilie. Phylogenetische Klassifizierung nach Sequenzhomologien. Spezifische Rezeptoren der BMP-Familie sind rot gekennzeichnet (nach Sebald *et al.*, 2004).

Beide Rezeptor-Typen haben einen ähnlichen Aufbau und können in drei Domänen unterteilt werden. Auf eine extrazelluläre Domäne (ECD) von etwa 120-150 Aminosäureresten folgen ein Transmembran-Abschnitt und eine intrazelluläre Domäne mit Serin/Threonin-Kinase-Aktivität (Sebald *et al.*, 2004). Die Struktur der ECD von Typ I-Rezeptoren ist durch zwei

β -Faltblätter und eine kurze α -Helix gekennzeichnet und wird gemäß der ersten aufgeklärten Struktur eines Typ I-Rezeptors als BMPR-IA-Struktur bezeichnet (Kirsch *et al.*, 2000a). Dagegen besteht die ECD von Typ II-Rezeptoren aus drei durch Disulfidbrücken stabilisierten zwei-strängigen β -Faltblättern, die nach der dreifingrigen Toxin-Struktur angeordnet sind (Greenwald *et al.*, 2003; Thompson *et al.*, 2003).

Der Hauptunterschied zwischen beiden Rezeptor-Typen hinsichtlich ihrer intrazellulären Domäne liegt in dem charakteristischen SGS-GS-Motiv. Diese Sequenz, die in der Literatur auch als „GS-Domäne“ bezeichnet wird, kommt nur in Typ I-Rezeptoren vor und spielt eine entscheidende Rolle bei der Signaltransduktion (Yamashita *et al.*, 1996).

Für die Signalwirkung ist eine Heterooligomerisierung von Typ I- und Typ II-Rezeptoren notwendig (Massagué *et al.*, 1994; ten Dijke *et al.*, 1996). Liganden der TGF- β -Familie (TGF- β 1-3) können ihren spezifischen Typ II-Rezeptor auch in Abwesenheit des Typ I-Rezeptors binden, während der umgekehrte Fall nicht möglich ist (Yamashita *et al.*, 1996). Dagegen konnte für Liganden der BMP-Familie eine hoch-affine Bindung zum isolierten Typ I-Rezeptor nachgewiesen werden; die Affinität ist jedoch in Anwesenheit des Typ II-Rezeptors nochmals stark erhöht (Koenig *et al.*, 1994; Nohe *et al.*, 2004; ten Dijke *et al.*, 1994). In jedem Fall bewirkt die Bildung eines ternären Komplexes aus Typ I- und Typ II-Rezeptoren und dem dimeren Liganden die Aktivierung der Kinase-Domäne des Typ II-Rezeptors, wodurch der Typ I-Rezeptor an der regulatorischen „GS-Domäne“ transphosphoryliert wird (Wieser *et al.*, 1995; Wrana *et al.*, 1994).

Die Art der Rezeptor-Oligomerisierung spielt für die intrazelluläre Signalkaskade eine entscheidende Rolle. So werden verschiedene Bindungsmodi mit unterschiedlichen Signalwegen assoziiert. Die Bindung des Liganden an einen bereits bestehenden Komplex aus zwei Typ II- und zwei Typ I-Rezeptoren (*pre-formed complex*, PFC) bewirkt die Aktivierung des Smad-Signalwegs. Dagegen löst die Bindung von BMP an den hoch-affinen Typ I-Rezeptor und nachfolgende Rekrutierung des Typ II-Rezeptors in den Komplex (*BMP-induced signaling complex*, BISC) den p38/MAPK-Signalweg aus (Abbildung 1.4) (Gilboa *et al.*, 2000; Nohe *et al.*, 2002).

Bislang sind nur wenige cytosolische Proteine identifiziert worden, die BMP-Rezeptoren binden können. Dazu gehören zum einen die R-Smads 1, 5 und 8, die für den Smad-Signalweg namensgebend sind, und zum anderen XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) und BRAM1 (*BMP receptor associated molecule 1*), die dem p38/MAPK-Signalweg zugeordnet werden.

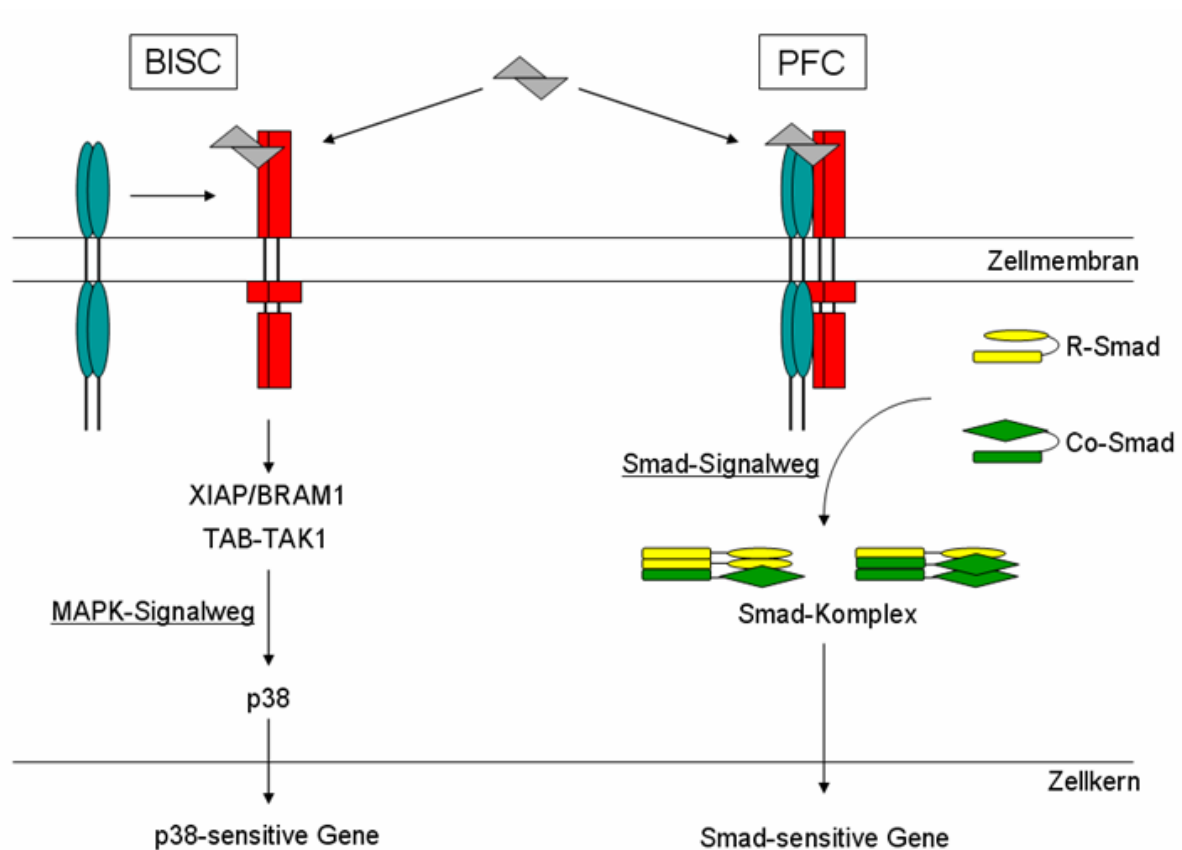


Abbildung 1.4 Schematische Darstellung der Signaltransduktion der BMP-Familie. Typ I-Rezeptoren sind rot, Typ II-Rezeptoren blau und die BMP-Liganden grau dargestellt.

Sowohl XIAP, als auch BRAM1 sind Adapter für die Signalübertragung vom BMPRII auf TAB1 (*TGF- β -activated binding protein*) (Kurozumi *et al.*, 1998; Yamaguchi *et al.*, 1999). Im weiteren Verlauf wird über TAB1 die MAPKKK TAK1 (*TGF- β -activated kinase kinase kinase*) aktiviert, die über Phosphorylierung von p38 und c-JUN die Expression von typischen Knochenmatrix-Proteinen wie der Alkalischen Phosphatase, Osteocalcin oder Osteopontin induziert (Lai und Cheng, 2002).

Die bereits erwähnten Smad-Proteine sind Transkriptionsfaktoren. Ihr Name leitet sich von den ersten beiden entdeckten Vertretern dieser Proteinfamilie ab: MAD (*mothers against decapentaplegic*) aus *Drosophila melanogaster* und Sma (*small body size*) aus *Caenorhabditis elegans*. Die Rezeptor-phosphorylierten R-Smads 1, 5 und 8 assoziieren mit Smad 4, einem Co-Smad. Dieser Smad-Komplex kann im Nucleus selbst als Transkriptionsfaktor wirken oder andere Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise Runx2 regulieren (Chen *et al.*, 2004a).

1.1.3 Biologische Funktionen der *bone morphogenetic proteins*

Die namensgebende Funktion der *bone morphogenetic proteins* ist ihre Fähigkeit *in vivo* die Knochenneubildung zu induzieren und die osteoblastische Differenzierung anzuregen. In Zellkultur kann diese Eigenschaft anhand der Transdifferenzierung myoblastischer Zelllinien, wie der etablierten Maus-Zelllinie C2C12, zu Osteoblasten verfolgt werden: Die Zugabe von BMPs bewirkt die Herab-Regulierung von muskelspezifischen Markerproteinen während knochenspezifische Proteine induziert werden (Groppe *et al.*, 2002; Katagiri *et al.*, 1994). Wenig überraschend ist daher, dass ein *knockout* verschiedener BMPs zu Letalität oder Skelett-Abnormitäten führt. Im Maus-Modell sind homozygote Null-Mutanten für BMP-2 und BMP-4 letal (Winnier *et al.*, 1995; Zhang und Bradley, 1996). Konditionale *knockout*-Mäuse für BMP-2 und BMP-4 zeigten peri- und postnatal schwere Defekte in der Knochenbildung (Cao und Chen, 2005). Nicht alle BMP-Deletionen wirken sich jedoch auf das osteochondrale System aus. Ein *knockout* von BMP-7 führt beispielsweise zu schweren Missbildungen der Augen und Nieren, während die Defekte am Skelett nur geringfügig sind (Dudley *et al.*, 1995; Luo *et al.*, 1995). Bei BMP-3-defizienten Mäusen war sogar eine erhöhte Knochenmasse zu beobachten. Es konnte bewiesen werden, dass BMP-3 *in vivo* ein Antagonist für die BMP-Signalwirkung ist (Daluisi *et al.*, 2001).

Die Beeinflussung des BMP-Signalwegs auf Ebene der Rezeptoren kann ebenso einen veränderten endochondralen Phänotyp hervorrufen. Eine dominant-negative Variante des BMPR-IA führt beispielsweise zu postnataler Osteopenie und verringerter Knochenneubildung durch Inhibierung der osteoblastischen Differenzierung (Zhao *et al.*, 2002). Eine Verstärkung der BMP-Signalwirkung auf Ebene der Rezeptoren wird dagegen mit der Krankheit FOP (*fibrodysplasia ossificans progressiva*) in Verbindung gebracht. Genetische Ursache von FOP ist eine heterozygote *missense* Mutation in der „GS-Domäne“ des BMP-Typ I-Rezeptors Alk-2 (Shore *et al.*, 2006). Diese Mutation führt zu einer verstärkten BMP-Signalwirkung in Anwesenheit von BMP-Liganden. Außerdem kann Alk-2, das diese Mutation aufweist, auch in Abwesenheit von BMP-Liganden die Signaltransduktion induzieren (Shen *et al.*, 2009).

Neben der Stimulierung der Knochenneubildung ist für BMPs auch ein Einfluss auf das Blutgefäßsystem nachgewiesen worden. Es konnte gezeigt werden, dass BMPs in Osteoblasten die Biosynthese angiogener Faktoren, wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und FGF (*fibroblast growth factor*) stimulieren können (Deckers *et al.*, 2002). So werden Endothel-Zellen rekrutiert bzw. aktiviert, die zur Bildung von Blutgefäßen zur Versorgung des neu gebildeten Knochens notwendig sind. Die Rolle der BMPs während der Angiogenese erklärt, warum verschiedene BMP-Deletionen in Mäusen Auffälligkeiten im kardiovaskulären System zeigen (ten Dijke *et al.*, 2003; Valdimarsdottir *et al.*, 2002).

Interessanterweise konnte durch *in vitro*-Versuche gezeigt werden, dass neben den für den Knochenaufbau verantwortlichen Osteoblasten auch die knochen-abbauenden Osteoclasten BMP-Rezeptoren exprimieren. Des Weiteren können BMPs die osteoclastische Differenzierung direkt stimulieren und sind dadurch auch für die Knochen-Homöostase verantwortlich (Hentunen *et al.*, 1995; Itoh *et al.*, 2001; Kaneko *et al.*, 2000).

Neben der Osteogenese spielen BMPs im embryonalen wie im adulten Organismus auch eine wichtige Rolle bei der Bildung und Regeneration von Knorpel. Eine Überexpression von BMPs während der Embryonalentwicklung bewirkt eine vermehrte Bildung von Knorpelgewebe in den Extremitäten (Duprez *et al.*, 1996; Francis-West *et al.*, 1999; Macias *et al.*, 1997). Ebenso wurde nachgewiesen, dass eine Stimulierung mit BMPs die Proliferationsgeschwindigkeit von Chondrocyten in Zellkultur erhöhen kann (De Luca *et al.*, 2001; Minina *et al.*, 2001). Da der BMP-Antagonist Noggin hauptsächlich in Knorpelgewebe exprimiert wird, war eine Untersuchung von Noggin-*knockout*-Mäusen im Zusammenhang mit der BMP-induzierten Chondrogenese von besonderem Interesse. Die Tiere zeigten, wie erwartet, einen erhöhten Anteil an Knorpelgewebe. Ferner konnte keine Ausbildung von Gelenken beobachtet werden (Brunet *et al.*, 1998). Nähere Untersuchungen zum Einfluss der Deletion von Noggin auf verschiedene BMPs in diesen Mäusen bewiesen, dass die Expression von BMP-2, -4 und -6 unverändert war. Dagegen konnte für GDF-5 eine Überexpression nachgewiesen werden. Wurde GDF-5 im Maus-Modell transgen überexprimiert, bildete sich der gleiche Phänotyp aus, der bei Deletion von Noggin beobachtet wurde (Hartmann und Tabin, 2001).

Dieses Beispiel verdeutlicht die individuelle Wirkung einzelner BMPs während verschiedener Stadien der Embryonalentwicklung und in verschiedenen Gewebetypen. Wie bereits für BMP-7 erwähnt, ist die Wirkung nicht auf das osteochondrale System beschränkt. Neben der Entwicklung der Niere (BMP-7) sind BMPs auch an der Regulation des Leber-Glucose-Spiegels (BMP-9), an der Embryonalentwicklung des Herzens (BMP-10) und an der Fertilität (GDF-9 und BMP-15) beteiligt (Chen *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004b; Dudley *et al.*, 1995; Luo *et al.*, 1995; Nicholls *et al.*, 2009).

1.1.4 Regulation der biologischen Funktionen von BMPs

Die Vielfalt der biologischen Funktionen von BMPs bei zahlreichen zellulären Prozessen während der Embryonalentwicklung wie auch im adulten Organismus macht eine stringente Kontrolle der BMP-Aktivität erforderlich. Diese Kontrolle kann auf verschiedenen molekularen Ebenen erfolgen:

- auf Ebene der Rezeptor-Interaktion
- bei der intrazellulären Signaltransduktion
- durch Vernetzung des BMP-Signalwegs mit anderen Signalwegen

Extrazelluläre Antagonisten regulieren BMPs dadurch, dass sie an den Liganden binden und dadurch die Ligand-Rezeptor-Interaktion verhindern. Diese Antagonisten können zwei verschiedenen Proteinfamilien zugeordnet werden. Die FSTLPs (*follistatin-like proteins*) gelten als hoch spezifisch für Mitglieder der TGF- β -Familie und binden diese im femtomolaren Bereich. Mit geringerer Affinität, die jedoch immer noch im nanomolaren Bereich liegt, assoziieren sie auch mit BMPs (Glister *et al.*, 2004; Otsuka *et al.*, 2001). Dem gegenüber stehen die Proteine der CAN-Familie. Der Name leitet sich von Cerberus und Dan (*differential screening-selected gene aberrative in neuroblastoma*) ab. Proteine dieser Familie sind wie die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie Cystinknoten-Proteine (Avsian-Kretchmer und Hsueh, 2004). Zu ihnen zählen u.a. Gremlin, Chordin und Noggin (Rider und Mulloy, 2010).

Zusätzlich dazu wurden auch membrangebundene BMP-Antagonisten nachgewiesen. BAMBI (*BMP and Activin membrane bound inhibitor*) ist ein Transmembran-Protein, das mit BMP-Rezeptoren interagieren und dadurch die BMP-Signalwirkung reduzieren kann (Onichtchouk *et al.*, 1999). Aber auch eine Signalverstärkung ist möglich. Eine solche Wirkung wurde beispielsweise für den BMP-Co-Rezeptor Dragon, der über einen Glycosylphosphatidyl-Inositol-Anker (GPI-Anker) ebenfalls membrangebunden ist, für BMP-2 und BMP-4 nachgewiesen (Samad *et al.*, 2005).

Intrazellulär können BMP-Signale über inhibitorische Smad-Proteine (Smad 6 und 7) reguliert werden. I-Smads können zum einen die Phosphorylierung und damit Aktivierung der R-Smads verhindern, indem sie mit ihnen um die Bindung an den phosphorylierten Typ I-Rezeptor konkurrieren (Imamura *et al.*, 1997; Nakao *et al.*, 1997). Zum anderen konnte für Smad 6 gezeigt werden, dass es an Smad 1 bindet und dadurch die Bildung des Smad-Komplexes mit Smad 4 verhindert (Hata *et al.*, 1998). Bei der Regulation des Smad-Signalwegs spielt außerdem der ubiquitin-abhängige Proteinabbau eine wichtige Rolle. Smurf-1 (*Smad ubiquitin regulatory factor 1*) induziert die Ubiquitylierung und somit den Abbau von Smad 1 und 5 (Zhang *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 1999). Über Smad 6 und 7 kann Smurf-1 auch den BMP Typ I-Rezeptor binden und dessen Abbau induzieren (Murakami *et al.*, 2003).

Eine weitere Möglichkeit der BMP-Regulation stellt die Vernetzung mit anderen Signalwegen dar. Eine solche intrazelluläre BMP-Signal-Vernetzung wurde bereits für den Wnt- und für den MAPK-Signalweg nachgewiesen (Derynck und Zhang, 2003; Herpin und Cunningham, 2007; von Bubnoff und Cho, 2001).

Die Wirkung der BMPs kann somit über ein komplexes Netzwerk an Faktoren und Einflüssen reguliert und beeinflusst werden. Dadurch wird ein zeit- und zelltyp-spezifischer Prozess erzielt.

1.2 Bone Morphogenetic Protein-2

Wie alle TGF- β -Wachstumsfaktoren wird auch BMP-2 als Prä-Pro-Protein synthetisiert. Auf die 19 Aminosäure-Reste lange Prä-Sequenz, die für die Translokation ins Endoplasmatische Retikulum verantwortlich ist, folgt eine Pro-Domäne mit 263 Aminosäure-Resten. Sowohl die Struktur als auch die Funktion dieser Pro-Domäne sind noch weitgehend unbekannt. Sie ist durch eine Konsensus-Sequenz für *furin-like prohormon-convertases* (FPC) vom C-terminalen, 114 Aminosäure-Reste umfassenden reifen Teil getrennt (Abbildung 1.5). Die Länge der Prä-Sequenz in präproBMP-2 ist bisher allerdings noch nicht experimentell belegt. In einer früheren Arbeit der Arbeitsgruppe wurde bei der Ermittlung einer potentiellen Erkennungssequenz für Signalpeptidasen mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Spaltstelle zwischen Gly¹⁹ und Gly²⁰ bestimmt (Hillger, 2005). Es soll an dieser Stelle allerdings erwähnt werden, dass in Angaben der Protein-Datenbank der *Universal Protein Resource* (UniProt) die Prä-Sequenz nach Gly²³ endet.

```

      10      20      30      40      50      60
MVAGTRCLLA LLLPQVLLGG AAGLVPELGR RKEFAAASSGR PSSQPSDEVL SEFELRLLSM
      70      80      90     100     110     120
FGLKQRPTPS RDAVVPPYML DLYRRHSGQP GSPAPDHRLE RAASRANTVR SFHHEESLEE
      130     140     150     160     170     180
LPETSGKTTR RFFFNLSSIP TEEFITS AEL QVFREQM QDA LGNNSFFHHR INIYEIIPKA
      190     200     210     220     230     240
TANSKFPVTR LLDTRLVNQN ASRWESFDVT PAVMRWTAQG HANHGFEVVEV AHLEEKQGV S
      250     260     270     280     290     300
KRHVRI SRSL HQDEHSWSQI RPLLVTFGHD GKGHPLHKRE KRQAKHKQRK RLKSSCKRHP
      310     320     330     340     350     360
LYVDFSDVGM NDWIVAPPGY HAFYCHGCEP FPLADHLNST NHAIVQTLVN SVNSKI PKAC
      370     380     390
CVPTELSAIS MLYLDENEKV VLKNYQDMVV EGCGCR

```

Abbildung 1.5. Aminosäuresequenz von humanem präproBMP-2. Die Prä-Sequenz ist blau, das Pro-Peptid grau und der reife Teil gelb hinterlegt. Cysteine sind rot hervorgehoben. Der unterstrichene Bereich kennzeichnet die Prozessierungsstelle für Pro-Protein-Konvertasen.

BMP-2 gehört zu den am besten charakterisierten BMPs. Die Strukturaufklärung von BMP-2 mittels Röntgen-Kristallographie gelang bereits 1999 (Scheufler *et al.*, 1999) bzw. ein Jahr später im Komplex mit der ECD seines Hauptrezeptors BMPRII (Kirsch *et al.*, 2000b). So konnten nicht nur die Epitope identifiziert werden, die für die Rezeptorbindung verantwortlich

sind, sondern auch nachgewiesen werden, dass bei der Rezeptorbindung jede ECD des Rezeptor-Dimers mit beiden Monomer-Untereinheiten des BMP-2-Dimers interagiert (Kirsch *et al.*, 2000b; Nickel *et al.*, 2001) (Abbildung 1.6).

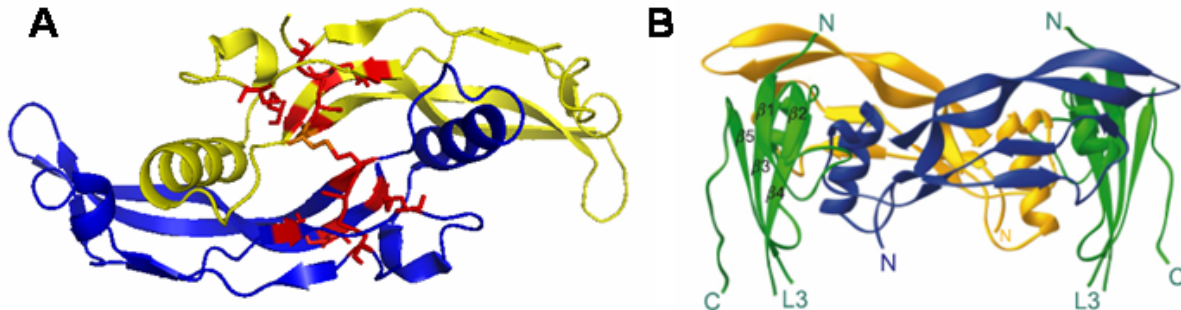


Abbildung 1.6. Kristallstruktur des isolierten BMP-2 (A) und von BMP-2 im Komplex mit der BMPR-IA-ECD (B). Die BMP-2-Monomere sind jeweils in gelb und blau dargestellt, die Cystinknoten in rot und die ECD des Rezeptors in grün (Kirsch *et al.*, 2000b; Scheufler *et al.*, 1999).

Eine strukturelle Besonderheit, die BMP-2 bisher nur mit BMP-4 und BMP-7 teilt, ist die Heparin-Bindestelle am N-Terminus des Proteins. Heparine sind Glucosaminoglycane, die einen wichtigen Bestandteil der extrazellulären Matrix darstellen. In Zellkultur mit Maus-Myoblasten konnten Heparin und andere Polysaccharide mit Sulfatgruppen, wie Heparansulfat oder Dextransulfat, die biologische Aktivität von BMP-2 erhöhen. Dabei war die Effektivität dieser Stimulation abhängig von der Größe des Polysaccharids und der Anzahl der im Molekül enthaltenen Sulfat-Reste (Takada *et al.*, 2003). Dieser Effekt konnte auf eine Erhöhung der Stabilität des BMP-2 zurückgeführt werden. In Zellkultur mit C2C12-Zellen war in Anwesenheit von Heparin die Halbwertszeit von BMP-2 im Kulturmedium 20-fach erhöht (Zhao *et al.*, 2006). Die stabilisierende Wirkung lässt sich zudem auch *in vivo* nachvollziehen. Eine Erhöhung der Affinität des Proteins zu Heparin durch Modifikation der N-terminalen Heparin-Bindedomäne führt zu einer deutlich besseren Knochenbildung, wie an der Heilung von kritischen Defekten in Ratten bewiesen wurde. Diese Verstärkung der biologischen Aktivität wird auch hier durch die längere Verweildauer am Implantationsort und die damit verlängerte Halbwertszeit im Gewebe erklärt (Depprich *et al.*, 2005). Eine erhöhte Affinität zwischen Ligand und Rezeptor, wie für den verwandten *fibroblast growth factor* (FGF) in Anwesenheit von Heparin gefunden wurde (Olwin *et al.*, 1991; Yayon *et al.*, 1991), konnte für BMP-2 nicht nachgewiesen werden. Stattdessen war Heparin sogar in der Lage, die Menge an BMP-2/Rezeptor-Komplex zu verringern (Takada *et al.*, 2003).

Weitere Studien zur Funktion von BMP-2 durch *knockout*, vor allem während der Embryonalentwicklung, gestalteten sich aufgrund der essentiellen Funktionen des Wachstumsfaktors als schwierig. Der systemische Verlust von BMP-2 führte zu embryonaler

Letalität (Zhang und Bradley, 1996). Dies konnte durch induzierbare und orts-spezifische Ausschaltung des *bmp-2*-Gens umgangen werden (Rosen, 2009; Tsuji *et al.*, 2006). Hier zeigten sich eine signifikante Verzögerung bei der sekundären Ossifikation und progressive Mikrofrakturen ohne Hinweis auf eine autonome Heilung. Beides beweist die essentielle Rolle von BMP-2 bei der Aufrechterhaltung der Knochenintegrität und bei der Regeneration von Knochengewebe.

In einer Studie, die 14 humane BMPs (BMP-2 bis -15) bezüglich der osteogenen Aktivität vergleicht, zeigte BMP-2 das höchste Potential zur Induktion der osteoblastischen Differenzierung (Cheng *et al.*, 2003), wodurch BMP-2 ein großes Interesse beim klinischen Einsatz und in der Gewebstherapie zukommt. Die Wirkung von BMP-2 lässt sich am Besten über sogenannte Knochenmarker überwachen. Auf solche knochen-spezifischen Markerproteine soll im folgenden Abschnitt kurz eingegangen werden.

1.2.1 Knochen-spezifische Markerproteine

Die osteogene Aktivität von BMP-2 ist intrazellulär auf die Transkription von Genen zurückzuführen, die direkt oder indirekt unter der Kontrolle der Signalwirkung des Wachstumsfaktors stehen. Ein Nachweis der Transkription oder Expression dieser Knochenmarker gilt als Nachweis der osteogenen Aktivität von BMPs bzw. der osteoblastischen Differenzierung (Huang *et al.*, 2010; Kato *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2011).

- Einer der bekanntesten Knochenmarker ist die Alkalische Phosphatase (AP). Im Menschen sind insgesamt 15 Isoenzyme identifiziert worden, die zum Teil verschiedenen Geweben oder Organen zugeordnet werden können. In der Labordiagnostik des Blutserums wird die Gesamtheit aller AP-Isoformen bestimmt, allerdings werden erhöhte oder erniedrigte Werte in den meisten Fällen mit Krankheiten der Leber oder des Skelettsystems assoziiert. Die von Osteoblasten gebildete knochen-spezifische AP wird auch Ostase genannt. Darüber hinaus ist aber auch die gewebe-unspezifische AP für Knochenaufbau und -regeneration essentiell. Eine Funktionsverlust-Mutation im entsprechenden Gen führt zur Knochenerkrankung Hypophosphatasie (Mornet, 2008)
- Osteocalcin (auch BGP, *bone γ -carboxylglutamic acid-containing protein*) ist ein Vitamin K-abhängiges Peptidhormon von 49 Aminosäureresten Länge, das überwiegend in Osteoblasten und Odontoblasten gebildet wird. Als Teil der extrazellulären, nicht-kollagenen Knochenmatrix ist es ein Marker des Knochenaufbaus und der Knochenneubildung (Harada und Rodan, 2003). Darüber hinaus ist Osteocalcin durch seine endokrine Wirkung auch an der Regulation des

Glucose- und Fettstoffwechsels beteiligt (Lee *et al.*, 2007). Eine Funktion bei der Regulation der Fertilität im männlichen Organismus wird vermutet (Oury *et al.*, 2011).

- Osterix (auch Sp7, *bone sialoprotein 7*) ist ein Transkriptionsfaktor der SP-Genfamilie und fungiert als Regulator der osteogenen Differenzierung (Gao *et al.*, 2004; Nakashima *et al.*, 2002). Die Transkription von *osterix* ist auf embryonale Zellen im osteoblastischen Differenzierungsweg beschränkt und kann in adulten Geweben nicht nachgewiesen werden (Gao *et al.*, 2004).
- Der Transkriptionsfaktor Runx2 (*runx-related transcription factor 2*, auch Cbfa1 – *core binding factor α1*) wurde als ein *upstream*-Regulator von Osterix identifiziert und ist damit für die osteoblastische Differenzierung und Skelett-Morphogenese essentiell (Nakashima *et al.*, 2002). Mutationen im *runx2/cbfa1*-Gen werden mit der Knochenerkrankung Cleidocraniale Dysplasie in Verbindung gebracht.

1.2.2 Bedeutung von BMP-2 als therapeutischem Protein

Präklinische Studien für die Verwendung von rekombinantem humanen BMP-2 in der Heilung von Knochenfrakturen und für Wirbelfusionen wurden erstmals 1995 durchgeführt. Auf Basis von Daten mit verschiedenen Spezies war zu erkennen, dass mit höherer phylogentischer Ordnung der Tiere auch größere BMP-2-Mengen benötigt wurden, um eine vergleichbare Induktion der Knochenneubildung zu erzielen (Martin *et al.*, 1999; Sandhu *et al.*, 1995; Sandhu *et al.*, 1996). Diese Beobachtung ist zumindest teilweise auf langsamere Heilungsgeschwindigkeit in höheren Spezies zurückzuführen (Geiger *et al.*, 2003) und machte die Entwicklung eines Trägersystems für die längerfristige Freisetzung des Wachstumsfaktors am Wirkort notwendig (Seeherman *et al.*, 2002; Valentin-Opran *et al.*, 2002). Das erste dieser Trägersysteme basierte auf einem adsorbierbaren porösen Collagen-Material (*adsorbable collagen sponge*, ACS). Die Entwicklung anderer Trägermaterialien steht im Focus der Forschung. Aufgrund ihrer strukturellen Basis lassen sie sich in vier verschiedene Gruppen einteilen (Tabelle 1.1).

Für den klinischen Einsatz im Menschen ist BMP-2 (neben BMP-7) eines von nur zwei BMPs, das von der *American Food and Drug Association* (FDA) zugelassen ist. Es wird seit 2002 unter den Markennamen InductOs[®] (Pfizer AG, früher Wyeth Pharmaceuticals) bzw. Infuse Bone Graft[®] (Medtronic Sofamor Danek) vertrieben und wurde zunächst nur für Wirbelfusionen eingesetzt. Später kamen die Behandlung von Schienbeinfrakturen (2004) und der Einsatz in der Gesichts- und Kieferchirurgie (2007) hinzu.

Tabelle 1.1. Trägermaterialien für BMPs (nach Li und Wozney, 2001)

<u>Basis der Träger</u>	<u>Vorteile</u>	<u>Nachteile</u>	<u>Beispiele</u>
Anorganische Materialien	knochenähnliche Struktur, natürliche Affinität zu BMPs	spröde (schwer zu bearbeiten)	HA, β -TCP Ca-Phosphatide
Synthetische Polymere	gut reproduzierbare Herstellung, einfache Sterilisation	nicht-physiologisch, Zwischenprodukte können Entzündungen auslösen	PEG PLA PLGA
Natürliche Polymere	hohe Biokompatibilität, teilweise natürliche Affinität zu BMPs	Übertragung von Pathogenen (schwer zu sterilisieren)	Collagen Chitosan Fibrin
Komposit-Materialien	Vorteile verschiedener Materialien kombiniert	komplexer Herstellungsprozess	Collagen-TCP Collagen-HA

(HA – Hydroxyapatit; β -TCP – β -Tricalciumphosphat; PEG – Polyethylenglycol; PLA – *polylactic acid*; PLGA – *polylactic-co-glycolic acid*)

Weitere Anwendungsgebiete, wie die Korrektur angeborener Schädeldefektbildungen in der craniofacialen Chirurgie oder die Behandlung von Knorpeldefekten, werden diskutiert (Jones *et al.*, 2006; Sellers *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2008). Der Einsatz in der Zahnmedizin bei der Verankerung von Zahnimplantaten befindet sich bereits im Stadium der klinischen Studien (Wikesjö *et al.*, 2007). Neben diesen Anwendungsbereichen, die eine lokale Wirkung von BMP-2 erfordern, wäre auch eine systemische Applikation, z.B. zur Behandlung von Osteoporose, denkbar.

Ein Problem bei der therapeutischen Anwendung ist das Auftreten von teils schwerwiegenden Nebenwirkungen, die im Zusammenhang mit dem Einsatz von BMP-2 beschrieben wurden. Komplikationen wie Hämatome, lokale Ödeme, Schwellungen und sogar Knochenabbau werden auf eine lokale Überdosierung des Wachstumsfaktors zurückgeführt (Benglis *et al.*, 2008; Shields *et al.*, 2006). Tatsächlich entspricht die Dosis von 2-30 mg, die in der Behandlung am Menschen zum Einsatz kommt, in etwa der doppelten Menge an BMP-2, die im gesamten menschlichen Skelett zu finden ist (Bishop und Einhorn, 2007). Daher konzentrieren sich viele aktuelle Forschungsprojekte auf eine Optimierung der Trägermaterialien, um eine Minimierung der applizierten Dosis durch kontrollierte Freisetzung des BMP-2 zu erreichen (Jha *et al.*, 2009; Lochmann *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009). Aber auch der Einsatz einer Retard-Form könnte eine Verbesserung darstellen.

1.3 Die Rolle der Pro-Formen und Propeptide

BMP-2 wird wie alle Wachstumsfaktoren der TGF- β -Superfamilie als Prä-Pro-Protein synthetisiert, wobei die Prä-Sequenz, wie bereits erwähnt, die Sekretion der Proteine bewirkt. Die Expression als Pro-Protein ist für viele Proteine bzw. Protein-Familien bekannt, wobei die Propeptide vielfältige Funktionen ausüben können, z.B. als Regulator der Aktivität oder als Faltungshelfer. Dieses Kapitel beschäftigt sich mit der Rolle der Pro-Proteine bzw. Propeptide, wobei Pro-Protein die unprozessierte Pro-Form und Propeptid die vom reifen Teil isolierte Pro-Domäne bezeichnet.

Eine der bekanntesten Protein-Familien, bei denen das Propeptid die Aktivität des reifen Proteins reguliert, sind die Zymogene, auch Proenzyme genannt, zu denen die Verdauungsenzyme Trypsin und Pepsin gehören. Die Vorläuferproteine sind inaktiv und werden durch eine Enterokinase (im Fall von Trypsinogen) oder im sauren Milieu durch Autokatalyse (im Fall von Pepsinogen) prozessiert. Die Propeptide haben oft eine Länge von weniger als zehn Aminosäuren.

Ein weiteres Protein, das als Proprotein synthetisiert wird, ist das Insulin. Reifes Insulin besteht aus zwei Peptidketten (A- und B-Kette), die über zwei Disulfidbrücken stabilisiert sind. Bei der Biosynthese sind beide Ketten über das Propeptid (C-Peptid) miteinander verbunden, das während der Faltung A- und B-Kette in räumlicher Nähe hält und nach korrekter Disulfid-Verbrückung prozessiert wird (Clark und Steiner, 1968). Studien zur Funktion des Propeptids von Insulin zeigten, dass es in der Lage ist, verschiedene Signalwege, darunter auch den TGF- β -Signalweg, zu beeinflussen und daher wahrscheinlich eine eigene biologische Funktion besitzt (Hills *et al.*, 2009; Hills und Brunskill, 2009).

Die Funktion als Faltungshelfer ist auch für andere Propeptide belegt. Propeptide als intramolekulare Chaperone zeichnen sich im Vergleich zu „echten“ Chaperonen jedoch dadurch aus, dass sie eine hohe Substratspezifität zu ihrem jeweiligen reifen Teil aufweisen (Ikemura *et al.*, 1987). Bei Subtilisin, das als Modellprotein für zahlreiche andere sezernierte Proteasen dient, kommt dem N-terminalen Propeptid eine zentrale Rolle bei der Faltung zu und es wird erst abgespalten, wenn die propeptid-vermittelte Faltung abgeschlossen ist (Falzon *et al.*, 2007; Subbian *et al.*, 2005). Für die intrazelluläre Protease Caspase-3, die eine wesentliche Rolle bei der Apoptose spielt, konnte gezeigt werden, dass sowohl Faltung als auch Rückfaltung nach pH-induzierter Inaktivierung nur in Anwesenheit der Prodomäne zu vollständiger Aktivität führt (Feeney und Clark, 2005). Für die Propeptide von Neurotrophinen, die wie BMPs zu den Cystinknoten-Proteinen gehören, ist ebenfalls die Wirkung als intramolekulares Chaperone belegt. Die reife Domäne des *nerve growth factor* (NGF) faltet *in vitro* wesentlich langsamer und mit geringerer Ausbeute als das Proprotein (Rattenholl *et al.*, 2001a; Rattenholl *et al.*, 2001b). Zusätzlich ist für proNGF eine andere biologische Aktivität als für NGF nachgewiesen. Während die Pro-Form in der Lage ist

Apoptose auszulösen, vermittelt die reife Form das Überleben von Nervenzellen (Ibanez, 2002; Nykjaer *et al.*, 2004).

Im Vergleich zu anderen Propeptiden ist eine Besonderheit der Propeptide der TGF- β -Superfamilie, dass sie die Größe des reifen Proteins um das Zwei- bis Dreifache übersteigen. Bei BMP-2 beispielsweise steht der reifen Domäne von 114 Aminosäuren ein Propeptid von 263 Aminosäuren gegenüber (Abbildung 1.5). Für die Propeptide der einzelnen Vertreter der TGF- β -Superfamilie sind verschiedene Funktionen nachgewiesen worden. Das am besten charakterisierte Propeptid ist das von TGF- β 1. Als Teil des Vorläuferproteins beeinflusst das Propeptid die Faltung des Proteins. Einem Modell zufolge binden hydrophobe Reste am N-Terminus den reifen Teil und erleichtern so die korrekte Faltung (Walton *et al.*, 2009). Die intermolekulare Disulfid-Verbrückung während der Dimerisierung erfolgt sowohl im Bereich des Propeptids als auch in der maturen Domäne und bildet so den *small latency complex* (SLC) (Brunner *et al.*, 1989; Miyazono *et al.*, 1988). Der SLC kann durch Prohormon-Konvertasen gespalten werden. Das Propeptid bleibt nach der Spaltung als *latency associated peptide* (LAP) nicht-kovalent mit dem reifen TGF- β 1-Dimer assoziiert (Dubois *et al.*, 1995; Gentry und Nash, 1990). In dieser inaktiven Form wird der Wachstumsfaktor schließlich sekretiert. Die von LAP vermittelte Latenz von TGF- β 1 beruht auf der Maskierung des Epitops, das die Bindung an den Typ II-Rezeptor vermittelt. Außerdem erhöht LAP die Stabilität und Halbwertszeit von TGF- β 1 *in vivo* (Bottinger *et al.*, 1996; De Crescenzo *et al.*, 2001; Wakefield *et al.*, 1988). Bisher ist von allen bekannten Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie nur für TGF- β 1-3, Myostatin und GDF-11 nachgewiesen worden, dass das jeweilige Propeptid den reifen Teil mit ausreichend hoher Affinität bindet, um eine Latenz vermitteln zu können (Bottinger *et al.*, 1996; Ge *et al.*, 2005; Hill *et al.*, 2002; Lee und McPherron, 2001; Thies *et al.*, 2001). Bei einigen anderen bisher untersuchten Activine und BMPs ist die Affinität zu den spezifischen Rezeptoren größer als die zu den jeweiligen Propeptiden (Sengle *et al.*, 2008; Walton *et al.*, 2009). Eine Latenzfunktion ist dadurch allerdings nicht ausgeschlossen.

Dennoch kann bei vielen BMPs eine Interaktion zwischen Propeptid und reifem Dimer nachgewiesen werden (Gregory *et al.*, 2005; Hauburger *et al.*, 2009; Sopory *et al.*, 2006). Für BMP-7 konnte außerdem gezeigt werden, dass es an das LTBP (*latent TGF- β binding protein*) Fibrillin-1 binden kann und dadurch eine Positionierung und Konzentrierung des Wachstumsfaktors an den Fibrillin-Mikrofibrillen der extrazellulären Matrix erreicht wird. Ein Zusammenhang zur Funktion von LTBPs bei TGF- β 1 wird vermutet, allerdings war der Komplex *in vitro* nicht latent, sondern zeigte eine ähnliche Aktivität wie reifes BMP-7 (Gregory *et al.*, 2005). Für BMP-9 wurden ähnliche Ergebnisse erhalten. BMP-9 wird nach Prozessierung mit dem Propeptid sezerniert, allerdings wird die Rezeptor-Bindung dadurch

nicht beeinflusst. Zudem zeigt der Propeptid-BMP-9-Komplex wie bei BMP-7 eine dem reifen BMP-9 vergleichbare biologische Aktivität (Brown *et al.*, 2005).

Eine Besonderheit des Propeptids von BMP-4 stellt die zweite, N-terminal gelegene und ebenfalls hoch-konservierte Spaltstelle für Prohormon-Konvertasen dar. Nach der Prozessierung an der ersten Spaltstelle bleibt das Propeptid mit dem reifen Teil assoziiert und erst die Spaltung an der zweiten Konsensus-Sequenz führt zur Dissoziation des Komplexes und zur Sekretion des reifen BMP-4-Dimers. Anderenfalls erfolgt der lysosomale Abbau des Komplexes (Cui *et al.*, 1998). Aufgrund der hohen Sequenzidentität von 73% zwischen BMP-2 und BMP-4 wäre eine ähnliche Funktion auch für das Propeptid von BMP-2 denkbar. Im Folgenden soll dargelegt werden, was über das Propeptid von BMP-2 bzw. die unprozessierte Pro-Form proBMP-2 bekannt ist.

1.3.1 Das Propeptid von BMP-2

In ersten Arbeiten zur biophysikalischen und funktionalen Charakterisierung von proBMP-2 konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu dem Neurotrophin, NGF, die Pro-Domäne von BMP-2 für die Faltung nicht essentiell ist (Hillger *et al.*, 2005; Rattenholl *et al.*, 2001a; Rattenholl *et al.*, 2001b). Allerdings wird bei BMP-2, wie bei NGF das Propeptid in Anwesenheit der reifen Domäne stabilisiert (Hillger *et al.*, 2005; Kliemann *et al.*, 2006). Untersuchungen zur biologischen Funktion von proBMP-2 erfolgten im Tiermodell mit Ratten. Den Tieren wurden Träger mit proBMP-2 abdominal subkutan implantiert und nach 30 Tagen die Träger und das umliegende Gewebe untersucht. ProBMP-2 induzierte nachweislich die ektope Knochenneubildung (Hillger *et al.*, 2005). Diese Aktivität von proBMP-2 nach Implantation ist vermutlich auf den Abbau des Propeptids durch extrazelluläre Proteasen bzw. auf die Prozessierung von proBMP-2 durch extrazelluläres Furin zurückzuführen. Der Abbau von BMP-Propeptiden durch extrazelluläre Proteasen wurde bereits beschrieben (Beck *et al.*, 2002). Pharmaco-kinetische Untersuchungen und eine kinetische Auswertung der Knochenbildung fehlen jedoch, so dass hierzu keine konkreten Aussagen möglich sind. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass proBMP-2 mit vergleichbarer Affinität wie BMP-2 an die extrazelluläre Domäne des BMP-Rezeptors IA binden kann. Die Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand konnte durch *cross-linking*-Experimente in Zellkultur belegt werden. ProBMP-2 war außerdem in der Lage intrazellulär den Smad-Signalweg, nicht aber den p38-Signalweg zu induzieren (Hauburger *et al.*, 2009). Da das Knochenmarker-Enzym Alkalische Phosphatase überwiegend über den p38-Signalweg induziert wird, stimmte dieses Ergebnis mit der Beobachtung überein, dass proBMP-2 nicht in der Lage war die AP in Zellkultur mit C2C12-Zellen zu induzieren. Die Induktion der Smad-Phosphorylierung deutete jedoch auf eine spezifische biologische Funktion von proBMP-2 hin.

1.4 Ausgangspunkt und Ziele der Arbeit

Aus vorangegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe war bekannt, dass proBMP-2 im Tiermodell die ektopische Knochenneubildung induziert, in Zellkultur jedoch keine osteogene Aktivität hervorruft (Hillger *et al.*, 2005; Krause, 2003). Daher wurde vermutet, dass es sich bei proBMP-2 um eine Retard-Form handelt, die für therapeutische Anwendungen interessant sein könnte (Rudolph *et al.*, 2008). Aufgrund der angesprochenen Probleme bei der klinischen Applikation von BMP-2 bietet der Einsatz von proBMP-2 möglicherweise erhebliche Verbesserungen gegenüber der Verabreichung des reifen Wachstumsfaktors. Daher sollten im Rahmen dieser Arbeit die Voraussetzungen für den möglichen Einsatz von proBMP-2 als therapeutischem Wirkstoff geschaffen werden.

1. Die rekombinante Expression des Proteins war bisher nur als Variante mit N-terminalem His₆-tag gelungen. Für klinische Anwendungen ist jedoch eine tag-freie Variante des Proteins besser geeignet. Dazu sollte zunächst ein Expressionskonstrukt zur rekombinanten Produktion des authentischen Proteins erstellt werden.
2. In einem zweiten Arbeitsschritt sollte dann das Faltungsprotokoll hinsichtlich Zeit und Ausbeute an nativer Spezies optimiert werden. Zunächst sollten zu diesem Zweck verschiedene, für Wachstumsfaktoren der BMP-Familie etablierte Renaturierungspuffer auf ihre Anwendbarkeit für die *in vitro*-Rückfaltung von proBMP-2 getestet werden.
3. Ein wichtiger Punkt war die Charakterisierung der biologischen Aktivität von proBMP-2 im Vergleich zum reifen Wachstumsfaktor. Hierfür sollte ein etablierter Zellkultur-Assays zur Anwendung kommen: die Bestimmung der Induktion der Alkalischen Phosphatase (AP) in Myoblasten als Marker der Transdifferenzierung zu Osteoblasten. Untersuchungen, welchen Effekt proBMP-2 auf die Zelllinie hat und inwiefern sich die biologische Aktivität von BMP-2 durch proBMP-2 modulieren lässt, stellten das zentrale Thema des Teilprojektes dar.
4. Durch Bestimmung der Stabilität von proBMP-2 unter Zellkulturbedingungen sollte der oben beschriebene Widerspruch zwischen Tierversuch und Zellkultur-Modell aufgeklärt werden.
5. Die Ergebnisse zur Induktion des knochenspezifischen Markerenzym AP auf Proteinebene sollten durch Transkriptionsstudien des entsprechenden Gens sowie anderer Knochenmarkergene bestätigt werden.

Dadurch sollte im Rahmen dieser Arbeit ein grundlegendes Bild zur Funktion von proBMP-2 im Vergleich zum reifen Wachstumsfaktor geschaffen werden, sowie die Frage nach dem therapeutischen Potential des Proteins beantwortet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von der Firma Applichem (Darmstadt) im Reinheitsgrad *BioChemica* bezogen. Zur Herstellung von Puffern und Lösungen wurde, wenn nicht anders angegeben, deionisiertes Wasser (Pure Lab Plus, USF Seral) verwendet.

<u>Chemikalie</u>	<u>Hersteller</u>
Acryl./Bisacrylamid; Rotiphorese Gel 30	Roth (Karlsruhe)
Agar Agar	Roth (Karlsruhe)
Agarose	ICN (Eschwege)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth (Karlsruhe)
Bromphenolblau	Sigma (München)
Chlorpromazin	Merck KGaA (Darmstadt)
Coomassie Brilliant Blau G250	Roth (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma (München)
Dynasore (Dynamamin Inhibitor I)	Merck KGaA (Darmstadt)
Glycerin	Sigma (München)
Hefeextrakt	Rot (Karlsruhe)
Kanamycinsulfat	Fluka (Buchs, Schweiz)
Ampicillin-Natriumsalz	Sigma (München)
β -Mercaptoethanol	Fluka (Buchs, Schweiz)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe)
Proteaseinhibitor-Cocktail (<i>complete</i> , <i>EDTA-free</i>)	Roche Diagnostics (Mannheim)
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth (Karlsruhe)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	MP Biomedicals (Zürich, Schweiz)
Trypton	Roth (Karlsruhe)
Tween-20	Sigma (München)

2.1.2 Kits und Testsysteme

<u>Kit</u>	<u>Hersteller</u>
peqGold Plasmid Miniprep Kit I oder II	Peqlab (Erlangen)
PCR Mycoplasmen-Testkit	Applichem (Darmstadt)
QuikChange II <i>Site-Directed Mutagenesis</i> Kit	Agilent Technologies (Waldbronn)
ZeroBlunt [®] TOPO [®] PCR Cloning Kit	Invitrogen (Darmstadt)
GeneJET [®] PCR <i>Purification</i> Kit	Fermentas (St. Leon-Rot)
GeneJET [®] Gel <i>Extraction</i> Kit	Fermentas (St. Leon-Rot)
peqGold RNAPure	Peqlab (Erlangen)
BCA-Assay-Kit	Thermo Fischer Scientific (Bonn)
<i>Cytotoxicity Detection</i> Kit ^{PLUS} (LDH)	Roche Diagnostics (Mannheim)
<i>Cell Proliferation</i> ELISA, BrdU (<i>colorimetric</i>)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Caspase 3 Assay Kit, <i>colorimetric</i>	Sigma (Taufkirchen)
EndoSafe [®] Endochrome-K Endotoxin-Testkit	Charles River (Sulzfeld)

2.1.3 Standards

<u>Standard</u>	<u>Hersteller</u>
<i>Unstained Protein Molecular Weight Marker</i>	Fermentas (St. Leon-Rot)
<i>PageRuler Prestained Protein Ladder</i>	Fermentas (St. Leon-Rot)
GeneRuler 100 bp DNA <i>Ladder, ready-to-use</i>	Fermentas (St. Leon-Rot)
GeneRuler 1 kb DNA <i>Ladder, ready-to-use</i>	Fermentas (St. Leon-Rot)

2.1.4 Enzyme und Proteine

<u>Enzym/Protein</u>	<u>Hersteller</u>
Uracil-DNA Glycosylase (UDG)	Fermentas (St. Leon-Rot)
<i>Bam</i> HI (aus <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H)	NEB (Frankfurt)
<i>Nde</i> I (aus <i>Neisseria denitrificans</i>)	NEB (Frankfurt)
<i>Xba</i> I (aus <i>Xanthomonas badrii</i>)	NEB (Frankfurt)
<i>Hind</i> III (aus <i>Haemophilus influenzae</i>)	NEB (Frankfurt)
<i>Pwo</i> DNA-Polymerase	Peqlab (Erlangen)
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Fermentas (St. Leon-Rot)
Dream <i>Taq</i> DNA-Polymerase	Fermentas (St. Leon-Rot)
T4-Ligase	Fermentas (St. Leon-Rot)
CIP (<i>calf intestine phosphatase</i>)	NEB (Frankfurt)
<i>Dpn</i> I (aus <i>Diplococcus pneumoniae</i>)	NEB (Frankfurt)
Benzonase [®] Reinheitsgrad II	Merck (Darmstadt)
Lysozym	Roche Diagnostics (Mannheim)
<i>tobacco etch virus</i> (TEV)-Protease	hergestellt von der Arbeitsgruppe Membranproteine, Biotechnologie
Noggin, <i>recombinant mouse</i> , glycosyliert	R&D Systems (Wiesbaden)
BMPR-IA-ECD	hergestellt und zur Verfügung gestellt von Anja Hauburger
BMP-2-Propeptid	hergestellt und zur Verfügung gestellt von Anja Hauburger
GDF-5/proGDF-5	hergestellt und zur Verfügung gestellt von Tino Thieme

2.1.5 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen. Angegeben sind jeweils die *forward* (F) und *reverse* Primer (R).

Die Primer wurden mit Hilfe des Programms Vector NTI (Invitrogen, Darmstadt) entworfen. Die Sequenzen für die RT-Primer für Alkalische Phosphatase, Osteocalcin und Osterix wurden folgenden Publikationen entnommen: (Pereira *et al.*, 2009; Shanmugarajan *et al.*, 2009; Yanai *et al.*, 2001).

Mutagenese-Primer

<u>Bezeichnung</u>		<u>Sequenz</u>
pET-15b::proBMP-2	F	5'-CG GAA TTC CAT ATG GGT GCA GGT CTT GTG CCG-3'
	R	5'-CCG GAT CCT TAC TAG CGA CAC CCA CAA CCC TC-3'
pET-11a::proBMP-2	F	5'-AT ATA CAT ATG GGT GCA GCA GGT CTT GTG CCG GAG CTG GG-3'
	R	5'-CCC AGC TCC GGC ACA AGA CCT GCT GCA CCC ATA TGT ATA T-3'

RT-Primer

<u>Bezeichnung</u>		<u>Sequenz</u>	<u>Fragmentlänge</u>
Osteocalcin	F	5'-CAA GTC CCA CAC AGC AGC TT-3'	370 bp
	R	5'-AAA GCC GAG CTG CCA GAG TT-3'	
Alk.Phosphatase	F	5'-GTT GCC AAG CTG GGA AGA ACA C-3'	120 bp
	R	5'-CCC ACC CCG CTA TTC CAA AC-3'	
Osterix	F	5'-GGT CCA GGC AAC ACA CCT AC-3'	183 bp
	R	5'-GGT AGG GAG CTG GGT TAA GG-3'	
β-Actin	F	5'-ATA TCG CTG CGC TGG TCG TC-3'	378 bp
	R	5'-GGG GTG TTG AAG GTC TCA AAC-3'	
Runx2	F	5'-AGG ACA GAG TCA GAT TAC AG-3'	726 bp
	R	5'-TCA ATA TGG CCG CCA AAC AG-3'	
BMP-2	F	5'-CAGACCACCGGCTGGAGAG-3'	354 bp
	R	5'-GCATCACAGCTGGGGTGACG-3'	

2.1.6 Plasmide und Vektoren

<u>Plasmid/Vektor</u>	<u>Referenz</u>
pET-15b::proBMP-2 Expressionsvektor	hergestellt von Frank Hillger (Hillger <i>et al.</i> , 2005)
pMalC2TEV::Noggin Expressionsvektor	zur Verfügung gestellt von Anja Buttstedt (Arbeitsgruppe)
pET-11a	Peqlab (Erlangen)
pUBS 520	(Brinkmann <i>et al.</i> , 1989)

2.1.7 Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Hersteller</u>	<u>verwendete Verdünnung</u>
Anti-rhBMP-2 aus Kaninchen	dianova (Hamburg)	0,2 µg/ml
Anti-Actin aus Kaninchen	dianova (Hamburg)	0,04 µg/ml
Anti-GAPDH aus Kaninchen	dianova (Hamburg)	0,04 µg/ml
Anti-BMP-2-Propeptid aus Huhn	Davids Biotechnologie (Regensburg)	1:1000
Anti-Kaninchen, POD-konjugiert	Thermo Scientific (Bonn)	0,08 µg/ml
Anti-Huhn, POD-konjugiert	Thermo Scientific (Bonn)	0,08 µg/ml

2.1.8 Bakterienstämme

E. coli BL21 (DE3) von Agilent Technologies (Waldbronn)

Genotyp: B F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])

E. coli XL1 Blue von Agilent Technologies (Waldbronn)

Genotyp: endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB⁺ lacI^q
Δ(lacZ)M15] hsdR17(r_K⁻ m_K⁺)

2.1.9 Zellmasse

Für die Herstellung von BMP-2 wurde die von Frank Hillger hergestellte *E. coli*-Zellfeuchtmasse verwendet.

2.1.10 Säulen und Säulenmaterialien

<u>Chromatographie-Säule</u>	<u>Hersteller</u>
Amylose Resin 15 ml	NEB (Frankfurt)
HiTrap Heparin HP (5 ml-Säule)	GE Healthcare (München)
Nucleosil 5u C8-Säule für <i>reversed phase</i> HPLC	Phenomenex (Aschaffenburg)
SP-Sepharose FF (5 ml-Säule)	GE Healthcare (München)
Superdex 75 <i>prep grade</i> , 100 ml	GE Healthcare (München)

2.1.11 Reagenzien und Materialien für die Zellkultur

<u>Produkt</u>	<u>Beschreibung</u>	<u>Hersteller</u>
DMEM, high Glucose (4,5 g/l)	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i> , mit stabilem Glutamin und Phenol-Rot	PAA (Pasching, Österreich)
RPMI 1640	angereichertes Medium auf Basis von RPMI 1630, mit stabilem Glutamin und Phenol-Rot	PAA (Pasching, Österreich)
DMSO	Dimethylsulfoxid, Zellkultur-geeignet, steril	Applichem (Darmstadt)
FBS	<i>fetal bovine serum</i> , hitzeinaktiviert	GIBCO (Karlsruhe)
PSA (100x)	Penicillin (10 000 U/ml), Streptomycin (10 mg/ml), Amphotericin B (0,25 mg/ml)	PAA (Pasching, Österreich)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , steril	PAA (Pasching, Österreich)
TE-Lösung (1x)	Trypsin (0,5 mg/ml), EDTA (Titriplex III; 0,22 mg/ml) in PBS	PAA (Pasching, Österreich)
Zellkulturflaschen	25 oder 75 cm ² , mit Filterkappe	PAA (Pasching, Österreich)
Serologische Einmalpipetten	(2, 5, 10, 25 ml)	TPP AG (Trasadingen, Schweiz)
Zählkammer	Zählgitter: Neubauer <i>improved</i>	Roth (Karlsruhe)

2.1.12 Zelllinien

<u>Name</u>	<u>Zelltyp, Organismus</u>	<u>Referenz</u>	<u>Händler</u>
C2C12	Myoblasten, Maus	(Blau <i>et al.</i> , 1985)	DSMZ (Braunschweig)
b/C3T3	Fibroblasten, Maus	(Pledger <i>et al.</i> , 1977)	ATCC (Wesel)

2.1.13 Sonstige Materialien

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
Rundfilter für Tropfendialysen (Porengröße 0,025 µm)	Millipore (Schwalbach)
Rundfilter für Amicon [®] -Rührzelle (MWCO 10 kDa)	Millipore (Schwalbach)
Rundfilter zur Pufferfiltration (Porengröße 0,45 µm)	Sigma (München)
Sterilfilter (Porengröße 0,2 und 0,45 µm)	Roth (Karlsruhe)
Dialyseschläuche (MWCO 6-8 kDa)	SpectraPor (Breda, Niederlande)
Protran [®] Nitrocellulose Membran für Western Blots	Fisher Scientific (Schwerte)
Lumi-Film <i>Chemoluminescent Detection</i> Film	Roche Diagnostics (Mannheim)
Kodak GBX Entwickler- und Fixiererlösung	Sigma (München)

2.1.14 Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller</u>
96-well <i>microplate reader</i> mit SoftMaxPro 4.3.1 LS Software	Molecular Devices (Sunnyvale, USA)
Abkühlgefäß 5100 Cryo 1°C ("Mr. Frosty")	Nalgene (Roskilde, Dänemark)
Autoklaven <i>Varioklav 500E</i>	H+P Labortechnik (Oberschleißheim)
ÄKTA [®] <i>Explorer</i> und <i>Purifier</i> mit Fraktionskollektor Frac-900,	GE Healthcare (München)
UV- und Leitfähigkeits-Monitor, „Unicorn“-Software	
Western Blot Apparatur <i>Semi Phor</i>	Hofer Scientific Instruments
CD-Spektropolarimeter J810	Jasco-Systems (Groß-Umstadt)
Elektroporator 2510	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge Biofuge [®] <i>fresco</i> und <i>pico</i>	Heraeus (Hanau)
Vivaflow 200 (MWCO 10 kDa, PES) zur Cross Flow-Filtration	Sartorius Biotech (Göttingen)
Zellhomogenisator Gaulin Micron Lab [®] 40	APV Homogeniser GmbH (Lübeck)
Fluoreszenzspektrometer FluoroMax [®] 2	ISA Instruments (USA)
Kühlzentrifuge Avanti [®] J-20 und J-25	Beckmann-Coulter (Krefeld)
Nano-Photometer	Implen (München)
Mikroskop <i>Telaval 3</i>	Carl Zeiss (Jena)
P1-Pumpe	Pharmacia Biotech (Freiburg)
Peristaltische Pumpe FE 411	B.Braun GmbH (Melsungen)
pH-Messgerät WTW 526	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten (Weilheim)
Lyophilisator Beta 1-16 mit Anlagensteuerung LMC-1	Christ Gefrier Trocknungsanlagen GmbH (Osterode)
Elektrophorese- <i>Power Supply</i> EPS 300, 600 und 3500	Pharmacia Biotech (Freiburg)

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller</u>
SDS-Gelelektrophoresekammern <i>Mighty Small II</i>	Pharmacia Biotech (Freiburg)
Agarose- Gelelektrophoresekammern	Peqlab (Erlangen)
Sterilbank <i>Hera Safe</i>	Heraeus (Hanau)
Thermocycler <i>Mastercycler gradient</i>	Eppendorf (Hamburg)
Tiefkühlschrank	GFL (Burgwedel)
Thermomixer <i>compact</i> und <i>comfort</i>	Eppendorf (Hamburg)
Ultraturrax T25	Janke & Kunkel (Staufen)
UV-Transilluminator	Biotec-Fischer (Reiskirchen)
Membran-Vakuumpumpe <i>Laboport</i>	Roth (Karlsruhe)
Brutschrank <i>Hera Cell</i>	Heraeus (Hanau)
Kapillar-Gelelektrophoresesystem QIAxcel [®]	Qiagen (Hilden)
qPCR-Gerät <i>LightCycler 480</i>	Roche Applied Science (Mannheim)
Schüttelwasserbad	GFL Germany (Großburgwedel)
HPLC Komplettanlage <i>Gynkotek</i>	Softron GmbH (Germering)
Amicon [®] -Rührzelle 200 ml	Millipore (Schwalbach)

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des Plasmid Miniprep Kits der Firma Peqlab entsprechend Hersteller-Protokoll. Die Methode basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse von Bakterienzellen durch NaOH/SDS und anschließender Adsorption der Nucleinsäuren an eine Silikatmatrix in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen (Birnboim und Doly, 1979; Vogelstein und Gillespie, 1979).

2.2.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren

Die Nucleinsäurekonzentrationen in Lösungen wurden spektrometrisch anhand der Lichtabsorption bei 260 nm ermittelt. Die Berechnung erfolgte auf der Grundlage, dass eine RNA-Konzentration von 40 µg/ml bzw. eine DNA-Konzentration von 50 µg/ml in einer Absorption $A_{260 \text{ nm}}$ von 1 resultieren. Um Verunreinigungen durch Proteine auszuschließen, wurde zusätzlich die Absorption bei 280 nm bestimmt. Eine reine Nucleinsäurelösung hat ein Absorptionsverhältnis $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ von 1,8-2,0.

2.2.1.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion wurde eingesetzt, um das Expressionskonstrukt für proBMP-2 als tag-freie Variante zu erzeugen. Dazu wurde im ersten Schritt die codierende Sequenz für proBMP-2 aus dem Expressionskonstrukt pET 15b::proBMP-2 amplifiziert. Durch die verwendeten PCR-Primer waren Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Nde*I vorhanden. Mit Hilfe dieser Schnittstellen wurde die codierende Sequenz für proBMP-2 in den pET 11a Expressionsvektor inseriert. In einem zweiten Schritt wurden durch orts-spezifische Mutagenese an *wobble*-Positionen Punktmutationen inseriert.

2.2.1.3.1 Amplifikation der codierenden Sequenz für proBMP-2

Als *template* diente das Expressionskonstrukt pET 15b::proBMP-2. Folgende Reaktionsbedingungen wurden (nach Optimierung) gewählt:

<u>Reaktionsansatz:</u>	<i>template</i>	25 ng
	pET 15b-proBMP-F-Primer	125 ng
	pET 15b-proBMP-R-Primer	125 ng
	Reaktionspuffer	5 µl
	dNTP-Mix (10 mM)	1 µl
	<i>Pwo</i> -Polymerase	1 µl
	Wasser, nuklease-frei	ad. 50 µl

Reaktionsbedingungen:

<u>Reaktionsschritt</u>	<u>Reaktionszeit</u>	<u>Temperatur</u>	
Initiale Denaturierung	60 sec	95°C	
Denaturierung	30 sec	95°C	} 28 Zyklen
<i>Annealing</i>	30 sec	62°C	
Elongation	2 min	72°C	

Das PCR-Produkt wurde nach Mikro-Dialyse gegen 10%ige Glycerinlösung (v/v) direkt für die *Blunt End*-Klonierung (2.2.1.6) eingesetzt.

2.2.1.3.2 Orts-spezifische Mutagenese

Für die orts-spezifische Mutagenese wurde das QuikChange® II *Site-Directed Mutagenesis* Kit verwendet. Folgende Bedingungen erwiesen sich als optimal:

<u>Reaktionsansatz:</u>	<i>template</i>	25 ng
	pET 11a-proBMP-F-Primer	125 ng
	pET 11a-proBMP-R-Primer	125 ng
	Reaktionspuffer	5 µl
	dNTP-Mix (10 mM)	1 µl
	<i>Pfu</i> -Polymerase	1 µl
	Wasser, nuklease-frei	ad. 50 µl

Reaktionsbedingungen:

<u>Reaktionsschritt</u>	<u>Reaktionszeit</u>	<u>Temperatur</u>	
Initiale Denaturierung	30 sec	95°C	
Denaturierung	30 sec	95°C	} 15 Zyklen
<i>Annealing</i>	60 sec	55°C	
Elongation	6,5 min	68°C	

Der PCR-Ansatz wurde nach der Reaktion mit 10 Units *DpnI* versetzt und 2h bei 37°C inkubiert. Dieses Enzym schneidet ausschließlich methylierte DNA und entfernt dadurch die *template*-DNA aus dem Reaktionsansatz. Der Erfolg der Mutagenese wurde durch Sequenzierung verifiziert.

2.2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von Nukleinsäuren wurden je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente 1-3%ige (w/v) Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde unter Erhitzen in TAE-Puffer gelöst und in die Gelrahmen gegossen. TAE-Puffer diente außerdem auch als Laufpuffer. Bei einer angelegten Stromstärke von 10 mA pro cm Lauflänge betrug die Laufzeit 45-200 min. Anschließend wurden die Gele mit Ethidiumbromid (0,1 µg/ml) gefärbt und am Transilluminator unter UV-Licht ausgewertet.

TAE-Puffer

2 M Tris/HCl, pH 8,5

1 M Essigsäure

100 mM EDTA

2.2.1.5 Gelextraktion von DNA-Fragmenten

Grundlage der Methode bildet ebenfalls die Adsorption der Nukleinsäuren an eine Silikatmatrix in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen (Birnboim und Doly, 1979; Vogelstein und Gillespie, 1979). DNA-Fragmente wurden zunächst in einem präparativen Agarosegel aufgetrennt und ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA-Fragmente aus dem Gel erfolgte mittels GeneJET® Gel *Extraction Kit*.

2.2.1.6 Blunt End-Klonierung von DNA-Fragmenten

Eine Klonierung von *blunt end*-PCR-Produkten in einen Zwischenvektor ist vor allem dann sinnvoll, wenn Ausgangsvektor und Zielvektor die gleiche Antibiotika-Resistenz als Selektionsmerkmal aufweisen. Für die Zwischenklonierung wurde das ZeroBlunt® TOPO® PCR Cloning Kit verwendet.

2.2.1.7 Restriktionsverdau

2.2.1.7.1 Restriktion im präparativen Maßstab

Durch die PCR-Primer wurden Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Nde*I mit dem zu klonierenden Fragment fusioniert. Die gleichen Restriktionsschnittstellen waren auch in der *multiple cloning site* (MCS) des Zielvektors vorhanden. Für die Restriktion wurde ein Gesamtvolumen von 200 µl gewählt. Die Ansätze enthielten 70 µl Plasmid-DNA (durchschnittlich 200-250 ng), 20 µl NEB-Puffer *Bam*HI (zehnfach konzentriert) und je 5 µl *Bam*HI und *Nde*I (je 50 Units). Die Inkubation erfolgte für 90 min bei 37°C. Anschließend wurden die Ansätze mit DNA-Ladepuffer gemischt, im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Gelextraktions-Kit gereinigt.

2.2.1.7.2 Restriktion im analytischen Maßstab

Die Restriktion im analytischen Maßstab diente der schnellen Identifizierung von Klonen anhand der Größe der erhaltenen Fragmente. In einem Gesamtansatz von 10 µl wurden 8,2 µl Plasmid-Lösung (durchschnittlich 20-30 ng) mit 1 µl NEB-Puffer 2 (zehnfach konzentriert) und jeweils 0,4 µl (8 Units) der Restriktionsenzyme *Xba*I und *Hind*III versetzt und 90 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsansätze mit jeweils 5 µl DNA-Ladepuffer gemischt und im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.1.8 Dephosphorylierung geschnittener Vektoren

Durch Behandlung der geschnittenen Vektoren mit Alkalischer Phosphatase werden 5'-Phosphatgruppen hydrolysiert und dadurch eine intramolekulare Ligation unterdrückt. Dies erhöht den Anteil rekombinanter Plasmide.

Für die Dephosphorylierung wurde die geschnittene und mittels Gelextraktion gereinigte Vektor-DNA (ca. 200 ng) in einem Gesamtansatz von 70 µl mit NEB-Puffer 3 (zehnfach konzentriert) und 5 Units CIP (*calf intestine phosphatase*) versetzt und 90 min bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend mit Hilfe des GeneJET® PCR Purification Kits abgetrennt.

2.2.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Die T4-Ligase katalysiert ATP-abhängig die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einer 3'-Hydroxylgruppe und einer 5'-Phosphatgruppe. Die Reaktion wurde genutzt um die codierende Sequenz für proBMP-2 in den Vektor pET 11a einzuführen. Sowohl Vektor- als auch *insert*-DNA waren durch Restriktion mit den Enzymen *Bam*HI und *Nde*I geschnitten und so für die Ligation vorbereitet worden. Zudem wurde der Vektor zuvor dephosphoryliert um eine intramolekulare Ligation zu unterdrücken.

In einem Gesamtansatz von 25 µl wurden Vektor- und *insert*-DNA (im molaren Verhältnis von 1:2 bis 1:4) mit 2,5 µl T4-Puffer (zehnfach konzentriert, mit ATP) und 1 µl T4-Ligase (6,25 Weiss-Units) gemischt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 65°C für 10 min gestoppt und vor der Elektrotransformation gegen 10%ige Glycerinlösung (v/v) mikro-dialysiert.

2.2.1.10 Isolation von RNA aus mammalischen Zellen

Mammalische Zellen wurden in 25 cm² Zellkulturflaschen kultiviert und zur RNA-Extraktion mit 1 ml peqGOLD RNAPure[®] lysiert. Die Methode beruht auf Flüssigphasen-Separation mittels Guanidinisothiocyanat/Phenol. Nach Zugabe von Chloroform und Phasentrennung war die RNA in der wässrigen Phase enthalten und konnte mit Isopropanol präzipitiert werden. Nach zweimaligem Waschen in jeweils 1 ml 75% (v/v) Ethanol wurde das RNA-Pellet in 40-50 µl DEPC-behandeltem Wasser gelöst. Pro Zellkulturflasche konnten ca. 20-30 µg RNA isoliert werden. Die Überprüfung auf Degradation erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese, wobei jeweils 1 µg RNA in einem 2%igen (w/v) Gel aufgetrennt wurde. Die RNA-Proben wurden bei -20°C gelagert.

2.2.1.11 Reverse Transkription – cDNA-Synthese

Jeweils 1 µg isolierter RNA wurde zur cDNA-Synthese in einem Gesamtvolumen von 20 µl eingesetzt. Durch Verwendung von oligo(dT)₁₈-Primern wurde die isolierte Gesamt-RNA mRNA-spezifisch revers transkribiert. Nach Optimierung wurden folgende Reaktionsbedingungen gewählt:

<u>Reaktionsansatz:</u>	<i>template</i>	(1 µg RNA)
	RT-Puffer	4 µl
	Ribolock® RNase-Inhibitor	0,5 µl
	Oligo(dT) ₁₈ -Primer	20 pmol
	Reverse Transkriptase	1 µl
	dNTP-Mix (10 mM)	1 µl
	DEPC-behandeltes Wasser	ad. 20 µl

<u>Reaktionsbedingungen:</u>	10 min	25°C
	45 min	50°C
	5 min	85°C (Inaktivierung)

Die Inkubation der Reaktionsansätze wurde im PCR-Thermocycler durchgeführt. Die Lagerung der cDNA-Proben erfolgte bei -20°C.

2.2.1.12 DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die gezielte Amplifikation bestimmter Abschnitte der cDNA wurden genspezifische Primer verwendet. Die Primer wurden intron-übergreifend gewählt, um die Amplifikation von cDNA und genomischer DNA unterscheiden zu können. Als *template* diente der inaktivierte Reaktionsansatz der cDNA-Synthese.

Folgende Reaktionsbedingungen wurden gewählt:

<u>Reaktionsansatz:</u>	<i>template</i>	2 µl
	F- und R-Primer	je 20 pmol
	<i>DreamTaq® Green Buffer</i>	5 µl
	dNTP-Mix (10 mM)	1 µl
	<i>DreamTaq® Polymerase</i>	0,25 µl
	Wasser, nuklease-frei	ad. 50 µl

Reaktionsbedingungen:

<u>Reaktionsschritt</u>	<u>Reaktionszeit</u>	<u>Temperatur</u>	
Initiale Denaturierung	3 min	95°C	
Denaturierung	30 sec	95°C	} 30 Zyklen
<i>Annealing</i>	30 sec	(s.u.)	
Elongation	40 sec	72°C	
Finale Elongation	10 min	72°C	

<u>Annealing-Temperaturen:</u>		
<i>osterix</i>		57°C
<i>alkalische phosphatase</i>		57°C
<i>osteocalcin</i>		57°C
<i>β-actin</i>		57°C
<i>runx2</i>		52°C
<i>bmp-2</i>		57°C

Um eine Verunreinigung der Proben mit genomischer DNA auszuschließen, wurde immer eine Negativkontrolle mitgeführt. Dazu wurde 1 µg isolierter RNA ohne Reverse Transkription als *template* für die DNA-Amplifikation mit dem β-Actin-Primerpaar unter identischen Reaktionsbedingungen eingesetzt. Bis zur Auswertung mittels Agarose-Gelelektrophorese bzw. Kapillar-Elektrophorese wurden die Proben bei -20°C gelagert

2.2.1.13 Kapillar-Elektrophorese

Die Auftrennung der PCR-Proben mittels Kapillar-Elektrophorese erlaubt eine semi-quantitative Auswertung. Jeder PCR-Reaktionsmix wurde mit dem automatisierten Kapillar-Elektrophorese-System QIAxcel[®] unter Verwendung des QIAxcel[®] DNA *high resolution* Kits und der QIAxcel[®] Methode OM500 analysiert. Als Größenstandard diente der 15 bp/5 kb *alignment* Marker.

2.2.1.14 Real-time PCR

Für die quantitative *real-time* PCR (qPCR) wurden die cDNA-Proben in nuklease-freiem Wasser 1:10 verdünnt und diese Verdünnung als *template* eingesetzt.

Folgende Reaktionsbedingungen wurden gewählt:

<u>Reaktionsansatz:</u>	<i>template</i>	2 µl
	UDG	1 µl
	F- und R-Primer	je 7,5 pmol
	SYBR-Green/ROX®-Mastermix	12,5 µl
	Wasser, nuklease-frei	ad. 25 µl

Reaktionsbedingungen:

<u>Reaktionsschritt</u>	<u>Reaktionszeit</u>	<u>Temperatur</u>	
UDG-Verdau	2 min	50°C	
Initiale Denaturierung	10 min	95°C	
Denaturierung	14 sec	95°C	} 45 Zyklen
<i>Annealing</i>	30 sec	57°C	
Elongation	30 sec	72°C	
<i>Melting Curves</i>	5 sec	95°C	
	60 sec	65°C	Temperaturrampe bis 97°C mit 0,11 K/sec

Alle Proben wurden als dreifache Replikate geführt. Zur Standardisierung wurde außerdem die PCR-Effizienz für jedes Gen/Primer-Paar ermittelt. Dazu wurden Verdünnungsstufen von 1:1 (unverdünnt) bis 1:100.000 unter den gleichen Reaktionsbedingungen behandelt und der C_P -Wert gegen den Logarithmus des Verdünnungsfaktors aufgetragen.

Anhand der C_P -Werte und der PCR-Effizienz konnte die gen-spezifische relative Expressionsrate bestimmt werden. Diese ist definiert als Expressionsniveau eines Zielgens (GOI, *gene-of-interest*) in einer bestimmten Probe in Relation zu einer Referenz-Probe (cDNA aus nicht-stimulierten Zellen), die als externer Standard diente. Zusätzlich wurde für jede Probe das Expressionsniveau von β -actin als internem Standard (nicht-reguliertes *housekeeping*- bzw. Referenz-Gen) mitgeführt. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel (Scheffe *et al.*, 2006):

$$rER = \frac{E(Ref) C_P(Ref; x)}{E(GOI) C_P(GOI; x)}$$

rER	– relative Expressionsrate
E(Ref)	– PCR-Effizienz (Referenz-Gen)
E(GOI)	– PCR-Effizienz (Zielgen)
C _P (Ref; x)	– C _P -Wert des Referenz-Gens in Probe x
C _P (GOI; x)	– C _P -Wert des Zielgens in Probe x

2.2.2 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Genexpression erfolgte mit Hilfe einer Standard-Software zur Tabellenkalkulation und STATISTICA 8.0 (StatSoft, Tulsa, Oklahoma, USA). Die Werte der relativen Genexpression wurden *log*-transformiert, um eine Normalverteilung zu erhalten. Signifikanzwerte wurden mittels faktorieller ANOVA (*analysis of variance*) und Turkeys HSD *post-hoc* Test ermittelt.

2.2.3 Mikrobiologische Methoden

Alle verwendeten Nährmedien wurden vor der Verwendung durch Autoklavieren sterilisiert. Für die Kultivierung von *E. coli* wurde LB-Medium modifizierter Zusammensetzung verwendet. Das Salz-optimierte und mit Glucose versetzte SOC-Medium kam nach der Transformation durch Elektroporation zum Einsatz, um die Anzahl der Transformanten zu erhöhen.

<u>LB-Medium (modifiziert)</u>	<u>SOB-Medium</u>	<u>SOC-Medium</u>
1% (w/v) Trypton	2% (w/v) Trypton	SOB-Medium
0,5% (w/v) Hefeextrakt	0,5% (w/v) Hefeextrakt	10 mM MgSO ₄
0,5% (w/v) NaCl	10 mM NaCl	0,4% (w/v) Glucose
	2,5 mM KCl	

2.2.3.1 Herstellung elektrokompenter Zellen

Als Vorkultur wurden 20 ml LB-Medium mit dem/den entsprechenden Antibiotikum/Antibiotika versetzt, mit einer Einzelkolonie inokuliert und für ca. 16 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Eine 200 ml-Hauptkultur wurde mit der Vorkultur im Verhältnis 1:100 angeimpft und anschließend ebenfalls bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach Erreichen einer optischen Dichte (OD_{600 nm}) von 0,6-0,8 wurde das Zellwachstum durch 30-minütige Inkubation auf Eis

gestoppt. Auch alle weiteren Arbeitsschritte wurden auf Eis und mit auf 4°C vorgekühlten, sterilen Gefäßen und Lösungen durchgeführt. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation (15 min, 4500 g). Um Ladungsträger zu entfernen, wurde das erhaltene Zellpellet in 10%iger (v/v) Glycerinlösung resuspendiert und gewaschen. Dabei wurde das Volumen in drei Schritten von 100% auf 10% der ursprünglichen Kulturvolumens abgesenkt. Zuletzt wurde das Bakterienpellet in 0,1% des Ausgangsvolumens resuspendiert und die Zellsuspension in Aliquots von je 40 µl bei -80°C eingefroren.

2.2.3.2 Transformation durch Elektroporation

Zur Transformation durch Elektroporation wurde ein Aliquot elektrokompetenter Zellen auf Eis aufgetaut, mit 4-20 ng Plasmid-DNA versetzt und in eine auf 4°C vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Für den Impuls wurden am Elektroporationsgerät folgende Einstellungen gewählt: Kapazität 25 µF, Widerstand 400 kΩ, Spannung 2500 V. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml auf 37°C temperiertes SOC-Medium überführt und 30 min unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Die Selektion erfolgte auf LB-Agar-Platten, die mit dem/den entsprechenden Antibiotikum/Antibiotika versetzt waren.

2.2.3.3 Rekombinante Genexpression in *Escherichia coli*

Für die rekombinante Expression eukaryotischer Gene in *E. coli* ist zu beachten, dass die Codon-Nutzung sich in den verschiedenen Organismen voneinander unterscheidet. Daraus folgt, dass einige tRNAs in *E. coli* nur in geringen Mengen vorhanden sind. Das kann bei der rekombinanten Expression eukaryotischer Gene limitierend wirken.

Eine Möglichkeit diese Limitierung zu umgehen ist die Co-Transformation des Vektors pUBS 520. Das Plasmid trägt das *dnaY*-Gen, das unter der Kontrolle des lac-Repressor (*lacIq*) steht, und vermittelt außerdem Kanamycin-Resistenz (Brinkmann *et al.*, 1989). Durch den Replikationsursprung p15A ist der Vektor kombinierbar mit allen Vektoren, die einen ColEI Replikationsursprung besitzen, wie das im Rahmen dieser Arbeit verwendete pET-Expressionssystem.

Das pET-Expressionssystem stellt die Zielgene unter die Kontrolle der Bakteriophagen T7-Transkription, die ihrerseits unter der Kontrolle des lac-Operons steht. In Abwesenheit eines Induktors wird die Expression der T7-RNA-Polymerase durch den lac-Repressor inhibiert. Die Zugabe des Laktose-Analogons IPTG hebt diese Repression auf und induziert damit die Überexpression des rekombinanten Proteins.

2.2.3.3.1 Expression im Schüttelkolben

Als Vorkultur wurden 100 ml LB-Medium mit den Antibiotika Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml) und Kanamycin (Endkonzentration 50 µg/ml) versetzt, mit einer Einzelkolonie inokuliert und für ca. 16 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Eine Hauptkultur mit einem Volumen von insgesamt 6 l, aufgeteilt auf vier 5 l-Gefäße, wurde mit der Vorkultur im Verhältnis 1:100 angeimpft und anschließend ebenfalls bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach Erreichen einer optischen Dichte (OD_{600nm}) von 0,6-0,8 wurde durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) die Genexpression induziert. Die Zellernte erfolgte 4 h nach Induktion durch Zentrifugation der Kultur (20 min, 6000 g, 4°C). Das Zellpellet wurde bis zum Zellaufschluss bei -80°C gelagert.

2.2.3.3.2 Fermentation

Die Kultivierung erfolgte nach dem von Frank Hillger im Rahmen seiner Dissertation etablierten Protokoll in einem Bioreaktor mit 10 l Arbeitsvolumen im *fed batch*-Verfahren (Hillger, 2005). Hefeextrakt und Glycerin dienten als Kohlenstoff-Quellen. Für das Kulturmedium wurden 350 g Hefeextrakt, 3,5 g NH_4Cl und 77 g Glycerin in 6 l Wasser gelöst, im Bioreaktor sterilisiert und anschließend steril mit 1 M KH_2PO_4 auf ca. pH 7 eingestellt. Durch einen Sterilfilter (Porengröße 20 µm) wurden $MgSO_4$ (Endkonzentration 2,8 mM), 0,01% (w/v) Thiamin, sowie 0,1% (w/v) Ampicillin und 0,05% (w/v) Kanamycin zugegeben und mit Wasser auf 6,5 l aufgefüllt. Es wurde mit 500 ml einer Vorkultur angeimpft und bei 37°C und einer Sauerstoffsättigung von 20% kultiviert. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von H_3PO_4 bzw. KOH konstant gehalten. Das *Feeding* wurde nach Erreichen einer OD_{600nm} von 20 gestartet. Innerhalb von 4 h wurden insgesamt 3 l *Feeding*-Lösung (30% (w/v) Hefeextrakt, 25% (v/v) Glycerin, steril) zugegeben. Die Genexpression wurde bei einer OD_{600nm} von 50 durch Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Die Fermentation wurde 3 h nach Induktion beendet und die Zellmasse durch Zentrifugation (20 min, 6000 g, 4°C) der Kultur geerntet.

2.2.4 Proteinchemische Methoden

2.2.4.1 Zellaufschluss

2.2.4.1.1 Zellaufschluss zur Präparation von Inclusion bodies

Die Expression von BMP-2 und proBMP-2 in *E. coli* erfolgte in unlöslicher Form als *inclusion bodies* (IBs). Für die Isolation der IBs aus Zellfeuchtmasse wurde das Protokoll von Rudolph, 1997 verwendet.

Das Zellpellet wurde in 5 ml Puffer I je Gramm Zellmasse resuspendiert und nach Zugabe von 1,5 mg Lysozym je Gramm Zellmasse für 30 min auf Eis inkubiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Hochdruckdispersion (Druck: 500-900 bar) in drei Durchgängen. Zur Degradation von Nukleinsäuren wurden anschließend $MgCl_2$ (Endkonzentration 3 mM) und Benzonase[®] (Endkonzentration 7-8 U/ml) zur Zellaufschlusslösung hinzu gegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die nachfolgende Zugabe von 0,5 Volumen (v/v) Puffer II und Inkubation für 30 min auf Eis diente der Auflösung von Membranbestandteilen. Die IBs wurden durch Zentrifugation (20 min, 50.000 g, 4°C) pelletiert und vier Mal in jeweils 40 ml Puffer III gewaschen. Die isolierten IBs wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

<u>Puffer I</u>	<u>Puffer II</u>	<u>Puffer III</u>
100 mM Tris/HCl, pH 7	60 mM Na-EDTA	100 mM Tris/HCl, pH 7
1 mM Na-EDTA	6% (v/v) Triton X-100	20 mM Na-EDTA
	1,5 M NaCl	

2.2.4.1.2 Zellaufschluss zur Gewinnung von löslichem Protein

Die Expression von Noggin als N-terminalem Fusionskonstrukt mit dem Maltose-bindenden Protein (MBP) ermöglicht die Gewinnung des Fusionsproteins in löslicher Form aus dem Zellextrakt.

Das Zellpellet wurde in 10 ml Zellaufschlusspuffer je Gramm Zellmasse resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Hochdruckdispersion (Druck: 500-900 bar) in drei Durchgängen. Zur Entfernung von Nukleinsäuren wurden anschließend $MgCl_2$ (Endkonzentration 3 mM) und Benzonase[®] (Endkonzentration 7-8 U/ml) zur Zellaufschlusslösung hinzu gegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation (20 min, 9000 g, 4°C) abgetrennt.

Zellaufschlusspuffer

20 mM Tris/HCl, pH 7,4
200 mM NaCl
1 mM Na-EDTA

2.2.4.2 Solubilisierung von *Inclusion bodies* (nach Rudolph, 1997)

Die isolierten IBs wurden in 5 ml Solubilisierungspuffer je Gramm resuspendiert. Anschließend wurde zur vollständigen Reduzierung DTT zu einer Endkonzentration von 200 mM zugegeben, und die Suspension 2-3 h unter Schütteln inkubiert. Durch Absenken des pH-Wertes auf 3-4 durch tropfenweise Zugabe von Essigsäure wurde eine Oxidation der

Cysteine verhindert. DTT wurde durch 4-5malige Dialyse gegen jeweils mindestens das zehnfache Volumen an Dialysepuffer entfernt. Verbliebene unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation (20 min, 50.000 g, 4°C) abgetrennt. Das IB-Solubilisat wurde bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Solubilisierungspuffer

100 mM Tris/HCl, pH 8,5
5 mM Na-EDTA
6 M GdmCl

Dialysepuffer

6 M GdmCl, pH ~4
10 mM Na-EDTA

2.2.4.3 Renaturierung und Reinigung von BMP-2 und proBMP-2

2.2.4.3.1 Renaturierung

Vom IB-Solubilisat wurde durch Aufnahme eines UV-Spektrums die UV-Absorption bei 260 und 280 nm bestimmt. Daraus wurde nach folgender Formel die Proteinkonzentration abgeschätzt:

$$c \text{ [g/l]} = 1,552 A_{280 \text{ nm}} - 0,757 A_{260 \text{ nm}}$$

Das IB-Solubilisat wurde unter starkem Rühren bis zu einer Endkonzentration von 3,5 µM Protein in einem Gesamtansatz von 1 l Renaturierungspuffer verdünnt. Die Inkubation des Renaturierungsansatzes erfolgte bei 4°C unter langsamem Rühren für 10 bis 14 Tage. Der Erfolg wurde durch SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen verfolgt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Renaturierungsprotokoll hinsichtlich des Zeitaufwands und der Ausbeute an nativem Dimer optimiert. Die optimierte Prozedur wird im Abschnitt 3.2 des Ergebnisteils dargestellt und erläutert.

Renaturierungspuffer

100 mM Tris/HCl, pH 7,5
1 M L-Arginin
5 mM Na-EDTA
1 mM GSSG
5 mM GSH

2.2.4.3.2 Reinigung mittels Heparin-Affinitätschromatographie

Der Renaturierungsansatz wurde mittels *Cross Flow*-Filtration (beschrieben unter 2.2.4.11, Seite 51) von 1 l auf ca. 200 ml aufkonzentriert und gegen Puffer A dialysiert. Die HiTrap®-

Heparin-Sepharose-Säule, Säulenvolumen (CV) 5 ml, wurde mit Puffer A equilibriert. Anschließend wurde ca. ½ Volumen der Proteinlösung mit Hilfe einer P1-Pumpe bei einer Flussgeschwindigkeit von ca. 2 ml/min aufgetragen. Waschen und Elution erfolgte mittels ÄKTA®-Chromatographie-System nach folgendem Programm: 10 CV 30% Puffer B, 10 CV 58% Puffer B, linearer Gradient von 58-78% Puffer B über 10 CV, 10 CV 100% Puffer B. Die Flussgeschwindigkeit betrug 2 ml/min. Die Elution der dimeren Proteinspezies erfolgte im Bereich des linearen Gradienten bei ca. 600-700 mM NaCl.

Puffer A (Säulenpuffer)

100 mM Tris/Acetat, pH 6,0
5 mM Na-EDTA
6 M Harnstoff

Puffer B (Elutionspuffer)

100 mM Tris/Acetat, pH 6,0
5 mM Na-EDTA
6 M Harnstoff
1 M NaCl

2.2.4.3 Reinigung mittels Kationen-Austauschchromatographie

ProBMP-2 wurde in einem zweiten Reinigungsschritt mittels Kationen-Austauschchromatographie gereinigt, um Endotoxine abzutrennen. Dazu wurden die Elutionsfraktionen der Heparin-Affinitätschromatographie zunächst gegen 50 mM Na-Acetat, pH 4,6 und anschließend gegen Puffer A dialysiert. Danach wurde die Proteinlösung auf eine mit Puffer A equilibrierte SP-Sepharose-Säule FF®, Säulenvolumen (CV) 5 ml aufgetragen. Die Elution erfolgte mittels ÄKTA®-Chromatographie-System durch Anlegen eines linearen Gradienten von 0-100% Puffer B über 10 CV bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min. Dimeres proBMP-2 eluierte bei ca. 400 mM KCl und wurde für die Lyophilisation vorbereitet.

Puffer A (Säulenpuffer)

100 mM HEPES/KOH, pH 7,0
300 mM L-Arginin
1 mM Na-EDTA

Puffer B (Elutionspuffer)

100 mM HEPES/KOH, pH 7,0
300 mM L-Arginin
1 mM Na-EDTA
1 M KCl

2.2.4.4 Renaturierung und Reinigung von Noggin

2.2.4.4.1 Reinigung mittels Amylose-Affinitätschromatographie

Die Zellaufschlusslösung wurde 1:5 mit Puffer A verdünnt und bei einer Flussrate von 1 ml/min auf die equilibrierte Amylose-Säule, Säulenvolumen 15 ml, aufgetragen. Die Elution erfolgte mittels ÄKTA®-Chromatographie-System. Dazu wurde ein Stufengradienten auf 100% Puffer B angelegt und über 4 CV beibehalten. Anschließend wurden die Fraktionen,

die das Noggin-MBP-Fusionsprotein enthielten, vereinigt und für die Renaturierung eingesetzt.

Puffer A (Säulenpuffer)

20 mM Tris/HCl, pH 7,4
200 mM NaCl
1 mM Na-EDTA

Puffer B (Elutionspuffer)

20 mM Tris/HCl, pH 7,4
200 mM NaCl
1 mM Na-EDTA
10 mM Maltose

2.2.4.4.2 Renaturierung

Die Elutionsfraktionen der Amylose-Affinitätschromatographie wurden mit Harnstoff in einer Endkonzentration von 8 M versetzt und anschließend 1:4 in Renaturierungspuffer verdünnt. Der Renaturierungsansatz wurde unter leichtem Rühren bei Raumtemperatur vier Tage inkubiert und dann durch *Cross Flow*-Filtration (2.2.4.11) um den Faktor 4 aufkonzentriert. Danach wurde die Proteinlösung gegen Proteolysepuffer dialysiert und die Proteinkonzentration durch UV-Absorption bestimmt.

Renaturierungspuffer

50 mM Tris/HCl, pH 8,5
1 M NaCl
2 mM Na-EDTA
1 mM PMSF
25 mM CHAPS/HCl
2 mM GSSG
0,2 mM GSH

Proteolysepuffer

20 mM Tris/HCl, pH 8,5
150 mM NaCl

2.2.4.4.3 TEV-Protease-Spaltung

Der Renaturierungsansatz wurde im Verhältnis 1:200 (v/v) mit TEV (*tobacco etch virus*)-Protease versetzt und 24 h inkubiert. Unter den gewählten Pufferbedingungen ist MBP löslich, während Noggin ausfällt, und daher durch Zentrifugation (20 min, 48.000 g, 4°C) vom Fusionspartner abgetrennt werden kann. Das Pellet wurde in 15 ml 20% (v/v) Acetonitril gelöst und mittels *reversed-phase* HPLC aufgereinigt.

2.2.4.4.4 Reinigung mittels reversed phase-HPLC

Für die Aufreinigung von Noggin wurde eine Nucleosil® 5u C8-Säule verwendet. Nach Auftragen der Probe wurde die Säule mit 3 CV Lösung A gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem Acetonitril-Stufengradienten (20-50% Lösung B über 4 CV, 50-100% Lösung B über 1,5 CV). Fraktionen, die dimeres Noggin enthielten, wurden aliquotiert und mittels Vakuumkonzentration (*SpeedVac*) eingedampft. Das Pellet wurde in 1 mM HCl gelöst und bei -80°C gelagert.

Lösung A

20% (v/v) Acetonitril

0,1% (v/v) TFA

Lösung B

100% (v/v) Acetonitril

0,1% (v/v) TFA

2.2.4.5 Lyophilisation

Um eine höhere Lagerstabilität zu erreichen, wurde den Proteinlösungen von BMP-2 und proBMP-2 bei einer Konzentration von 0,8-1,5 mg/ml durch Lyophilisation das Wasser entzogen. Dazu wurden die Proteine gegen den/die entsprechenden Puffer dialysiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Der Prozess wurde bei 20°C und 0,08 bar Druck für 24-48 h in einer Gefriertrocknungsanlage Beta 1-16 durchgeführt.

BMP-2

Dialysepuffer: 50 mM NH₄-Acetat/Essigsäure, pH 4,6

Rekonstitutionspuffer: 50 mM Na-Acetat/Essigsäure, pH 4,6

proBMP-2

Da proBMP-2 bei direkter Dialyse gegen den Puffer zur Lyophilisation zur Präzipitation neigte, musste der Pufferwechsel in zwei aufeinander folgenden Schritten erfolgen. Der Zusatz von D-Mannitol ermöglichte die Rekonstitution des Proteins.

Dialysepuffer I: 50 mM Na-Acetat/Essigsäure, pH 4,6

Dialysepuffer II: 100 mM HEPES/KOH, pH 7,0

2% (w/v) D-Mannitol

Rekonstitutionsmittel: Wasser

2.2.4.6 Test auf Endotoxin-Kontamination

Der LAL-Test (Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test) ist ein *in vitro*-Testsystem zur Bestimmung von Pyrogenen in wässrigen Lösungen. Als LAL wird ein Extrakt aus den Blutzellen des

Pfeilschwanzkrebse *Limulus polyphemus* bezeichnet. Dieser Extrakt reagiert mit bakteriellen Endotoxinen und Lipopolysacchariden, die Bestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien sind. Die Reaktion bildet die Grundlage des LAL-Tests und kann durch Bestimmung der Trübung des Reaktionsgemisches bestimmt werden. Durch Kopplung der Reaktion mit dem Umsatz eines farblosen, synthetischen Substrates zu dem farbigen Produkt *p*-Nitroanilin ist eine spektrophotometrische Auswertung bei 380 nm möglich.

Der Test wurde im Mikrotiter-Maßstab durchgeführt. Zu 100 µl der Proteinlösung wurden 100 µl LAL-Reagenz gegeben und der Anstieg der Lichtabsorption bei 380 nm innerhalb 20 Minuten und einem Messpunkt pro Minute bei 25°C verfolgt. Jede Probe wurde in Dreifachbestimmung vermessen. Die Auswertung erfolgte mittels mitgeführter Standardreihe aus *E. coli*-Endotoxin im Bereich von 0,05-50 EU/ml.

2.2.4.7 Ellman-Test

Der Ellman-Test wurde vom Namensgeber 1959 entwickelt (Ellman, 1959). Er beruht auf der schnellen und stöchiometrischen Reaktion freier Thiole mit Dithionitrobenzoesäure (Ellmans Reagenz, DTNB). Bei dieser Reaktion wird Thionitrobenzoesäure (TNB) freigesetzt, das bei 412 nm ein Absorptionsmaximum aufweist (Abbildung 2.1).

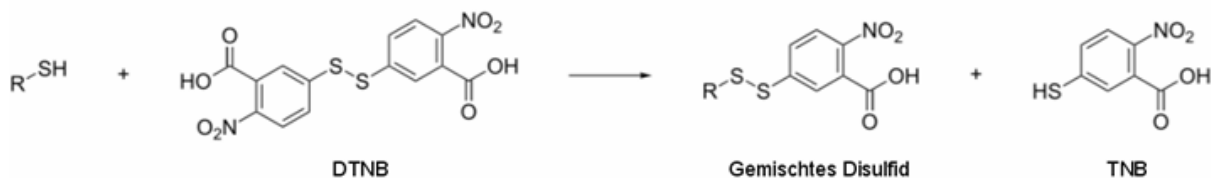


Abbildung 2.1. Ellmanns-Reaktion. Durch Reaktion mit einem freien Thiol wird die Disulfidbrücke von Dithionitrobenzoesäure (DTNB) gespalten und Thionitrobenzoesäure (TNB) freigesetzt.

Der Test wurde im Mikrotiter-Maßstab durchgeführt. 20 µl der zu bestimmenden Probe wurde mit 50 µl Verdünnungspuffer und 50 µl Methanol versetzt, und anschließend die Reaktion durch Zugabe von 20 µl DTNB-Lösung gestartet. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur und im Dunkeln wurde die Absorption bei 412 nm bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte anhand einer Eichreihe, die mit Hilfe des SH-Standard für den Konzentrationsbereich von 20-200 µM erstellt wurde.

Verdünnungspuffer

30 mM Tris/HCl, pH 8,2
3 mM Na-EDTA

DTNB-Lösung

3 mM in Methanol

SH-Standard

100 mM N-Acetyl-L-Cystein

2.2.4.8 Protein-Alkylierung

Renaturierte und gereinigte Proben von BMP-2 und proBMP-2 wurden zunächst durch Zugabe von DTT zu einer Endkonzentration von 20 mM reduziert. Die irreversible Alkylierung der SH-Gruppen erfolgte durch Reaktion mit 100 mM Iodacetamid, durch das freie Cysteine in das stabile Cystein-Derivat S-Carboxyamidomethylcystein (CAM) überführt wurden. Überschüssiges Iodacetamid und DTT wurden durch mehrfache Dialyse gegen 50 mM Na-Acetat, pH 4,6 (für BMP-2) bzw. 100 mM HEPES/KOH, pH 7,0 (für proBMP-2) entfernt, bevor das inaktivierte Protein als Negativkontrolle in der Zellkultur zur Stimulation von C2C12-Zellen eingesetzt wurde.

2.2.4.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht nach Laemmli wurden die Proteinproben mit Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert um eine vollständige Denaturierung, Homogenisierung und Reduktion der Proben zu erreichen. Für eine Analyse unter nicht-reduzierenden Bedingungen wurde Probenpuffer ohne β -Mercaptoethanol verwendet. In diesem Fall wurde außerdem auf das Erhitzen der Proben verzichtet. Die Elektrophorese erfolgte bei 175 V für ca. eine Stunde. Die Gele wurden mit Coomassie Brilliantblau G250 gefärbt und anschließend entfärbt.

<u>Trenngel (14%)</u>	<u>Sammelgel (6%)</u>	<u>Trenngelpuffer (4x)</u>	<u>Sammelgelpuffer (4x)</u>
7 ml Rotiphorese [®] 30	1,2 ml Rotiphorese [®] 30	3 M Tris/HCl, pH 8,8	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
4 ml Wasser	3,3 ml Wasser	0,4% (w/v) SDS	0,4% (w/v) SDS
4 ml Trenngelpuffer	1,5 ml Sammlgelpuffer		
50 μ l TEMED	30 μ l TEMED		
100 μ l APS (10% [w/v])	60 μ l APS (10% [w/v])		

<u>Probenpuffer*</u>	<u>Laufpuffer</u>	<u>Färbelösung</u>	<u>Entfärbelösung</u>
0,1 M Tris/HCl, pH 8,0	0,25 M Tris/HCl, pH 8,3	40% (v/v) Ethanol	40% (v/v) Ethanol
4,8% (w/v) SDS	1% (w/v) SDS	10% (v/v) Essigsäure	10% (v/v) Essigsäure
16% (v/v) Glycerin	1,9 M Glycin	1 g/l Coomassie-Blau	
0,1% (w/v) Bromphenolblau			
2% (v/v) β - Mercaptoethanol			

* nicht-reduzierender Probenpuffer wurde ohne Verwendung von β -Mercaptoethanol hergestellt

2.2.4.10 Western Blot

Für die selektive Detektion von Proteinen wurden nach der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese Western Blots durchgeführt. Der Transfer erfolgte nach dem *semi dry*-Verfahren auf Nitrocellulose-Membranen. Hierfür wurden die Membranen zusammen mit sechs Whatman-Filterpapierblättern auf Größe des SDS-Gels zugeschnitten und 10 min in Transferpuffer inkubiert. Membran und Gel wurden zwischen je drei Filterpapier-Schichten luftblasenfrei zwischen Anode und Kathode gelegt. Der Transfer erfolgte bei Raumtemperatur für 1,5 h bei einer angelegten Stromstärke von 1 mA/cm². Der Erfolg der Übertragung wurde durch Anfärben der Membran mit Ponceau-Rot-Lösung überprüft. Anschließend erfolgte die Absättigung der Membran durch Inkubation in Blockierungspuffer über Nacht bei 4°C. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Vor und nach der Inkubation mit den jeweiligen Antikörpern wurde die Membran je fünf Mal 5 min mit PBST gewaschen. Die Inkubationszeit mit den Antikörpern betrug 2 h für den primären und 1 h für den sekundären Antikörper.

Zur Detektion wurden die Detektionslösungen I und II frisch zu gleichen Teilen gemischt und auf die Membran gegeben (ca. 1 ml je 30 cm² Membranfläche). Unter Lichtausschluss wurde die Membran ca. 1 min inkubiert und anschließend ein licht-sensitiver Film aufgelegt. Nach photochemischer Reaktion für 1-5 min wurde der Film mit den Entwicklungsreagenzien entwickelt und fixiert.

Sollte eine Membran mit verschiedenen primären Antikörpern dekoriert werden, so wurde sie zunächst vollständig von der Antikörper-Dekoration befreit. Dazu wurde die Membran mit *Stripping*-Puffer überschichtet und 1 h bei 50°C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde sie zwei Mal mit PBST gewaschen und vor der Inkubation mit den Antikörpern erneut mit Blockierungspuffer behandelt.

<u>Transferpuffer</u>	<u>Blockierungspuffer</u>	<u>Antikörper-Verdünnungspuffer</u>
20 mM Tris/HCl, pH 8,5	PBS	PBS
150 mM Glycin	0,1% (v/v) Tween-20	0,1% (v/v) Tween-20
20 % (v/v) Methanol	5% (w/v) Milchpulver	2,5% (w/v) Milchpulver
0,05% (w/v) SDS		
<u>PBST</u>	<u>Detektionslösung I</u>	<u>Detektionslösung II</u>
PBS	100 mM Tris/HCl, pH 8,5	100 mM Tris/HCl, pH 8,5
0,1% (v/v) Tween-20	396 µM Cumarinsäure	0,02% (v/v) H ₂ O ₂
	2,5 mM Luminol	

<u>Ponceau-Rot-Lösung</u>	<u>Stripping-Puffer</u>
2% (w/v) Ponceau S	100 mM NaOH
3% (w/v) TCA	2% (w/v) SDS

2.2.4.11 Aufkonzentrieren von Proteinlösungen

2.2.4.11.1 Aufkonzentrieren mittels Cross Flow-Filtration

Renaturierungsansätze wurden nach Abschluss der Renaturierung um den Faktor 5 (von 1 l auf ca. 200 ml) aufkonzentriert. Dazu wurde eine *CrossFlow*-Filtrationseinheit (Vivaflow[®] 200) verwendet. Die Proteinlösung blieb stets auf 4°C temperiert.

2.2.4.11.2 Aufkonzentrieren mittels Amicon[®]-Rührzelle

Bereits gereinigte Proteinlösungen von nicht mehr als 150 ml Ausgangsvolumen wurden mittels Amicon[®]-Rührzelle bei einem angelegten Stickstoff-Druck von 1,5 bar auf ca. 1-2 mg/ml aufkonzentriert.

2.2.4.11.3 Proteinfällung durch NaDOC/TCA (Arnold und Ulbrich-Hofmann, 1999)

Mit Hilfe dieser Methode wurden Proben aus Renaturierungsansätzen aufkonzentriert und so für die SDS-PAGE aufbereitet. Dazu wurde 0,5-1 ml der Proteinlösung mit $\frac{1}{10}$ des Ausgangsvolumens einer 1%igen NaDOC-Lösung sowie $\frac{1}{5}$ des Ausgangsvolumens einer 50%igen TCA-Lösung versetzt und gründlich durchmischt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (15 min, 4°C, 13000 rpm an einer Tischzentrifuge) abgetrennt, in kaltem Aceton gewaschen und anschließend in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Proben, die GdmCl enthielten, wurden vor der Auftrennung mittels SDS-PAGE auf diese Weise entsalzt.

2.2.5 Spektroskopische Methoden

2.2.5.1 UV-Spektroskopie

Die UV-Spektroskopie wurde eingesetzt um die Proteinkonzentration zu bestimmen und die Qualität einer Proteinlösung abzuschätzen. Dazu wurden Absorptionsspektren zwischen 240 und 340 nm aufgenommen. Die Absorption bei 280 nm wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz herangezogen.

$$A_{280} = \epsilon_{280} \times c \times d$$

A_{280}	Absorption bei 280 nm
ϵ_{280}	molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm ($M^{-1} \times cm^{-1}$)
c	Proteinkonzentration (M)
d	Schichtdicke (cm)

Eine Verschiebung des Absorptionmaximums zu 260 nm deutet auf eine Verunreinigung mit Nukleinsäuren hin. Eine deutliche Absorption bei 320 nm und höheren Welllängen ist ein Hinweis auf Proteinaggregate. Die molaren Absorptionskoeffizienten wurden mit Hilfe des *ExPASy Proteomics Servers* des *Swiss Institute of Bioinformatics* SIB berechnet und sind in Tabelle 8.1 im Anhang (Seite 125) zusammengefasst.

2.2.6 Zellkultur-Techniken

Alle Arbeiten zur Kultivierung der verwendeten Zelllinien wurden an einer Sterilbank durchgeführt. Die verwendeten Lösungen und Puffer wurden (mit Ausnahme der Proteinlösungen) entweder vom Hersteller steril geliefert, autoklaviert oder steril filtriert. FBS, Antibiotikallösungen und TE-Lösung wurde aliquotiert und bis zur Verwendung bei $-20^{\circ}C$ gelagert. Zellkulturmedien wurden frisch mit den einzelnen Komponenten supplementiert und $4^{\circ}C$ aufbewahrt. Alle Puffer und Medien wurden vor der Benutzung auf $37^{\circ}C$ temperiert.

2.2.6.1 Kultivierung mammalischer Zellen

Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien erfolgte in einem Brutschrank bei $37^{\circ}C$, 5% CO_2 -Atmosphäre und 95% Luftfeuchtigkeit. In regelmäßigen Abständen wurden die kultivierten Zellen auf Kontamination mit Mycoplasmen hin überprüft. Eine solche Kontamination musste in jedem Fall ausgeschlossen werden, da bekannt ist, dass Mycoplasmen verschiedene Signalwege beeinflussen können (Rottem und Barile, 1993). Das Volumen an Medium betrug in 25 cm^2 Zellkulturflaschen 5 ml, in 75 cm^2 Zellkulturflaschen 20 ml. Die Myoblasten-Zelllinie C2C12 wurde in RPMI 1640-Medium kultiviert, die Zelllinie b/C3T3 in DMEM. Beiden Medien wurde vor Benutzung zur Kultivierung der Zellen 10% (v/v) FBS und eine Antibiotikallösung in 1:100-Verdünnung zugesetzt. Zur Inkubation der Zellen mit den Wachstumsfaktoren wurde die Serumkonzentration im Medium auf 2% (v/v) FBS reduziert, um eine Differenzierung zu erleichtern. Zur Unterscheidung werden nachfolgend die Bezeichnungen Kultivierungsmedium und Differenzierungsmedium gebraucht.

2.2.6.2 Passagierung von adhärennten Zellen

Für die meisten Zelllinien wird eine konstante Konzentration an FBS während der Kultivierung empfohlen. Eine zu hohe Zelldichte kann dagegen zu Nährstoffmangel und Anreicherung von toxischen Stoffwechselprodukten führen. Außerdem wirken Zell-Zell-Kontakte insbesondere bei nicht-ausdifferenzierten Zellen als Differenzierungsinduktoren.

Das Splitten erfolgte bei C2C12-Zellen und b/C3T3-Zellen bei ca. 70% Konfluenz. Zunächst wurde der Kulturüberstand abgesaugt und die Zellen in PBS gewaschen, um den im Medium enthaltenen Trypsin-Inhibitor vollständig zu entfernen. Durch TE-Lösung (1 ml pro 25 cm² Zellkulturflasche bzw. 3 ml pro 75 cm² Zellkulturflasche) wurden die Zellen vom Gefäßboden abgelöst. Dieses Ablösen kündigt sich zunächst durch Abrunden der Zellkörper an und wurde unter dem Mikroskop verfolgt. Nach dem nahezu vollständigen Abrunden der Zellen, aber noch vor dem Ablösen, wurde die TE-Lösung abgesaugt und die Zellen mit frischem Medium abgespült. Ein Teil der Zellsuspension wurde zur weiteren Kultivierung in eine neue, mit Kultivierungsmedium vorbereitete Zellkulturflasche gegeben. Auf diese Weise wurden die Zellen bis maximal zur 15. Passage geführt, bevor auf eine neue Kryokultur zurückgegriffen wurde.

2.2.6.3 Anlegen und Auftauen von Kryokulturen

Das Anlegen von Kryokulturen dient der längerfristigen Konservierung von Zellen in flüssigem Stickstoff. Da Zellen sich durch häufiges Passagieren verändern können, ist darauf zu achten, dass hierfür Zellen in einem möglichst frühen Kultivierungsstadium verwendet werden.

Zunächst wurden die Zellen, wie unter Abschnitt 2.2.6.2 beschrieben, gewaschen und trypsiniert. Die Zellen wurden dann in reinem FBS aufgenommen, die Zelldichte bestimmt und mit FBS auf $1,2-1,5 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ eingestellt. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 10% DMSO (v/v) gemischt und zu je 1 ml in Kryoröhrchen aliquotiert. Das Einfrieren erfolgte über Nacht bei -80°C. Die Abkühlrate von 1 K/min wurde dabei durch Benutzung eines Abkühlcontainers mit Isopropanol gewährleistet. Danach wurden die Kryokulturen in einen Kryotank mit flüssigem Stickstoff überführt.

Zum Wiederauftauen wurde ein Röhrchen aus dem Stickstoff-Tank entnommen und zunächst die Schraubkappe um eine Vierteldrehung gelockert, um eventuellen Überdruck durch in das Röhrchen eingedrungenen Stickstoff zu vermeiden. Daraufhin wurden die Zellen in einem auf 37°C temperierten Wasserbad sehr schnell aufgetaut, und die Zellsuspension in eine mit Kultivierungsmedium vorbereitete Zellkulturflasche gegeben. Nach Anheften der Zellen an den Gefäßboden (nach ca. 4 h) wurde der Überstand abgesaugt und gegen frisches Kultivierungsmedium ersetzt, um das cytotoxische DMSO vollständig zu entfernen.

2.2.6.4 Alkalische Phosphatase (AP)-Assay

Der AP-Assay wurde als Aktivitätsassay für BMP-2 beschrieben (Kirsch *et al.*, 2000a). Der Test beruht auf der Transdifferenzierung der C2C12-Zelllinie von Myoblasten zu Osteoblasten nach Stimulation mit BMP-2, die anhand des Knochenmarker-Enzyms Alkalische Phosphatase verfolgt werden kann. Die Aktivität der AP wird am einfachsten mit Hilfe eines chromogenen Substrates wie *para*-Nitrophenylphosphat bestimmt. Die durch die AP katalysierte Reaktion ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

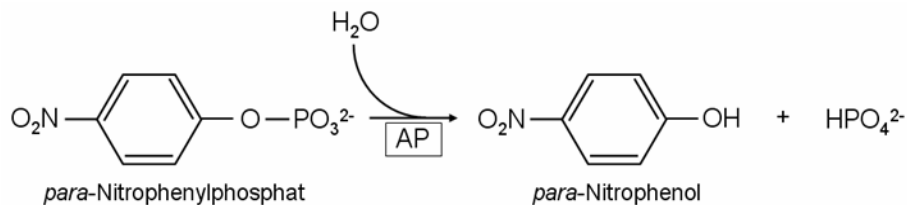


Abbildung 2.2. Katalysierte Reaktion der Alkalischen Phosphatase im AP-Assay. Die alkalische Hydrolyse des artifiziellen Phosphatester-Substrates *p*-Nitrophenylphosphat führt zur Bildung des bei 405 nm photometrisch detektierbaren Produktes *p*-Nitrophenol.

2.2.6.4.1 Standard-AP-Assay

C2C12-Zellen wurden mit einer Zelldichte von $1,5 \times 10^3$ Zellen pro *well* in eine 96-*multiwell*-Zellkulturplatte ausgesät. Dazu wurde Kultivierungsmedium vorgelegt, so dass ein Gesamtvolumen von 150 $\mu\text{l/well}$ erreicht wurde. Nach dem Anheften der Zellen an den Gefäßboden nach ca. 4 h wurde das Kultivierungsmedium gegen 200 $\mu\text{l/well}$ Differenzierungsmedium ausgetauscht, das mit den Wachstumsfaktoren supplementiert war. In jedem Versuch wurden außerdem Negativkontrollen ohne Wachstumsfaktoren mitgeführt. Vier Tage nach Beginn der Stimulation wurde der Kulturüberstand abgesaugt, die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen und in 100 $\mu\text{l/well}$ Lysepuffer unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur für 2 h lysiert. Jeweils 20 μl des Zelllysates wurden für die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration sowie für die Bestimmung der AP-Aktivität in neue 96-*multiwell*-Platten überführt.

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration erfolgte mittels BCA-Assay-Kit nach Herstellerangaben und diente der Bestimmung der spezifischen Aktivität. Als Referenz zur Berechnung wurde eine Eichgerade von 0-350 $\mu\text{g/ml}$ BSA genutzt. Die Messung der AP-Aktivität erfolgte durch Aufnahme der Kinetik der Substratumsetzung bei 405 nm und 37°C über 30 min mit einem Messpunkt je 15 sec. Dazu wurde zum Zelllysate 180 $\mu\text{l/well}$ Substratlösung pipettiert und die Messung sofort gestartet. Der lineare Signalanstieg pro Messintervall ($\Delta E \times \text{min}^{-1}$) wurde anschließend mit der Gesamtproteinkonzentration (in μg)

verrechnet und gegen die Konzentration an Wachstumsfaktor, das dem Differenzierungsmedium zugesetzt war, aufgetragen.

<u>AP-Puffer</u>	<u>Lysepuffer</u>	<u>Substratlösung</u>
100 mM Glycin/Na ⁺ , pH 9,6	100 mM Glycin/Na ⁺ , pH 9,6	100 mM Glycin/Na ⁺ , pH 9,6
1 mM MgCl ₂	1 mM MgCl ₂	1 mM MgCl ₂
1 mM ZnCl ₂	1 mM ZnCl ₂	1 mM ZnCl ₂
	1% (v/v) Nonidet P40	9 mM <i>p</i> -Nitrophenylphosphat

Zur Untersuchung von Wechselwirkungen wurde BMP-2 vor der Induktion der Zellen mit anderen Proteinen vorinkubiert. Die Vorinkubation erfolgte eine Stunde bei Raumtemperatur in 10fach höherer Konzentration, als für die Induktion der Zellen benötigt wurde. Anschließend wurden die Proteinlösungen 1:10 in Differenzierungsmedium verdünnt zur Induktion der Zellen eingesetzt.

Zur Berechnung der mittleren effektiven Konzentration (EC₅₀) von BMP-2 wurde ein sigmoider Kurvenverlauf nach folgender allgemeiner Formel zu Grunde gelegt:

$$y = a (1 - e^{-bx})^c$$

2.2.6.4.2 Langzeit-Stimulation mit proBMP-2

Zur Überprüfung des Einflusses von proBMP-2 auf C2C12-Zellen wurde in diesem Versuch der Zeitrahmen des Standard-AP-Assays erweitert. Während einer Passagierung wurden C2C12-Zellen mit einer Zelldichte von 5×10^3 Zellen/*well* in einem Volumen von 500 μ l/*well* Kultivierungsmedium in mehrere 24-*multiwell*-Platten ausgesät. Nach Anheften der Zellen wurde nach ca. 4 h das Kultivierungsmedium gegen 500 μ l/*well* Differenzierungsmedium, das mit 200 nM proBMP-2 supplementiert war, ausgetauscht. Kontroll-Zellen, die ohne den Wachstumsfaktor kultiviert wurden, dienten als Negativkontrolle. Nach Zeitpunkten bis zu elf Tagen nach Beginn der Stimulation wurden die Zellen jeweils einer *multiwell*-Platte in PBS gewaschen und mit 200 μ l/*well* Lysepuffer lysiert. Das Lysat wurde bis zur gemeinsamen Bestimmung der Proben aller Zeitpunkte bei -20°C gelagert. Die Bestimmung der AP-Aktivität und der Gesamtproteinkonzentration erfolgte analog dem für den Standard AP-Assay beschriebenen Protokoll.

2.2.6.5 Proliferationstest

Der Proliferationstest beruht auf dem Einbau des Pyrimidin-Analogons 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU) in die DNA von sich teilenden Zellen und anschließendem spezifischen Nachweis mit Hilfe eines Peroxidase-konjugierten BrdU-Antikörpers. Die POD katalysiert die

Bildung des blaugrünen TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) aus der Leukoform TMBH₂ (4,4'-Diaminodiphenyl) unter Einfluss von Wasserstoffperoxid (Abbildung 2.3)

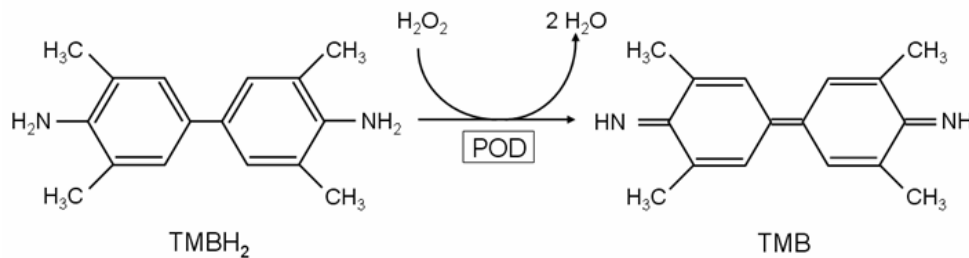


Abbildung 2.3. Nachweisreaktion des BrdU-Proliferationstests. Die POD katalysiert die Umsetzung der aromatischen Verbindung TMBH₂ zu dem photometrisch detektierbaren Diimin TMB.

C2C12-Zellen wurden zu einer Zelldichte von 2×10^3 Zellen/well in eine 96-*multiwell*-Platte ausgesät. Nach dem Anheften der Zellen über Nacht wurde das Kultivierungsmedium gegen 200 μ l/well Differenzierungsmedium ausgetauscht, das mit den Wachstumsfaktoren supplementiert war. Nach vier Tagen Inkubation wurden die Zellen für 2 h mit BrdU behandelt. BrdU wird von den Zellen aufgenommen und in phosphorylierter Form an Stelle von Desoxythymidintriphosphat (dTTP) in neu synthetisierte DNA proliferierender Zellen eingebaut. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe von POD-konjugierten BrdU-Antikörpern nach Zugabe der Substratlösung. Alle Arbeitsschritte erfolgten entsprechend Herstellerangaben. Die Auswertung wurde ohne Einsatz der *stop solution* mittels ELISA *plate reader* durch Bestimmung der Lichtabsorption bei 370 nm durchgeführt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle für die Bestimmung.

2.2.6.6 Cytotoxizitätstest

Als Cytotoxizität wird die Eigenschaft von Substanzen bezeichnet, Zellen direkt zu schädigen bzw. die Zellyse auszulösen. Die Quantifizierung einer cytotoxischen Wirkung der zugesetzten Substanzen erfolgt durch Bestimmung der Aktivität der Lactat-Dehydrogenase (LDH), die von Zellen mit beschädigter Membran ins Medium abgegeben wird. Der Nachweis erfolgt durch einen zweistufigen enzymatischen Test (Abbildung 2.4). Im ersten Reaktionsschritt wird NAD⁺ zu NADH/H⁺ im Zuge der LDH-katalysierten Umwandlung von Lactat zu Pyruvat reduziert. Der nachgeschaltete zweite Reaktionsschritt wird von der Diaphorase katalysiert und beinhaltet die Reduktion eines Tetrazolium-Salzes zu dem entsprechenden Formazan-Salz mit Hilfe des Reduktionsäquivalents NADH/H⁺. Die Entstehung an Formazan-Salz ist dabei direkt proportional zur freigesetzten Menge an LDH und kann colorimetrisch bei 500 nm detektiert werden.

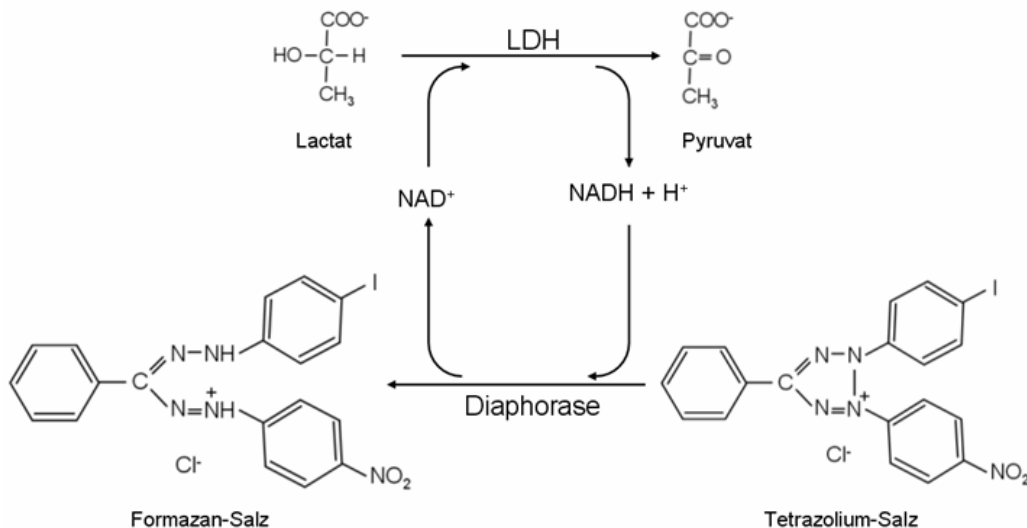


Abbildung 2.4. Reaktionsschema, das dem Cytotoxizitätstest zugrunde liegt. Die Lactat-Dehydrogenase (LDH) wird von Zellen mit beschädigter Membran ins Medium abgegeben. Alle sonstigen Komponenten sind im Reaktionsgemisch enthalten.

Im Zuge einer Passagierung wurden C2C12-Zellen bei einer Zelldichte von 5×10^3 Zellen/*well* in eine 96-*multiwell*-Platte ausgesät. Nach dem Anheften der Zellen über Nacht wurde das Kultivierungsmedium gegen $100 \mu\text{l}/\text{well}$ Differenzierungsmedium ausgetauscht. Dieses war mit den Wachstumsfaktoren supplementiert. Da LDH im Kulturüberstand eine relativ geringe Halbwertszeit hat, wurde die LDH-Freisetzung 6 h nach Beginn der Stimulation bestimmt. Die zugrunde liegende Reaktion ist relativ anfällig für Störungen, daher wurden Kontrollen entsprechend Herstellerangaben mitgeführt. Die Inkubationszeit mit dem Reaktionsgemisch betrug 30 min. Mittels ELISA *plate reader* wurde anschließend die Absorption bei 492 nm bestimmt.

2.2.6.7 Apoptose-Assay

Der im Rahmen der Arbeit verwendete Apoptose-Test beruht auf dem spezifischen Nachweis von Caspase-3 auf Basis der katalysierten Hydrolyse eines *p*-Nitroanilid-Derivates. Das Spaltprodukt *p*-Nitroanilin ist photometrisch nachweisbar. Die Effektorcaspase 3 ist für die Bestimmung besonders geeignet, da sie von allen Caspasen über den längsten Zeitraum nachweisbar ist.

Während einer Passagierung wurden C2C12-Zellen mit einer Zelldichte von $1,5 \times 10^3$ Zellen pro *well* in einem Volumen von $150 \mu\text{l}/\text{well}$ Kultivierungsmedium in eine 96-*multiwell*-Zellkulturplatte ausgesät. Nachdem sich die Zellen nach ca. 4 h angeheftet hatten, wurde das Kultivierungsmedium gegen $200 \mu\text{l}/\text{well}$ Differenzierungsmedium ausgetauscht, das mit den Wachstumsfaktoren supplementiert war. In jedem Versuch wurden außerdem

Negativkontrollen ohne Wachstumsfaktoren mitgeführt. Als Positivkontrolle wurden Zellen mit 500 nM Staurosporin behandelt, um die Apoptose auszulösen. Die Auswertung erfolgte 8 h nach der Induktion mit den Wachstumsfaktoren. Dazu wurden die Zellen gemäß dem Herstellerprotokoll lysiert. Aliquots von 5-15 µl der Lysate wurden mit dem Substrat inkubiert. Die Quantifizierung erfolgte mittels einer Eichreihe von 10-200 µM *p*-Nitroanilin.

2.2.6.8 Test auf Internalisierung von proBMP-2 und BMP-2

C2C12-Zellen wurden mit einer Zelldichte von 5×10^3 Zellen pro *well* in einem Volumen von 500 µl pro *well* in 4- oder 24-*multiwell*-Zellkulturplatten ausgesät. Nach Anheften der Zellen über Nacht wurde das Kultivierungsmedium mit dem gleichen Volumen Differenzierungsmedium ersetzt, das mit 200 nM BMP-2 oder proBMP-2 versetzt war. Zu Zeitpunkten zwischen 30 min und 5 Tagen nach Induktion wurden Proben entnommen. Dazu wurde der Kulturüberstand abgenommen und die Zellen zwei Mal mit jeweils 200 µl pro *well* PBS gewaschen. Um die an die Zelloberfläche oder Gefäßwandung gebundenen Wachstumsfaktoren zu entfernen, wurden die Zellen mit 100 µl pro *well* 100 mM Na-Citrat-Puffer, pH 4,0 behandelt. Danach erfolgte ein weiterer Waschschriff mit zwei Mal je 200 µl pro *well* PBS. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl pro *well* SDS-Probenpuffer (nicht-reduzierend) lysiert. Proben der Kulturüberstände, der Citrat-Waschschriffe sowie der Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western Blot mit BMP-2-Antikörpern analysiert. Zur Ladekontrolle wurden die aufgetrennten und auf Nitrocellulose-Membranen übertragenen Proben der Kulturüberstände mit Ponceau-Rot-Lösung behandelt, um das im Medium enthaltene Serum-Albumin anzufärben. Für die Membranen der Lysat-Proben wurde die Ladekontrolle mittels Detektion mit β -Actin-Antikörpern durchgeführt.

Zur Inhibierung der Endocytose wurde das Differenzierungsmedium mit 15 µM Chlorpromazin oder 40 µM Dynasore versetzt. Die Wachstumsfaktoren wurden nach 30 min Inkubation der Zellen mit den Inhibitoren zugegeben. Dabei wurde eine Konzentration von 20 nM verwendet. Die Probenahme erfolgte 1 und 4 h nach Beginn der Inkubation mit den Wachstumsfaktoren. Dazu wurden die Zellen, wie beschrieben, mit PBS und Na-Citrat-Puffer, pH 4,0 gewaschen und anschließend lysiert. Die Analyse der Lysat-Proben erfolgte mittels Western Blot mit anti-rhBMP-2-Antikörpern; zur Ladekontrolle wurden GAPDH-Antikörper verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Rekombinante Herstellung von proBMP-2

3.1.1 Herstellung des Expressionskonstruktes für proBMP-2

Die rekombinante Herstellung von proBMP-2 in *E.coli* war bisher nur in Form eines Fusionsproteins mit N-terminalem His₆-tag gelungen. Der His₆-tag wurde zwar nicht zur Aufreinigung des Proteins genutzt, jedoch konnte für proBMP-2 in tag-freier Variante in *E. coli* keine Expression beobachtet werden. Für die biophysikalische Charakterisierung des Proteins (Hillger *et al.*, 2005) oder für Studien zur Rezeptorbindung (Hauger *et al.*, 2009) war die Anwesenheit eines His₆-tag nicht hinderlich. Dagegen ist die Anwendung „getaggeter“ Proteinvarianten in präklinischen und klinischen Studien fehlerbehaftet. Eine nachträgliche Abspaltung des tags durch Thrombin- oder Bromcyanspaltung kam nicht in Frage. Thrombin besitzt mehrere Spaltstellen im Protein; die Verwendung von Bromcyan zur Spaltung bedeutet gleichzeitig die Verwendung eines toxischen Reagenzes, das zu Problemen führen kann. Außerdem ist die nachträgliche Abspaltung neben dem erhöhten Zeitaufwand auch mit einer Verminderung der Ausbeute an Protein verbunden, und sollte daher insbesondere in Hinblick auf eine industrielle Produktion des Proteins vermieden werden. Aus diesem Grund bestand eine wichtige Aufgabe darin, ein Expressionskonstrukt für proBMP-2 herzustellen, das die rekombinante Produktion des authentischen Proteins in *E. coli* ermöglichte.

Dazu wurden im 5'-Bereich der codierenden Sequenz von proBMP-2 stille Mutationen eingeführt. Durch eine solche Vorgehensweise konnte bereits für die Produktion der humanen Glutathion-S-Transferase (GST) durch heterologe Expression in *E. coli* eine Verbesserung der Ausbeute erreicht werden (Widersten *et al.*, 1996). Insgesamt wurden sechs Nukleotide in wobble-Positionen ausgetauscht. Die Aminosäure-Sequenz blieb unverändert (Abbildung 3.1).

Nukleotid-Sequenz	
mRNA	5'- ... GGC GCG GCT GGC CTC GTT CCG GAG ...
verändert	5'- ATG GGT GCA GCA GGT CTT GTG CCG GAG ...
Aminosäure-Sequenz	Met Gly Ala Ala Gly Leu Val Pro Glu ...

Abbildung 3.1. Codierende Sequenz der proBMP-2-mRNA in Gegenüberstellung zur veränderten Nukleotid-Sequenz im Expressionsvektor. Die ausgetauschten Basen sind rot gekennzeichnet.

3.1.2 Heterologe Genexpression und Reinigung von proBMP-2

Die veränderte codierende Sequenz für proBMP-2 wurde in den Expressionsvektor pET 11a inseriert, der in *E. coli* die rekombinante Expression als authentisches Protein ermöglicht. Abbildung 3.2 belegt die heterologe Expression von proBMP-2. Die Expression im Schüttelkolben ergab ca. 3,2-3,5 g Zellfeuchtmasse je l LB-Medium. Bei Fermentation wurden ca. 150 g Zellfeuchtmasse je l Medium erhalten. Aus der Zellfeuchtmasse konnten ca. 100-200 mg IB-Material je g isoliert werden, wovon ca. 35% IB-Protein darstellten.

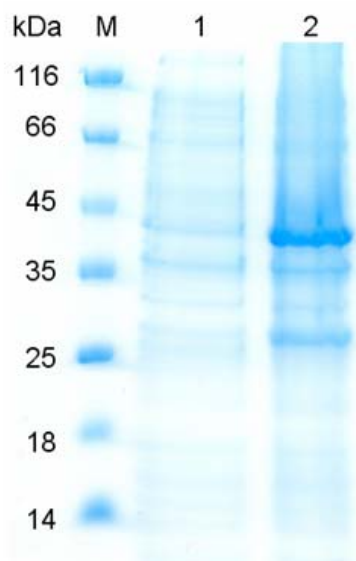


Abbildung 3.2.

Heterologe Expression von proBMP-2 in *E. coli* BL21 (DE3) pUBS 520. (M) Marker, (1) vor Induktion, (2) 4 h nach Induktion der Expression.

Die Reinigung von proBMP-2 erfolgte zunächst nach dem durch Frank Hillger im Rahmen seiner Dissertation erarbeiteten Protokoll (Hillger *et al.*, 2005). Allerdings wies das Protein nachfolgend eine Kontamination mit Endotoxinen von >50 EU/ml auf. Im Hinblick auf Zellkulturversuche mit mammalischen Zelllinien, aber auch auf präklinische Studien mit dem Protein war eine Abreinigung der Kontamination notwendig. Die Verwendung von kommerziell erhältlichen Säulen zur Entfernung von Endotoxinen aus der Lösung des gereinigten proBMP-2 führte zu Verlusten von bis zu 80%. Die Abreinigung der Endotoxine gelang mittels Kationenaustauschchromatographie. Dabei erwies sich als Säulenmaterial Carboxymethyl (CM)-Sepharose als optimal, da nach diesem Chromatographieschritt keine Endotoxin-Kontamination mehr nachweisbar war und auch die Verluste an proBMP-2 mit ca. 10-20% relativ gering gehalten werden konnten. Die Quantifizierung des Endotoxin-Gehalts in den Proteinlösungen nach dem Chromatographieschritt in verschiedenen Proteinpräparationen ergab Werte von <0,05 bis 0,2 EU/ml. Das so aufbereitete proBMP-2 war somit für die Verwendung in Zellkulturversuchen geeignet.

3.2 Optimierung der *in vitro*-Rückfaltung von proBMP-2 und BMP-2

BMP-2 und proBMP-2 sind therapeutisch relevante Proteine. Auf der schnellen und kostengünstigen Produktion der Proteine liegt daher ein besonderes Interesse. Die rekombinante Expression von BMP-2 in *E. coli* ist gegenüber der eukaryotischen Produktion vor allem aufgrund der geringen Produktionskosten und hohen Ausbeute oft die Methode der Wahl. Allerdings muss das prokaryotisch gewonnene Protein *in vitro* oxidativ renaturiert werden, da sich die Disulfid-Brücken im reduzierenden Cytosol der Wirtszellen nicht ausbilden können. Ein in der Arbeitsgruppe etabliertes Protokoll beinhaltete einen Zeitraum für die Rückfaltung von bis zu 14 Tagen (Hillger *et al.*, 2005). Derart lange Inkubationszeiten sind im industriellen Maßstab mit hohen Kosten verbunden und sollten daher vermieden werden. Das Protokoll für die *in vitro*-Rückfaltung galt es also hinsichtlich der benötigten Zeit sowie der Ausbeute an nativem Protein zu optimieren.

3.2.1 Optimierung des Faltungspuffers

Zunächst wurden Renaturierungspuffer in Betracht gezogen, die bereits für die Rückfaltung von BMP-2 oder anderen Proteinen der BMP-Familie publiziert waren (Hillger *et al.*, 2005; Honda *et al.*, 2000; Long *et al.*, 2006; Vallejo und Rinas, 2004). Um die verschiedenen Protokolle miteinander vergleichen zu können, wurde als Ausgangsmaterial reduziertes IB-Protein von BMP-2 in Solubilisierungspuffer (siehe 2.2.4.2, Seite 43) mit einer Konzentration von 25 mg/ml verwendet. Von den getesteten Bedingungen resultierte allerdings nur die Verwendung der Puffer nach Hillger *et al.*, 2005 und Vallejo und Rinas, 2004 in der Ausbildung dimerer Proteinspezies. Die Zusammensetzung dieser beiden Renaturierungspuffer ist in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.1. Zusammensetzung der Renaturierungspuffer nach Hillger *et al.*, 2005 und Vallejo und Rinas, 2004

(Hillger <i>et al.</i> , 2005)	(Vallejo und Rinas, 2004)
100 mM Tris/HCl pH 8,3	50 mM Tris/HCl, pH 8,5
1 M L-Arginin	750 mM CHES
5 mM Na-EDTA	5 mM Na-EDTA
5 mM GSSG	550 mM GdmCl
2 mM GSH	1 mM GSSG
	2 mM GSH
50 µg/ml IB-Protein	100 µg/ml IB-Protein

In beide Renaturierungspuffer werden als Puffersystem Tris/HCl und Glutathion in reduzierter (GSH) und oxidiert Form (GSSG) als Redoxpaar verwendet. Der schwach basische pH-Wert von 8,3 bzw. 8,5 ermöglicht die Entstehung von Thiosulfat-Anionen, die während der Ausbildung von Disulfid-Brücken die reaktive Spezies darstellen. Als Additive zur Unterstützung der Faltung werden L-Arginin bzw. CHES verwendet. Von L-Arginin ist bekannt, dass es die Proteinaggregation unterdrücken kann (Bajorunaite *et al.*, 2007; Tsumoto *et al.*, 2005). Gleiches wurde für CHES bei der Rückfaltung von BMP-2 aus IB-Material beobachtet (Vallejo und Rinas, 2004). Ein großer Unterschied besteht in der Verwendung von GdmCl. Während GdmCl beim Faltungspuffer nach Hillger *et al.*, 2005 lediglich in geringen Mengen von maximal 50 mM durch Einbringen des solubilisierten IB-Proteins vorkommt, wird es im Puffer nach Vallejo und Rinas, 2004 in weit höherer Konzentration als Additiv verwendet.

Durch die Verwendung des Faltungspuffers nach Vallejo und Rinas, 2004 konnte für die Rückfaltung von BMP-2 in der Tat eine Verbesserung im Vergleich zum Puffer nach Hillger *et al.*, 2005. erreicht werden. Zum einen ermöglichte er mit 100 µg/ml eine doppelt so hohe Proteinkonzentration, zum anderen war die für die Dimerisierung benötigte Zeit reduziert. Bereits nach sechs Tagen Inkubation bei 4°C wurde eine vergleichbare Menge an dimerer Proteinspezies erhalten wie mit dem Faltungspuffer nach Hillger *et al.*, 2005 erst nach zwölf Tagen (Abbildung 3.3).

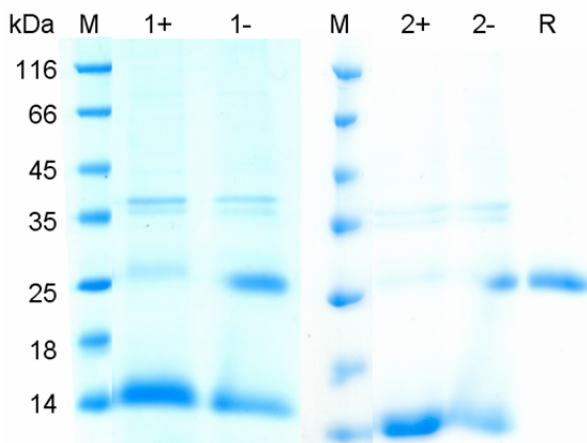


Abbildung 3.3.

Vergleich der Faltungseffizienz am Beispiel BMP-2. (1) Puffer nach Hillger *et al.*, 2005 nach 12 d Inkubation mit 50 µg/ml, (2) Puffer nach Vallejo *et al.*, 2004 nach 6 d Inkubation bei 100 µg/ml. M – Marker, R – gereinigtes BMP-2 als Referenz, (+) reduzierende Bedingungen, (-) nicht-reduzierende Bedingungen.

Allerdings war der Faltungspuffer nach Vallejo und Rinas, 2004 nicht auf die Faltung von proBMP-2 übertragbar und führte unmittelbar nach Zugabe des solubilisierten IB-Materials in den Renaturierungspuffer zu einer Präzipitation des reduzierten Proteins. Dies ist möglicherweise auf die geringere Stabilität der Pro-Domäne im Vergleich zum murenen Wachstumsfaktor zurückzuführen. Weder durch Eliminierung des destabilisierenden GdmCl aus der Pufferzusammensetzung noch durch Verringerung der eingesetzten Konzentration an IB-Protein auf 50 µg/ml konnte eine Präzipitation von proBMP-2 verhindert werden.

Aufgrund dieser Beobachtung wurde vermutet, dass nicht die Unterschiede in den verwendeten Additiven in den beiden Faltungspuffern, sondern die geringere Konzentration der Redoxkomponenten ausschlaggebend für die schnellere Dimerisierung war, die durch Verwendung des Puffers nach Vallejo und Rinas, 2004 erreicht werden konnte. Durch Reduktion der Konzentration an GSSG und GSH im Faltungspuffer nach Hillger *et al.*, 2005 auf je 100 μM konnte die Zeit, die für die Dimerisierung von sowohl BMP-2 als auch proBMP-2 benötigt wurde, deutlich verringert werden. Abbildung 3.4. zeigt repräsentativ die Rückfaltung von proBMP-2 aus IB-Material unter Verwendung des Faltungspuffers nach Hillger *et al.*, 2005 in Original-Zusammensetzung mit 2 mM GSH und 5 mM GSSG im Vergleich zum Faltungspuffer mit 100 μM GSSG und GSH. Zusätzlich zur Zeitersparnis um ca. fünf Tage und der verbesserten Faltungsausbeute an dimerer Spezies konnte außerdem die Konzentration an IB-Protein auf 200 $\mu\text{g/ml}$ erhöht werden, ohne dass eine Präzipitation erfolgte.

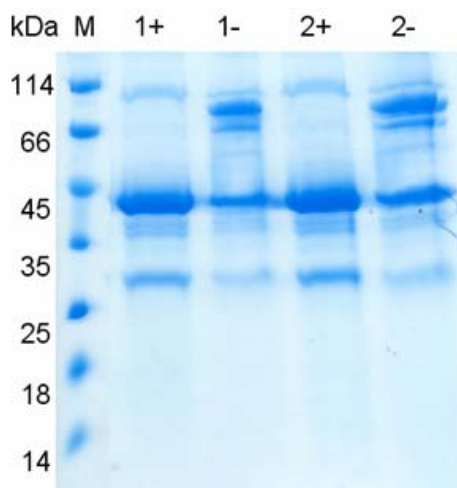


Abbildung 3.4.

Vergleich der Faltungseffizienz am Beispiel proBMP-2 bei Verwendung des Faltungspuffers nach Hillger *et al.*, 2005 (1) mit verringerter Konzentration GSSG und GSH nach 7 d Inkubation mit 100 $\mu\text{g/ml}$ IB-Protein, (2) mit Original-Zusammensetzung nach 12 d Inkubation mit 50 $\mu\text{g/ml}$ IB-Protein. M – Marker, (+) reduzierende Bedingungen, (-) nicht-reduzierende Bedingungen.

Die beträchtliche Reduzierung der Konzentration der Redoxkomponenten GSSG und GSH bedeutete außerdem eine Verringerung der Kosten für den Faltungspuffer. Allerdings sind acht Tage Dauer für die Rückfaltung im Hinblick auf industrielle Produktion des Proteins immer noch ein sehr langer Zeitraum. Nachfolgend wurde das Faltungsprotokoll optimiert, um die benötigte Zeit weiter zu reduzieren.

3.2.2 Optimierung des Faltungs-Protokolls: Etablierung des Zwei-Stufen-Protokolls für die Rückfaltung

Der Entwicklung des Zwei-Stufen-Protokolls für die Rückfaltung von BMP-2 und proBMP-2 lag die Annahme zugrunde, dass die intramolekularen Disulfidbrücken im Monomer relativ schnell gebildet werden können. Dagegen ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der

Reaktion wahrscheinlich die Ausbildung der intermolekularen Disulfidbrücke zur kovalenten Verknüpfung von zwei Monomeren. Das im Folgenden beschriebene Protokoll sah daher eine Trennung beider Reaktionsschritte vor. Hinsichtlich der Proteinkonzentration und der Konzentration des verwendeten Redoxsystems wurden Bedingungen gewählt, die entweder die Ausbildung des Cystin-Knotens (1. Reaktionsschritt) oder die Dimerisierung (2. Reaktionsschritt) begünstigten. Das Puffersystem selbst wurde nicht variiert und entsprach der Zusammensetzung, die sich für die Renaturierung von BMP-2 bereits als optimal erwiesen hatte. Für den 1. Reaktionsschritt sollte eine geringe Proteinkonzentration vorteilhaft sein, um die Wahrscheinlichkeit einer Proteinaggregation zu verringern, die eine Reaktion höherer Ordnung ist. Stattdessen begünstigt eine geringe Proteinkonzentration die Faltung der Monomere sowie die Ausbildung des intramolekularen Cystin-Knotens. Im 2. Reaktionsschritt sollte die Dimerisierung mit der Ausbildung der intermolekularen Disulfidbrücke durch hohe Proteinkonzentrationen stimuliert werden. Die beiden Reaktionsschritte sind in Abbildung 3.5 schematisch dargestellt.

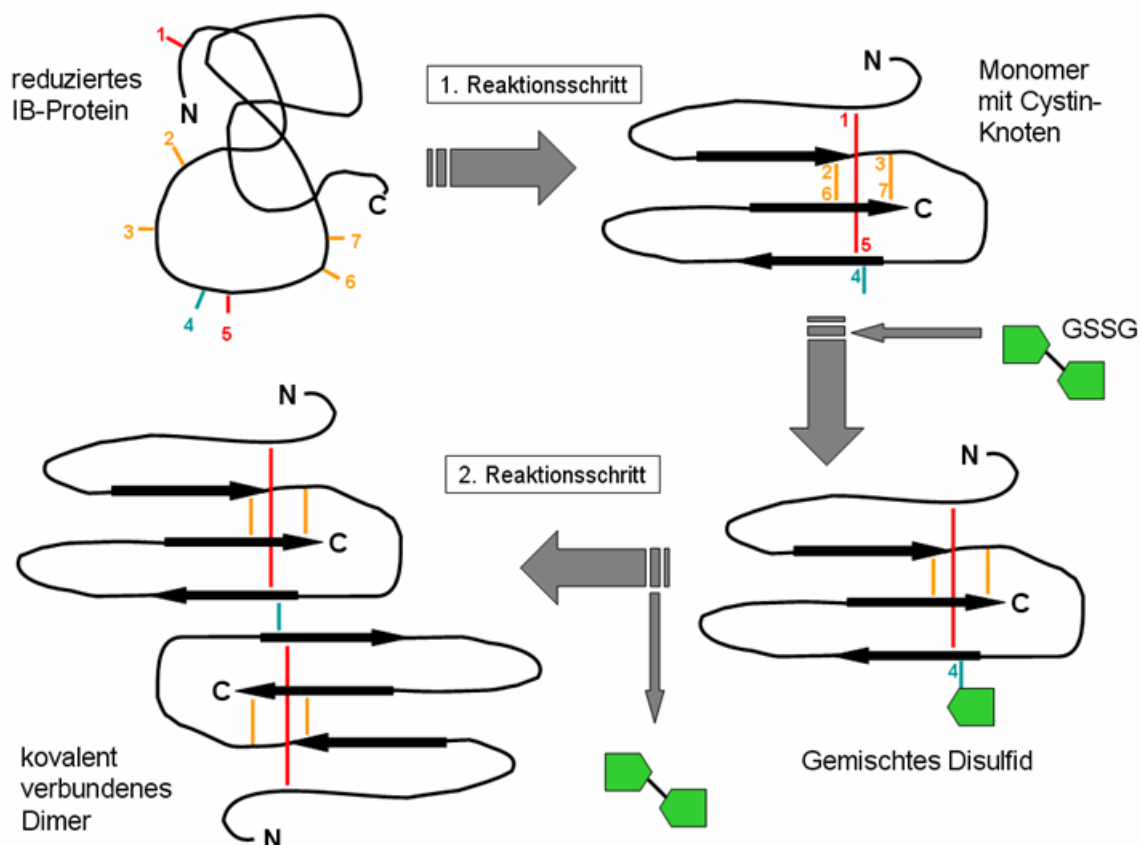


Abbildung 3.5. Rückfaltung nach dem Zwei-Stufen-Protokoll – Reaktionsschema

Für die oxidative Faltung der monomeren Spezies (1. Reaktionsschritt) wurde reduziert IB-Protein zu einer Endkonzentration von 200 µg/ml in den Renaturierungspuffer eingebracht und für 24 h bei 6°C und leichtem Rühren inkubiert. Anschließend wurde die

Proteinkonzentration im Faltungsansatz durch *Cross Flow*-Filtration (2.2.4.11) auf 1 mg/ml erhöht und die Komponenten des Redoxsystems durch Dialyse entfernt. Der Ansatz wurde geteilt. Während eine Hälfte bei 4°C gelagert wurde, wurde die andere Hälfte mit GSSG zu einer Endkonzentration von 25 mM versetzt und unter leichtem Rühren 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dadurch sollte die Bildung eines gemischten Disulfids aus Glutathion und monomerer Proteinspezies erleichtert werden. Das gemischte Disulfid stellt die aktivierte Form des monomeren Proteins dar. Nach Dialyse zur Entfernung von überschüssigem GSSG wurde dann im 2. Reaktionsschritt das aktivierte Monomer mit der bei 4°C gelagerten, anderen Hälfte des Faltungsansatzes inkubiert. Auf diese Weise konnte eine sehr schnelle Dimerisierung erreicht werden, die bereits nach 1h abgeschlossen war. Abbildung 3.6 beinhaltet eine Übersicht des experimentellen Ablaufs.

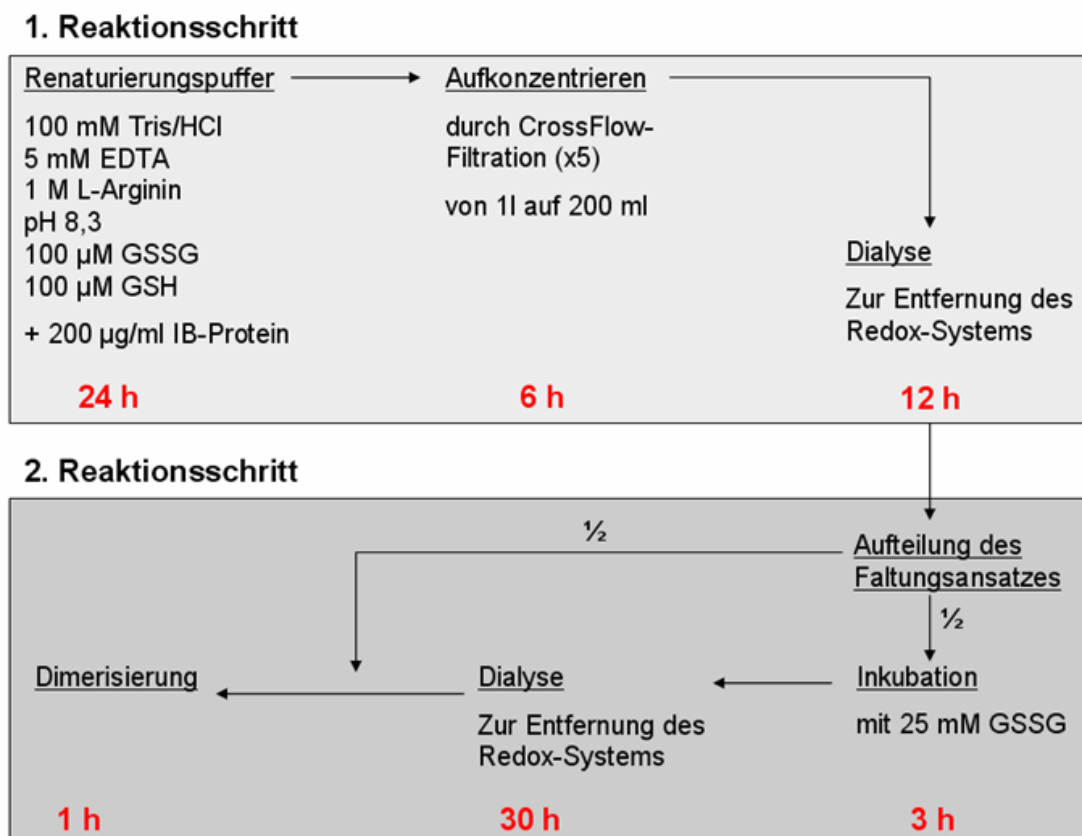


Abbildung 3.6. Rückfaltung nach dem Zwei-Stufen-Protokoll – Experimenteller Ablauf

Die oxidative Faltung wurde mittels SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen verfolgt (Abbildung 3.7). Die Probe, die nach Abschluss des 1. Reaktionsschritts entnommen wurde, zeigte bereits einen Anteil an dimerer Spezies von ca. 40-50% (Bahn 2). Diese Verbesserung im Vergleich zu dem Protokoll nach Hillger *et al.*, 2005 beruht auf der unter Abschnitt 3.2.1 (Seite 61) näher erläuterten Verringerung der Konzentration der

Redoxkomponenten GSSG und GSH von 5 bzw. 2 mM auf je 100 μ M, sowie auf der höheren Konzentration an IB-Protein im Faltungsansatz. Nach dem 2. Reaktionsschritt konnte das Verhältnis von monomerer und dimerer Spezies noch weiter zugunsten des Dimers verschoben werden, das nach Abschluss der Faltung nach dem Zwei-Stufen-Protokoll zu einem Anteil von mindestens 70% vorlag (Bahn 4 und 5). Durch Heparin-Affinitätschromatographie konnten nachfolgend monomere und dimere, native Spezies voneinander getrennt und homogenes BMP-2 erhalten werden (Bahn 6).

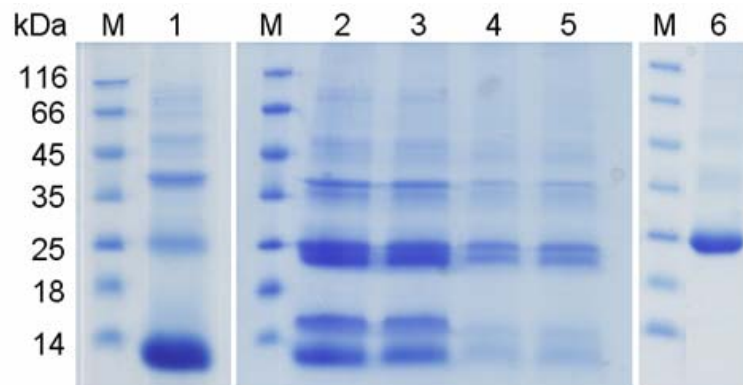


Abbildung 3.7. Renaturierung von BMP-2 nach dem Zwei-Stufen-Protokoll. (1) reduziertes IB-Protein, (2) Renaturierungsansatz nach dem 1. Reaktionsschritt, (3) GSSG-aktivierte Probe des Renaturierungsansatzes, (4) und (5) Probe der Dimerisierung im 2. Reaktionsschritt nach 30 bzw. 60 min, (6) mittels Heparin-Affinitätschromatographie gereinigtes BMP-2, (M) – Marker

Das mit Hilfe des Zwei-Stufen-Protokolls gewonnene BMP-2 wurde hinsichtlich seiner biologischen Aktivität mit konventionell renaturierten BMP-2 verglichen. Dazu wurde der AP-Assay mit C2C12-Zellen durchgeführt. Die BMP-2-induzierte AP-Aktivität des nach dem Zwei-Stufen-Protokoll rückgefalteten Wachstumsfaktors war vergleichbar mit der AP-Aktivität, die durch nach Hillger *et al.*, 2005 renaturiertes BMP-2 erhalten wurde (Abbildung 3.8). Ebenso waren keine Unterschiede in den Fern-UV-CD-Spektren der unterschiedlich renaturierten BMP-2-Fractionen erkennbar. Dies beweist zusätzlich die strukturelle Identität (Daten nicht gezeigt).

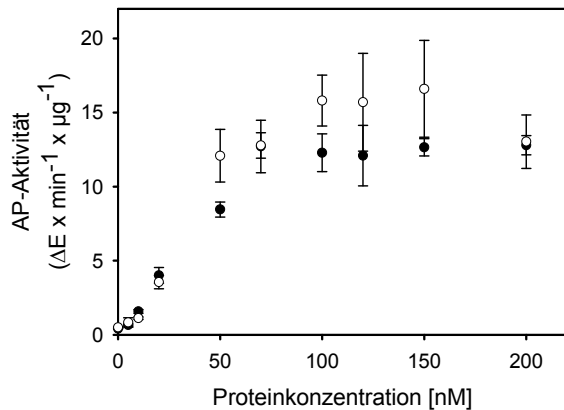


Abbildung 3.8.

Biologische Aktivität von BMP-2 bestimmt durch die Induktion der AP-Aktivität in C2C12-Zellen. Getestet wurde BMP-2, das nach dem Protokoll nach Hillger et al., 2005 (schwarz) und BMP-2, das nach dem Zwei-Stufen-Protokoll (weiß) renaturiert wurde. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messungen.

Weitergehend konnte gezeigt werden, dass das Zwei-Stufen-Protokoll auf die Rückfaltung von proBMP-2 übertragbar war. In Abbildung 3.9 ist die konventionelle Renaturierung von proBMP-2 nach Hillger *et al.*, 2005 der Renaturierung nach dem Zwei-Stufen-Protokoll gegenüber gestellt. Deutlich erkennbar ist die Verbesserung der Ausbeute an dimerer Proteinspezies in kürzeren Zeiträumen bei Anwendung des Zwei-Stufen-Protokolls. Allerdings wurde ebenfalls beobachtet, dass eine hohe Ausbeute wie mit dimerem BMP-2 mit proBMP-2 im 2. Reaktionsschritt nicht erreicht werden konnte. Mit ca. 60% an proBMP-2-Dimer stellte das Zwei-Stufen-Protokoll dennoch eine große Verbesserung gegenüber dem konventionellen Protokoll nach Hillger *et al.*, 2005 dar.

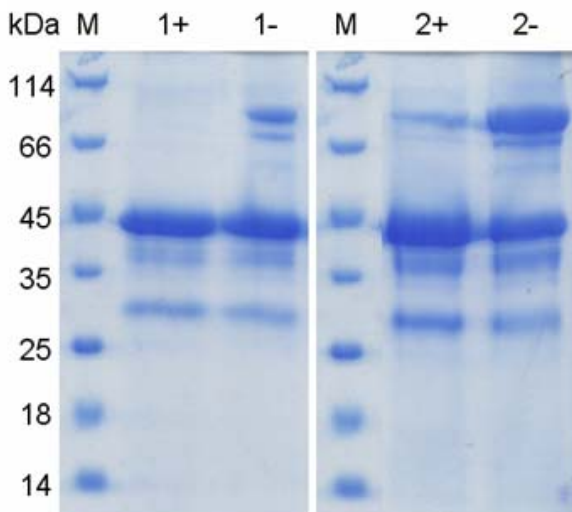


Abbildung 3.9.

Vergleich der Faltungseffizienz am Beispiel proBMP-2. (1) Puffer nach Hillger *et al.*, 2005 nach 5 d Inkubation mit 50 μg/ml, (2) Zwei-Stufen-Protokoll 200 μg/ml. M – Marker, (+) reduzierende Bedingungen, (-) nicht-reduzierende Bedingungen.

Mit dem hier vorgestellten, optimierten Rückfaltungsprotokoll konnte sowohl eine verbesserte Faltungseffizienz als auch eine beträchtliche Zeitersparnis erreicht werden. Das Protokoll könnte möglicherweise auch für die Rückfaltung anderer rekombinant hergestellter Cystinknoten-Proteine der TGF-β-Superfamilie Anwendung finden.

3.3 Charakterisierung der AP-Aktivität nach Zugabe von BMP-2 oder proBMP-2

Die Fähigkeit von BMP-2, in der etablierten myoblastischen Zelllinie C2C12 die Transdifferenzierung zu Osteoblasten auszulösen, ist bereits seit 1994 bekannt und kann anhand der Induktion der Alkalischen Phosphatase (AP) verfolgt werden (Katagiri *et al.*, 1994). Aufgrund der einfachen Anwendung und guten Reproduzierbarkeit ist der AP-Assay in vielen Fällen Methode der Wahl zur Bestimmung der biologischen Aktivität von BMP-2 und anderen Knochenwachstumsfaktoren (Ebisawa *et al.*, 1999; Yamaguchi, 1995; Yeh *et al.*, 2002). Aber auch die Rolle mehrerer BMP-Rezeptoren in der BMP-Signalwirkung wurde mit Hilfe der AP-Induktion aufgeklärt (Akiyama *et al.*, 1997; Aoki *et al.*, 2001; Namiki *et al.*, 1997).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der AP-Assay dafür genutzt, BMP-2 und proBMP-2 hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität zu vergleichen und bestehende Wechselwirkungen zwischen dem Wachstumsfaktor und der Pro-Form offenzulegen und zu charakterisieren.

3.3.1 Die durch BMP-2-Zugabe induzierte AP-Aktivität

Für das prokaryotisch gewonnene und renaturierte BMP-2 war die konzentrationsabhängige Induktion der AP-Aktivität in C2C12-Zellen das Kriterium für den Nachweis der nativen Struktur des rekombinanten Proteins. Aufgrund des hohen osteogenen Potentials des Proteins wurde die AP-Induktion durch BMP-2 außerdem als positiver Vergleichswert genutzt.

Wie in Abbildung 3.10 ersichtlich ist, führt die Stimulation von C2C12-Zellen mit BMP-2 zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der AP-Aktivität. Der ermittelte EC₅₀-Wert von 10 nM entsprach publizierten Daten (Kirsch *et al.*, 2000a). Eine maximale AP-Induktion wurde mit BMP-2-Konzentration von ca. 100 bis 200 nM erreicht. Aufgrund dieser Beobachtung wurde in weiteren Experimenten, in denen eine maximale AP-Aktivität erzielt werden sollte, mit einer BMP-2-Konzentration von 100-200 nM gearbeitet.

Bei BMP-2-Konzentrationen über 200 nM im Medium sank die induzierte AP-Aktivität wieder ab und betrug bei 400 nM nur noch ca. die 50% der maximalen AP-Aktivität. Ein ähnliches Verhalten wurde auch schon bei anderen Cytokinen beobachtet. Für IGF-1 (*Insulin-like growth factor-1*) konnte gezeigt werden, dass sich erhöhte Konzentrationen *in vivo* und *in vitro* inhibitorisch auf das Zellwachstum auswirken und damit gegensätzlich zur eigentlichen biologischen Aktivität des Wachstumsfaktors sind (Katagiri *et al.*, 1996; Katagiri *et al.*, 1997). Im Fall von IGF-1 konnte diese Inhibierung auf eine Induktion der Apoptose bei hohen Proteinkonzentrationen zurückgeführt werden (Chi *et al.*, 2000). Für BMP-2 ergaben entsprechende Tests allerdings keinen Hinweis auf eine proapoptische oder cytotoxische

Wirkung des Proteins bei hohen Konzentrationen. Auch konnte keine nachteilige Wirkung auf das Zellwachstum beobachtet werden (Abbildung 8.3 – 8.6 im Anhang, Seite 122f).

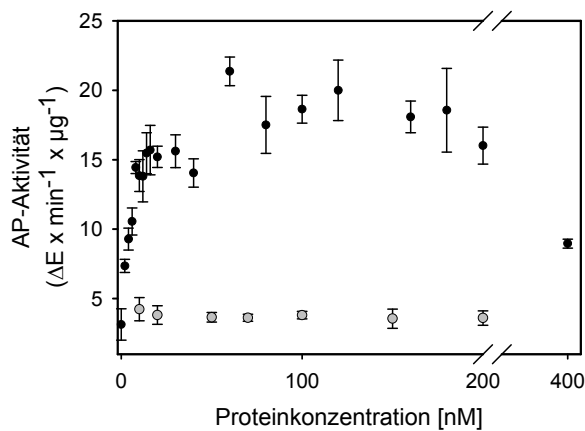


Abbildung 3.10.

AP-Aktivität nach Stimulation von C2C12-Zellen mit BMP-2 in aktiver (schwarz) und inaktiver Form (grau). Die Punkte kennzeichnen Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier unabhängigen Messungen.

Durch Reduktion der Disulfidbrücken in BMP-2 durch DTT und anschließender Alkylierung der freien Cysteine im Protein konnte die biologische Aktivität nahezu vollständig unterdrückt werden (Abbildung 3.10, grau). Inaktiviertes BMP-2 führte in C2C12-Zellen zu einer AP-Aktivität, wie sie durch Stimulation mit ca. 3 nM des korrekt gefalteten Proteins erreicht wurde. Da für die Inaktivierung zwar reduzierende aber keine denaturierenden Bedingungen gewählt wurden, ist diese Restaktivität vermutlich auf eine unvollständige Entfaltung des reduzierten Wachstumsfaktors zurückzuführen.

Neben der Induktion der AP in C2C12-Zellen wurde die native Struktur von BMP-2 außerdem durch den Nachweis der Bindung des Wachstumsfaktors an Noggin sowie an die ECD des BMP-Rezeptors IA belegt (Abschnitt 8.1.1 und 8.1.2 im Anhang, Seite 120f)

3.3.2 Stimulation von C2C12-Zellen mit proBMP-2 und isoliertem Propeptid

Da gezeigt werden konnte, dass proBMP-2 im Tiermodell in der Lage ist, die ektote Knochenneubildung zu induzieren, sollte nach Stimulation mit dem Protein auch im Zellkulturversuch mit C2C12-Zellen die Induktion der AP nachweisbar sein (Hillger *et al.*, 2005). Die erwartete AP-Induktion konnte allerdings nicht beobachtet werden (Abbildung 3.11 A). Selbst bei Verwendung von unphysiologisch hohen Konzentrationen von bis zu 900 nM proBMP-2 lag die AP-Aktivität noch unter dem Wert, der für inaktiviertes BMP-2 erreicht wurde und entsprach der basalen AP-Aktivität von nicht-stimulierten Zellen. Darüber hinaus konnte die BMP-2-induzierte AP-Aktivität durch proBMP-2 inhibiert werden (Abbildung 3.11 B). Damit konnten Beobachtungen, die im Rahmen einer Diplomarbeit innerhalb der Arbeitsgruppe gemacht wurden, bestätigt werden (Krause, 2003). Zur Inhibierung der AP-

Aktivität wurde BMP-2 in einer Konzentration, die in einer maximalen AP-Aktivität resultierte, mit steigenden Konzentrationen an proBMP-2 vorinkubiert und anschließend zur Stimulation von C2C12-Zellen eingesetzt. Es zeigte sich eine annähernd lineare Abnahme der BMP-2-induzierten AP-Aktivität in Abhängigkeit von der proBMP-2-Konzentration in der Vorinkubation. Bei fünffachem molaren Überschuss an proBMP-2 wurden nur noch ca. 30% der maximalen AP-Aktivität erreicht. Die inhibitorische Wirkung von proBMP-2 auf die Aktivität von BMP-2 ist wahrscheinlich auf eine Konkurrenz um die Rezeptorbindung zurückzuführen. Die Bindung von proBMP-2 an BMPR-IA konnte *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden (Hauburger *et al.*, 2009). Im Vergleich zu BMP-2 ist die Assoziation von proBMP-2 an BMPR-IA-ECD geringfügig langsamer, und mit 4,1 nM ist die Bindungskonstante nur unwesentlich höher als die für die Bindung von BMP-2 an die Rezeptor-ECD (Hauburger, 2010). Einen Hinweis auf eine cytotoxische oder proapoptotische Wirkung von proBMP-2 im verwendeten Konzentrationsbereich gab es nicht. Ebenso wurde keine nachteilige Auswirkung auf das Zellwachstum beobachtet (Abbildung 8.3 – 8.6 im Anhang, Seite 122f).

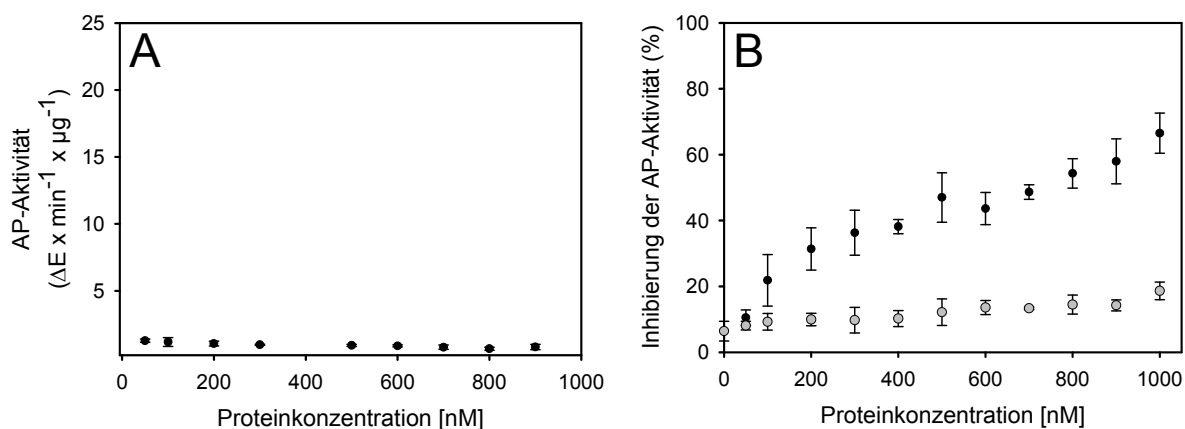


Abbildung 3.11. AP-Aktivität nach Stimulation mit proBMP-2 (A) und Inhibierung der BMP-2-induzierten AP-Aktivität durch Vorinkubation mit proBMP-2 (B). Die Stimulation erfolgte mit den angegebenen Konzentrationen proBMP-2 in aktiver (schwarz) oder inaktiver Form (grau). Zur Vorinkubation wurden 200 nM BMP-2 eingesetzt. Die Punkte kennzeichnen Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier unabhängigen Messungen.

Für die inhibitorische Wirkung von proBMP-2 auf die BMP-2-induzierte AP-Aktivität war die native Struktur des Wachstumsfaktors notwendig. Mit inaktiviertem Protein, das mittels DTT reduziert und anschließend alkyliert worden war, konnte lediglich eine Inhibierung der BMP-2-induzierten AP-Aktivität um 10-20% erreicht werden (Abbildung 3.12 B, grau). Die Restaktivität ist vermutlich auf eine unvollständige Entfaltung zurückzuführen, da, wie bereits

für die Inaktivierung von BMP-2 beschrieben, zwar reduzierende, aber keine denaturierenden Bedingungen gewählt wurden.

Ähnliche Ergebnisse wie für proBMP-2 wurden auch mit dem isolierten Propeptid erhalten (Abbildung 3.12). Wie zu erwarten war, konnte durch Stimulation mit bis zu 600 nM Propeptid keine AP-Induktion beobachtet werden (Abbildung 3.12 A).

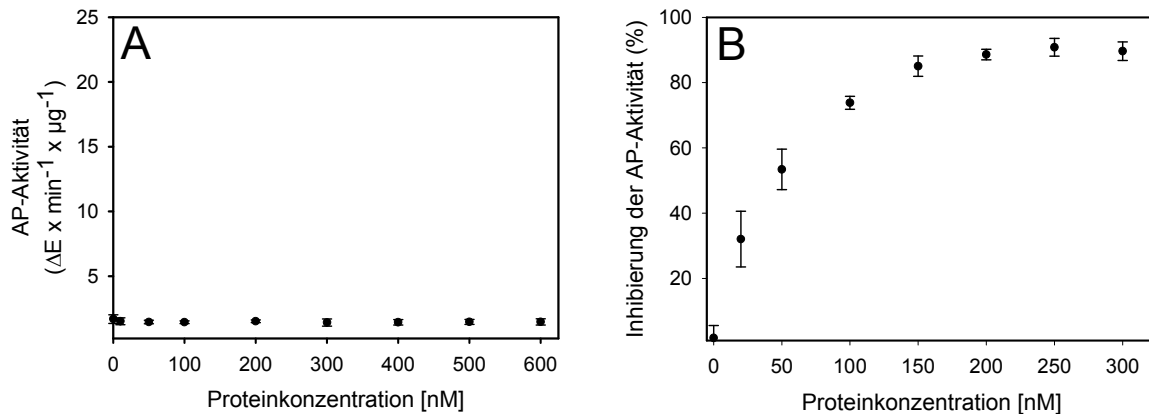


Abbildung 3.12. AP-Aktivität nach Stimulation mit Propeptid (A) und Inhibierung der BMP-2-induzierten AP-Aktivität durch Vorinkubation mit dem Propeptid (B). Die Stimulation erfolgte mit den angegebenen Konzentrationen Propeptid. Zur Vorinkubation wurden 100 nM BMP-2 eingesetzt. Die Punkte kennzeichnen Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier unabhängigen Messungen.

Wurden die Zellen mit BMP-2 stimuliert, das zuvor mit verschiedenen Konzentrationen an Propeptid vorinkubiert worden war, zeigte sich ebenfalls eine konzentrationsabhängige Abnahme der BMP-2-stimulierten AP-Aktivität (Abbildung 3.12 B). Damit konnten frühere Ergebnisse der Arbeitsgruppe bestätigt werden (Krause, 2003). Im Vergleich zur Inhibierung durch proBMP-2 ist die Inhibierung durch das Propeptid deutlich besser. Bei 200 nM bzw. 2-fachem molarem Überschuss an Propeptid in der Vorinkubation wurde nur noch ca. 10% der maximalen BMP-2-induzierten AP-Aktivität erreicht. Die Inhibierung ist durch nicht-kovalente Interaktion von BMP-2 mit dem Propeptid zu erklären, für die eine Bindungskonstante von 28 nM bestimmt wurde (Hauburger, 2010). Diese Interaktion führt vermutlich zum einen zur Verminderung des Anteils an aktivem BMP-2. Zum anderen ist es wahrscheinlich, dass der nicht-kovalente Komplex aus Propeptid und BMP-2 in seiner Struktur proBMP-2 ähnelt und daher ebenfalls zur Konkurrenz mit BMP-2 um die Rezeptorbindung in der Lage ist.

Diese Interpretation soll im Diskussionsteil noch weiter ausgeführt werden.

3.3.3 Zeitabhängige Induktion der AP-Aktivität nach Zugabe von BMP-2 und proBMP-2

Frank Hillger konnte im Rahmen seiner Dissertation zeigen, dass proBMP-2 im *in vivo*-Modell mit Ratten in der Lage war, die ektope Knochenneubildung zu induzieren (Hillger *et al.*, 2005). Die oben beschriebenen Ergebnisse, wonach proBMP-2 im Zellkulturmodell nicht die osteoblastische Differenzierung stimulieren konnte und sogar die BMP-2-Aktivität inhibierte, stellte scheinbar einen Gegensatz zu den *in vivo*-Befunden dar. Eine große Diskrepanz zwischen beiden Versuchsanordnungen war die Zeit. Im Tierversuch verblieb der Träger mit dem Wachstumsfaktor insgesamt 30 Tage im Organismus. Dagegen betrug der Zeitraum der Stimulation im Zellkulturmodell lediglich vier Tage. Daher wurde im Folgenden untersucht, welchen Einfluss die Zeit der Stimulation mit proBMP-2 auf die Induktion der AP in C2C12-Zellen hatte. Dazu wurde der Zeitrahmen des Standard-AP-Assay auf insgesamt elf Tage erweitert und die Induktion der AP im Vergleich zum reifen BMP-2 zeitabhängig verfolgt (Abbildung 3.13).

Es ist bekannt, dass viele Zell-Zell-Kontakte für zahlreiche Zelllinien ein Differenzierungsmerkmal darstellen kann (Jiang *et al.*, 2007; Katagiri *et al.*, 1994). Da während des zeitabhängigen AP-Assays die Zellen konfluentes Wachstum erreichten, wurde die basale AP-Aktivität nicht-induzierter Kontrollzellen nicht von den Werten der stimulierten Zellen abgezogen, sondern getrennt betrachtet. Es konnte allerdings keine zeitabhängige Induktion der AP in Kontrollzellen beobachtet werden.

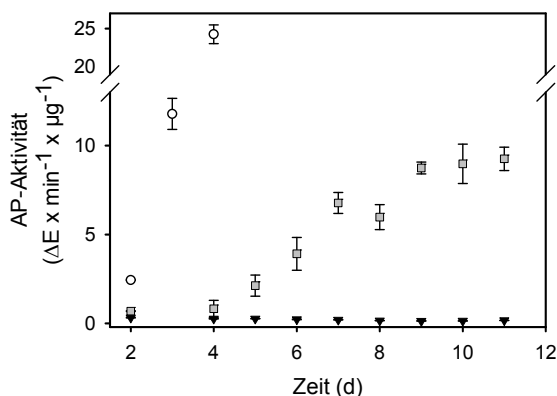


Abbildung 3.13.

Zeitabhängige Induktion der AP-Aktivität. Zellen wurden für den angegebenen Zeitraum mit 100 nM BMP-2 (weiß) oder proBMP-2 (grau) stimuliert. Nicht-induzierte Zellen (schwarz) dienen als Kontrolle für die basale AP-Aktivität. Die Punkte kennzeichnen Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messungen.

Abbildung 3.13. zeigt deutlich, dass die proBMP-2-induzierte AP-Aktivität im Vergleich zur BMP-2-induzierten zeitlich verzögert einsetzte und geringer war. Bis vier Tage nach Beginn der Stimulation der Zellen mit proBMP-2 entsprach die AP-Aktivität der basalen AP-Aktivität der nicht-induzierten Kontrollzellen. Erst nach fünf Tagen war eine Induktion der AP-Aktivität zu beobachten. Ab ca. neun Tagen nach Beginn des Versuchs wurde ein nahezu konstanter Wert für die AP-Aktivität bestimmt.

3.4 Stabilität von proBMP-2 und BMP-2 unter Zellkulturbedingungen und Internalisierung in C2C12-Zellen

Im vorangegangenen Kapitel wurde beschrieben, dass proBMP-2 nach längerem Einwirken in C2C12-Zellen die AP induzieren konnte, auch wenn diese Induktion im Vergleich zum reifen BMP-2 zeitlich verzögert war und geringer ausfiel. Die Fähigkeit von proBMP-2, die Transdifferenzierung zu Osteoblasten auszulösen war übereinstimmend mit früheren Ergebnissen, wonach das Protein *in vivo* die ektope Knochenneubildung induzieren konnte (Hillger *et al.*, 2005). Dagegen konnte allerdings auch gezeigt werden, dass proBMP-2 bei simultaner Zugabe zusammen mit BMP-2 zu den Zellen die Wirkung des reifen Wachstumsfaktors inhibieren konnte. Dieses Verhalten ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass proBMP-2 ebenfalls an BMPRII binden kann und somit in der Lage ist, mit BMP-2 um die Rezeptorbindung zu konkurrieren. Die Rezeptorbindung von proBMP-2 führte jedoch nicht zu einer Aktivierung des p38-Signalwegs, der unter anderem in der Induktion der AP mündet (Hauburger *et al.*, 2009). Es galt nun, diese Diskrepanz aufzuklären. Eine Möglichkeit wäre die Prozessierung von proBMP-2 durch extrazelluläre Proteasen, wie sie auch schon für den verwandten Wachstumsfaktor Nodal nachgewiesen werden konnte (Beck *et al.*, 2002). Dieses Kapitel beschäftigt sich mit Untersuchungen zur Stabilität von proBMP-2 im Vergleich zum reifen Wachstumsfaktor unter Zellkulturbedingungen.

Zellen wurden mit der Konzentration BMP-2, die im AP-Assay zur maximalen Induktion führte bzw. mit der gleichen molaren Konzentration an proBMP-2 stimuliert. Beginnend 30 min bis fünf Tage nach Zugabe der Wachstumsfaktoren wurden Proben entnommen, durch SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Die Detektion von BMP-2 bzw. proBMP-2 erfolgte mit Hilfe von anti-rhBMP-2-Antikörpern. Dabei wurde für jeden Zeitpunkt zwischen Kulturüberstand, Waschfraktion und Zelllysate unterschieden. Für die Proben des Kulturüberstands diente die Ponceau S-Färbung als Ladekontrolle (Abbildung 3.14, Kulturüberstand, unteres Feld). Die Bande bei 66 kDa entspricht Serum-Albumin als Bestandteil des dem Medium zugesetzten FBS. Als Ladekontrolle für die Proben der Zelllysate wurden anti- β -Actin-Antikörper verwendet. Es konnten Banden bei 42 kDa detektiert werden (Abbildung 3.14, Zelllysate, unteres Feld).

Es ist ersichtlich, dass BMP-2 unter Zellkulturbedingungen eine deutlich höhere Stabilität aufweist als proBMP-2 (Abbildung 3.14, Kulturüberstand). Die immun-reaktive Bande von BMP-2 wies bis etwa zwei Tage nach Beginn der Stimulation eine nahezu konstante Intensität auf und nahm danach bis Tag fünf nur geringfügig ab. Dagegen war für proBMP-2 eine kontinuierliche Abnahme der Signalintensität im Zeitverlauf bis zu drei Tage nach Beginn der Inkubation der Zellen mit dem Wachstumsfaktor zu beobachten. In den Proben, die Tag vier und fünf nach Beginn der Stimulation entsprechen, war kaum noch proBMP-2 detektierbar.

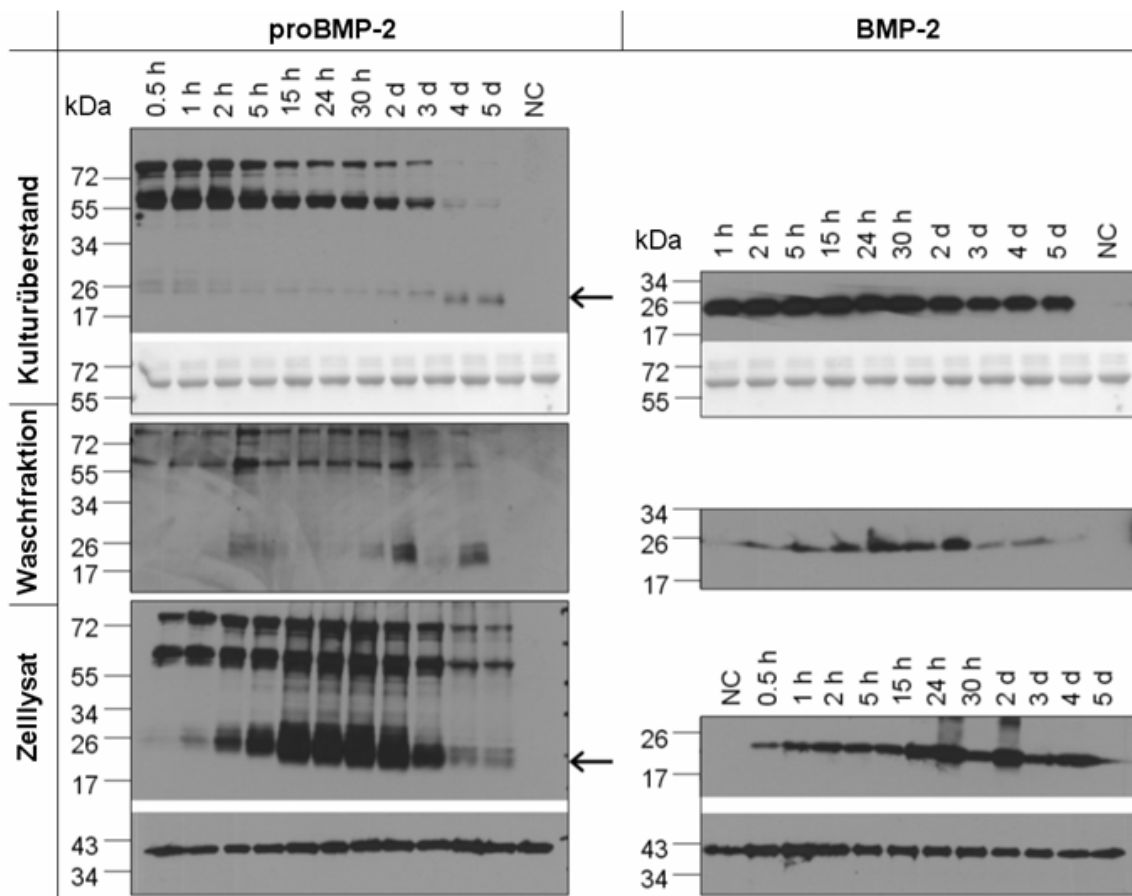


Abbildung 3.14. Stabilität von BMP-2 und proBMP-2 unter Zellkultur-Bedingungen und Internalisierung in C2C12-Zellen. Proben der Kulturüberstände, der Waschfraktionen und der Zellysate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. NC kennzeichnet nicht-induzierte Zellen, die als Kontrolle mitgeführt wurden.

Die zusätzlichen Banden, die bei der Auftrennung von rekombinantem proBMP-2 durch SDS-PAGE bei geringeren Molekulargewichten liefen, wurden ausschließlich als immunreaktive Banden und nicht durch Coomassie-Färbung erhalten (Abbildung 8.7 im Anhang, Seite 123). Sie traten in Abhängigkeit von der Charge der verwendeten anti-rhBMP-2-Antikörper in unterschiedlichen Ausprägungen auf und stellen wahrscheinlich Abbauprodukte von proBMP-2 dar, die in sehr geringen Konzentrationen in den Proteinpräparationen vorlagen.

Vor der Lyse wurden die Zellen mit Na-Citrat-Puffer gewaschen, um zwischen Protein, das in die Zellen aufgenommen wurde, und Protein, das an der Oberfläche der Zellen oder unspezifisch an der Gefäßwand gebunden war, unterscheiden zu können. Die detektierbare Proteinmenge war sowohl mit BMP-2 als auch proBMP-2-behandelten Zellen sehr gering. Um die Signalintensität zu erhalten, die in Abbildung 3.14, Waschfraktion dargestellt ist, musste viermal mehr Probe aufgetrennt werden als bei den Proben der Kulturüberstände

und Zelllysate. Außerdem musste eine längere Expositionszeit gewählt werden. Waschen mit 0,3% Digitonin in PBS resultierte in vergleichbaren Ergebnissen. Da die Auftrennung und Detektion von Proben des zweiten Waschschruttes nicht zu immun-reaktiven Banden führte (nicht gezeigt), kann davon ausgegangen werden, dass die Entfernung des oberflächen-gebundenen Proteins vollständig war.

Wurden die Lysate der BMP-2- und proBMP-2-stimulierten Zellen untersucht, so konnten bereits ab dem frühesten Zeitpunkt von 30 min immun-reaktive Banden des jeweiligen Proteins gefunden werden. Diese Signale entsprechen Protein, das von den Zellen internalisiert worden war. Um eine Detektion von endogenem BMP-2 durch Induktion des *bmp-2*-Gens durch die extern applizierten Wachstumsfaktoren auszuschließen, wurde die Transkription des *bmp-2*-Gens untersucht (Abbildung 3.15). Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde Gesamt-RNA von BMP-2- oder proBMP-2-induzierten Zellen isoliert, die mRNA in cDNA umgeschrieben und anschließend transkript-spezifisch für *bmp-2* amplifiziert. Weder in BMP-2- noch in proBMP-2-behandelten Zellen konnte eine Transkription von *bmp-2* nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnten mit den anti-rhBMP-2-Antikörpern zu keinem Zeitpunkt immun-reaktive Banden in nicht-stimulierten Zellen gefunden werden, die stets als Kontrolle mitgeführt worden waren (Abbildung 3.14, NC).

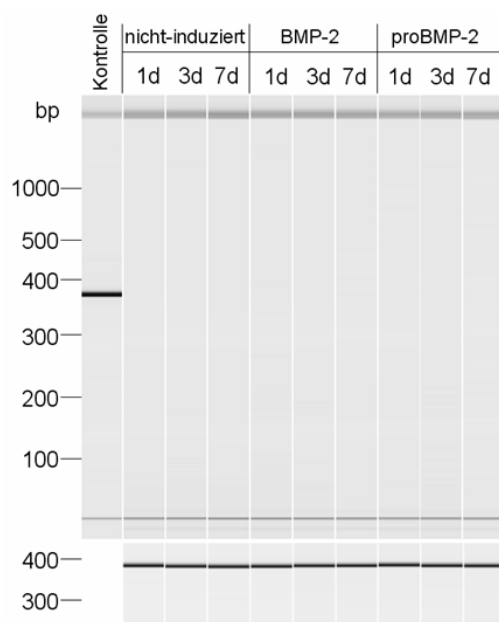


Abbildung 3.15.

Transkription von *bmp-2* nach Stimulation mit 100 nM BMP-2 oder proBMP-2. Die Gesamt-RNA wurde nach den angegebenen Zeitpunkten isoliert, cDNA synthetisiert und transkript-spezifisch amplifiziert. Nicht-induzierte Zellen dienten als Negativkontrolle. Als Positivkontrolle wurde Vektor-DNA (pET 11a::proBMP-2) amplifiziert. *β-actin* (unteres Feld) diente als Referenz-Gen.

Die Signalintensität der Banden in den Lysaten der BMP-2-behandelten Zellen blieb über den gesamten beobachteten Zeitraum nahezu konstant (Abbildung 3.14, Zelllysate, rechts). Dagegen verringerte sich die Intensität der immun-reaktiven Banden in den Lysaten der proBMP-2-stimulierten Zellen zeitabhängig (Abbildung 3.14, Zelllysate, links). Diese Beobachtung war übereinstimmend mit der höheren Stabilität des Wachstumsfaktors im Kulturüberstand im Vergleich zur Pro-Form. Interessanterweise konnten im Lysat proBMP-2-

induzierter Zellen vier und fünf Tage nach Beginn der Stimulation noch proBMP-2 nachgewiesen werden, während im Kulturüberstand der Zellen zu den gleichen Zeitpunkten kein Protein mehr nachweisbar war. Außerdem konnten in den Lysaten proBMP-2-stimulierter Zellen immun-reaktive Banden detektiert werden, die im Laufverhalten reifem BMP-2 entsprachen. Diese „BMP-2-Banden“ waren bereits eine Stunde nach Beginn der Stimulation nachweisbar und erreichten die maximale Intensität nach etwa 15 Stunden. Trotz der nachfolgend starken Abnahme der Bandenintensität waren sie auch nach fünf Tagen noch vorhanden. Der Nachweis von BMP-2 in proBMP-2-induzierten Zellen könnte durch intrazelluläre Prozessierung des internalisierten Proteins erklärt werden. Die Prozessierung von proBMP-2 zu reifem BMP-2 in C2C12-Zellen bietet des Weiteren eine Erklärung für die verzögerte und geringere AP-Induktion (beschrieben unter Kapitel 3.3.3). Einen Hinweis darauf gibt der Nachweis von immun-reaktiven Banden der Größe von BMP-2 im Kulturüberstand von proBMP-2-behandelten Zellen vier und fünf Tage nach Zugabe des Proteins (Abbildung 3.14. Kulturüberstand, Pfeil).

Bei Verwendung der fibroblastischen Zelllinie b/C3T3 führten Untersuchungen zur Proteinstabilität und Internalisierung von BMP-2 und proBMP-2 zu vergleichbaren Ergebnissen (nicht gezeigt).

3.4.1 Inhibierung der Internalisierung von BMP-2 und proBMP-2

Zur Untersuchung, ob die Internalisierung von BMP-2 und proBMP-2 inhibiert werden kann, wurden die Zellen vor der Induktion mit den Proteinen mit zwei verschiedenen Endocytose-Inhibitoren inkubiert. Chlorpromazin ist ein Inhibitor der rezeptor-vermittelten Endocytose. Der Wirkstoff aus der Gruppe der Phenothiazine wurde seit 1953 unter dem Markennamen Thorazin im Menschen als Psychopharmakum eingesetzt (Lopez-Munoz *et al.*, 2005). Diese Anwendung begründete sich auf der inhibitorischen Wirkung von Chlorpromazin auf dopaminerge, adrenerge und cholinerge Rezeptoren des zentralen Nervensystems (Peroutka und Synder, 1980). Der verwandte Wirkstoff Trifluorpromazin (auch: Vesprin) wurde bereits erfolgreich zur Inhibierung der TGF- β -Signalwirkung eingesetzt (Chen *et al.*, 2009). Zur Inhibierung der clathrin-abhängigen Endocytose wurde als Wirkstoff Dynasore (auch: Dynamin-Inhibitor I) gewählt. Dynasore ist ein membrangängiger Wirkstoff und inhibiert intrazellulär die Dynamin-GTPase, die in eukaryotischen Zellen die unspezifische Endocytose reguliert. Auch zu diesem Inhibitor gibt es bereits publizierte Daten zur Anwendung bei der Untersuchung der TGF- β -Signalwirkung (Chen *et al.*, 2009).

Nachdem die Zellen eine bzw. vier Stunden mit BMP-2 oder proBMP-2 inkubiert worden waren, wurden sie gewaschen und anschließend lysiert. Proben der Lysate wurden analog zu den oben beschriebenen Experimenten zur Internalisierung durch SDS-PAGE

aufgetrennt, geblottet und mit anti-rhBMP-2-Antikörpern detektiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.16 dargestellt.

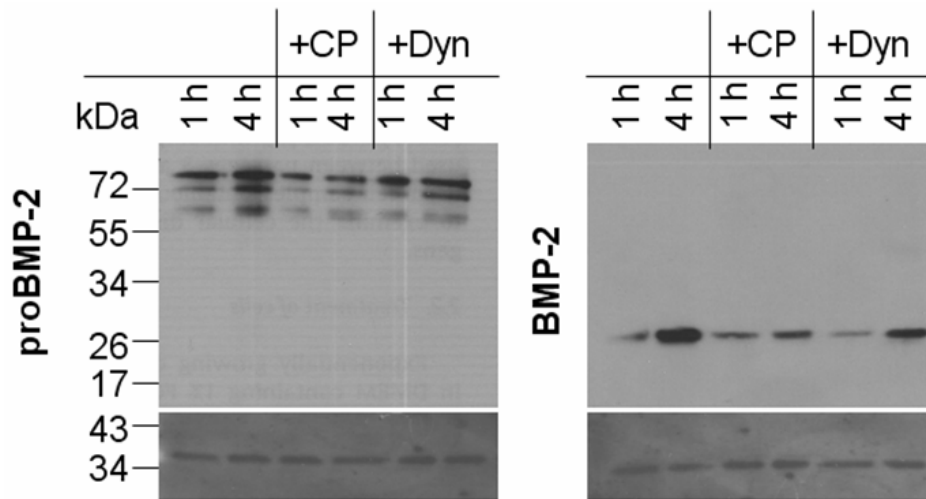


Abbildung 3.16. Inhibierung der Internalisierung von BMP-2 und proBMP-2 durch Chlorpromazin (CP) und Dynasore (Dyn). C2C12-Zellen wurden mit 20 nM BMP-2 oder proBMP-2 induziert, und Proben der Zelllysate durch Western Blot analysiert. Als Ladekontrolle (unteres Feld) wurden anti-GAPDH-Antikörper verwendet.

Sowohl mit Chlorpromazin als auch mit Dynasore konnte die Internalisierung von BMP-2 bzw. proBMP-2 vermindert werden. Dies impliziert, dass sowohl spezifische als auch unspezifische Endocytose an der Internalisierung von BMP-2 und proBMP-2 beteiligt sind. Allerdings zeigte sich in Abhängigkeit vom Inhibitortyp ein unterschiedlicher Einfluss auf die Internalisierung. Während bei der Internalisierung in Chlorpromazin-behandelte Zellen keine Unterschiede zwischen proBMP-2 und BMP-2 zu beobachten waren, ergab die Inhibierung der clathrin-abhängigen Endocytose durch Dynasore voneinander abweichende Ergebnisse bei der Internalisierung der beiden Proteine, die vor allem zum Zeitpunkt eine Stunde nach Induktion deutlich waren. Im Lysat von BMP-2-behandelten Zellen wurden kaum immun-reaktive Banden und somit eine deutliche Inhibierung erhalten. Im Vergleich dazu resultierte die Inhibierung mittels Dynasore bei der Internalisierung von proBMP-2 nur in einer geringen Abnahme der Signalintensität der immun-reaktiven Banden. Nach vier Stunden war die Inhibierung der Internalisierung für BMP-2 und proBMP-2 im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle annähernd gleich.

Die Internalisierung der Wachstumsfaktoren steht vermutlich in Zusammenhang mit der Bindung an die Rezeptoren und deren Endocytose. Eine Interpretation der Ergebnisse erfolgt im Diskussionsteil der Arbeit.

3.5 Die Wirkung von proBMP-2 auf die Transkription knochen-spezifischer Markergene

Während der Untersuchungen zur Stabilität von proBMP-2 und BMP-2 unter Zellkulturbedingungen konnte eine Internalisierung beider Proteine nachgewiesen werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass proBMP-2 intrazellulär prozessiert und sezerniert wird. Die Induktion der AP in C2C12-Zellen bei längerfristigem Einwirken von proBMP-2 (beschrieben unter Kapitel 3.3.3, Seite 72) sowie die Induktion der ektopen Knochenneubildung durch proBMP-2 *in vivo* (Hillger *et al.*, 2005) ist vermutlich auf die Aktivität der prozessierten Form zurückzuführen. Nachfolgend sollte untersucht werden, ob proBMP-2 in der Lage ist, neben der AP auch andere knochenspezifische Markerproteine zu induzieren. Es wurde versucht die Induktion von Osteocalcin und Osterix durch Reaktion mit spezifischen Antikörpern nachzuweisen. Diese Assays waren jedoch aufgrund der zu geringen Sensitivität nicht aussagekräftig. Ebenso musste der Versuch, die Induktion von Runx2 mittels Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) nachzuweisen, ohne eindeutiges Ergebnis abgebrochen werden, da keine Unterschiede zwischen induzierten und Kontrollzellen beobachtet werden konnten.

Vergleichende Studien zur Wirkung von proBMP-2 und BMP-2 auf die Induktion von knochenspezifischen Markerproteinen gelangen allerdings durch Bestimmung der Transkriptionsniveaus der entsprechenden Gene. Dazu wurden C2C12-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der Wachstumsfaktoren induziert. In einem weiteren Ansatz wurde bei konstanter Konzentration BMP-2 oder proBMP-2 die Induktionszeit variiert. Die Gesamt-RNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und transkriptspezifisch für AP, *osteocalcin*, *osterix* und *runx2* amplifiziert. Die entsprechenden Genprodukte wurden in Abschnitt 1.2.1 der Einleitung (Seite 17f) kurz vorgestellt. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Transkriptionsstudien dargelegt.

3.5.1 Transkription von knochenspezifischen Markergenen in C2C12-Zellen – semi-quantitative Bestimmung

3.5.1.1 Die konzentrationsabhängige Induktion mit proBMP-2 oder BMP-2

Zur Untersuchung der Transkription von AP, *osteocalcin*, *osterix* und *runx2* in Abhängigkeit von der Konzentration an proBMP-2 oder BMP-2 wurden C2C12-Zellen mit Konzentrationen von 10 bis 200 nM stimuliert. Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte 48 h nach Beginn der Induktion. Nach cDNA-Synthese der mRNA wurde transkript-spezifisch amplifiziert und durch Kapillarelektrophorese analysiert. Für alle untersuchten Transkripte wurden Amplifikationsprodukte der erwarteten Fragmentlängen erhalten (Abbildung 3.17 A-E).

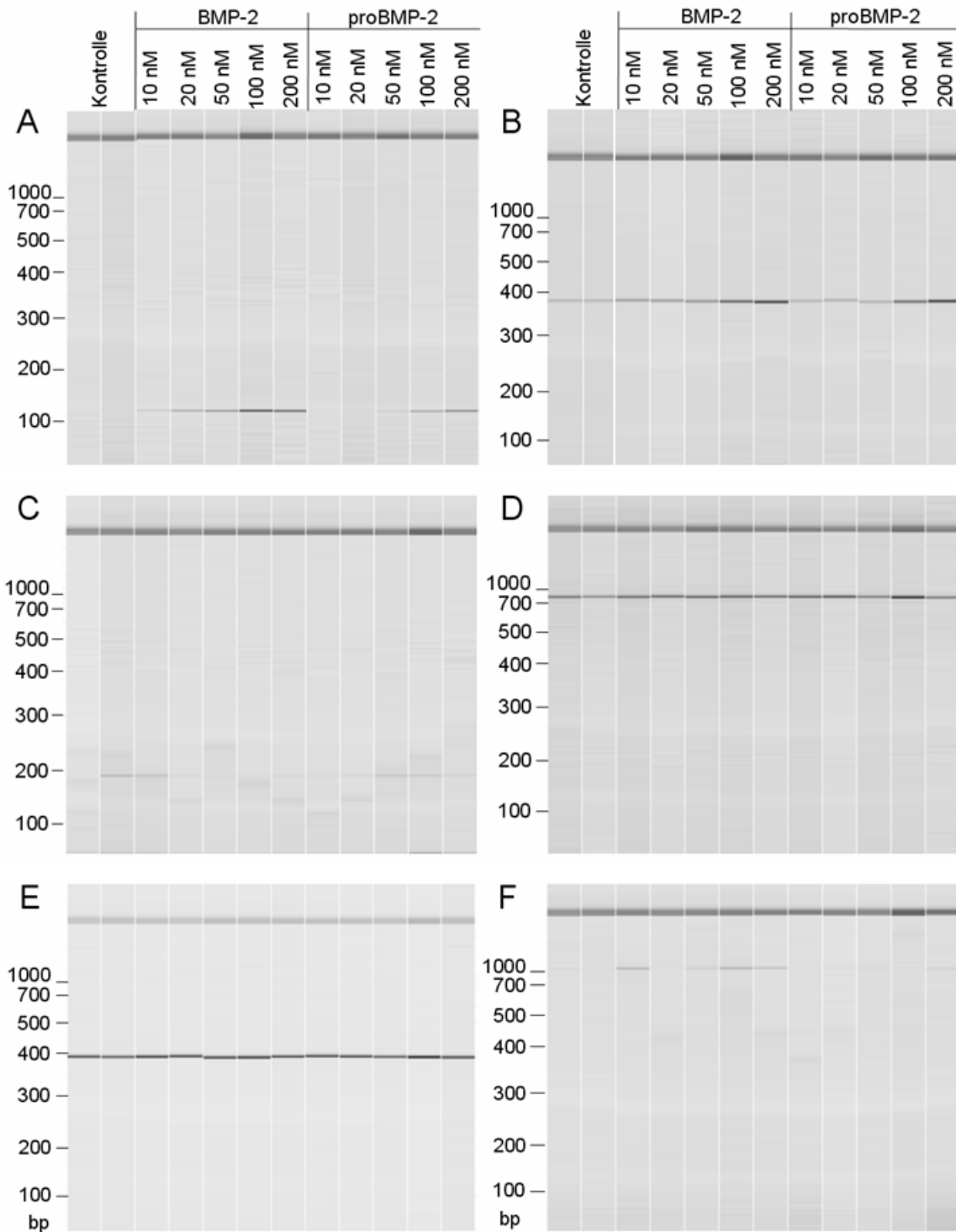


Abbildung 3.17. Transkription knochenspezifischer Markergene in C2C12-Zellen nach Zugabe verschiedener Konzentrationen BMP-2 oder proBMP-2. (A) *alkalische phosphatase* – 120 bp, (B) *osteocalcin* – 370 bp, (C) *osterix* – 183 bp, (D) *runx2* – 726 bp, (E) *β -actin* – 378 bp, (F) RNA-Kontrolle. Als Kontrolle für die basale Transkription dienten nicht-stimulierte Zellen.

Als Kontrolle auf Kontamination der isolierten RNA mit genomischer DNA wurden die RNA-Proben direkt zur DNA-Amplifikation mit dem *β -actin*-Primerpaar eingesetzt. Dabei wurden Amplifikationsprodukte einer Fragmentlänge von ca. 1000 bp erhalten, die auf Kontamination

mit geringen Mengen an genomischer DNA zurückzuführen waren. Fragmente mit einer Größe von 378 bp, wie sie für die Amplifikation von *β-actin*-mRNA mit dem entsprechenden Primerpaar erwartet wurden, konnten nicht gefunden werden (Abbildung 3.17 F). Alle Primerpaare wurden so gewählt, dass sie mindestens ein Intron überspannten, um die Amplifikate der cDNA von den Amplifikaten der genomischen DNA unterscheiden und daraus folgend gesicherte Aussagen zur Transkription der Gene machen zu können. Desweiteren wurden in jedem Fall nicht-stimulierte Zellen als Kontrolle für das basale Transkriptionsniveau mitgeführt.

Für die Transkripte von *AP* und *osteocalcin* war ein deutlicher Unterschied zwischen BMP-2- und proBMP-2-stimulierten Zellen sichtbar (Abbildung 3.17 A, B). Die transkript-spezifische Amplifikation dieser Gene erfolgte bei proBMP-2 bei höheren Konzentrationen als sie bei BMP-2 notwendig waren. Beispielsweise konnte in Zellen, die mit 20 nM BMP-2 stimuliert worden waren, ein *AP*-Amplifikationsprodukt nachgewiesen werden, während mit proBMP-2 mindestens 100 nM notwendig waren. Kontrollzellen zeigten keine bzw. nur eine sehr geringe basale Transkription von *AP* und *osteocalcin*. Die *osterix*-spezifische Amplifikation ergab selbst bei den Proben der Zellen, die mit 200 nM BMP-2 oder proBMP-2 inkubiert worden waren, nur eine sehr geringe Transkription (Abbildung 3.17 C). Die Sensitivität der Methode reichte daher nicht aus, um auf Unterschiede zwischen nicht-stimulierten, BMP-2- oder proBMP-2-stimulierten Zellen schließen zu können. Gleiches gilt auch für die *runx2*-spezifische Amplifikation (Abbildung 3.17 D). Überraschenderweise war im Fall dieses Gens die basale Transkription in den Kontrollzellen bereits sehr hoch, so dass sich eine Auswertung hinsichtlich des Induktionsstatus als unsicher erwies. Die Amplifikation für das Referenz-Gen *β-actin* zeigte, wie erwartet, ebenfalls keine Unterschiede zwischen nicht-stimulierten und stimulierten Zellen (Abbildung 3.17 E)

3.5.1.2 Die zeitabhängige Stimulation mit proBMP-2 oder BMP-2

Bei der vergleichenden Untersuchung der Zeitabhängigkeit der Transkription der knochenspezifischen Markergene *AP*, *osteocalcin*, *osterix* und *runx2* wurden C2C12-Zellen mit einer konstanten Konzentration von 100 nM BMP-2 oder proBMP-2 induziert. Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte nach Induktionszeiträumen von ein bis vier Tagen. Die Gesamt-RNA wurde, wie zuvor beschrieben, in cDNA umgeschrieben und anschließend transkript-spezifisch amplifiziert. Die erhaltenen Fragmente wurden mittels Kapillarelektrophorese analysiert (Abbildung 3.18). Die Kontrolle auf genomische DNA erfolgte wie unter 3.5.1.1 beschrieben und resultierte in vergleichbaren Ergebnissen (Abbildung 3.18 F). Für jeden Zeitpunkt dienten nicht-stimulierte Zellen der Kontrolle der basalen Transkription der Gene.

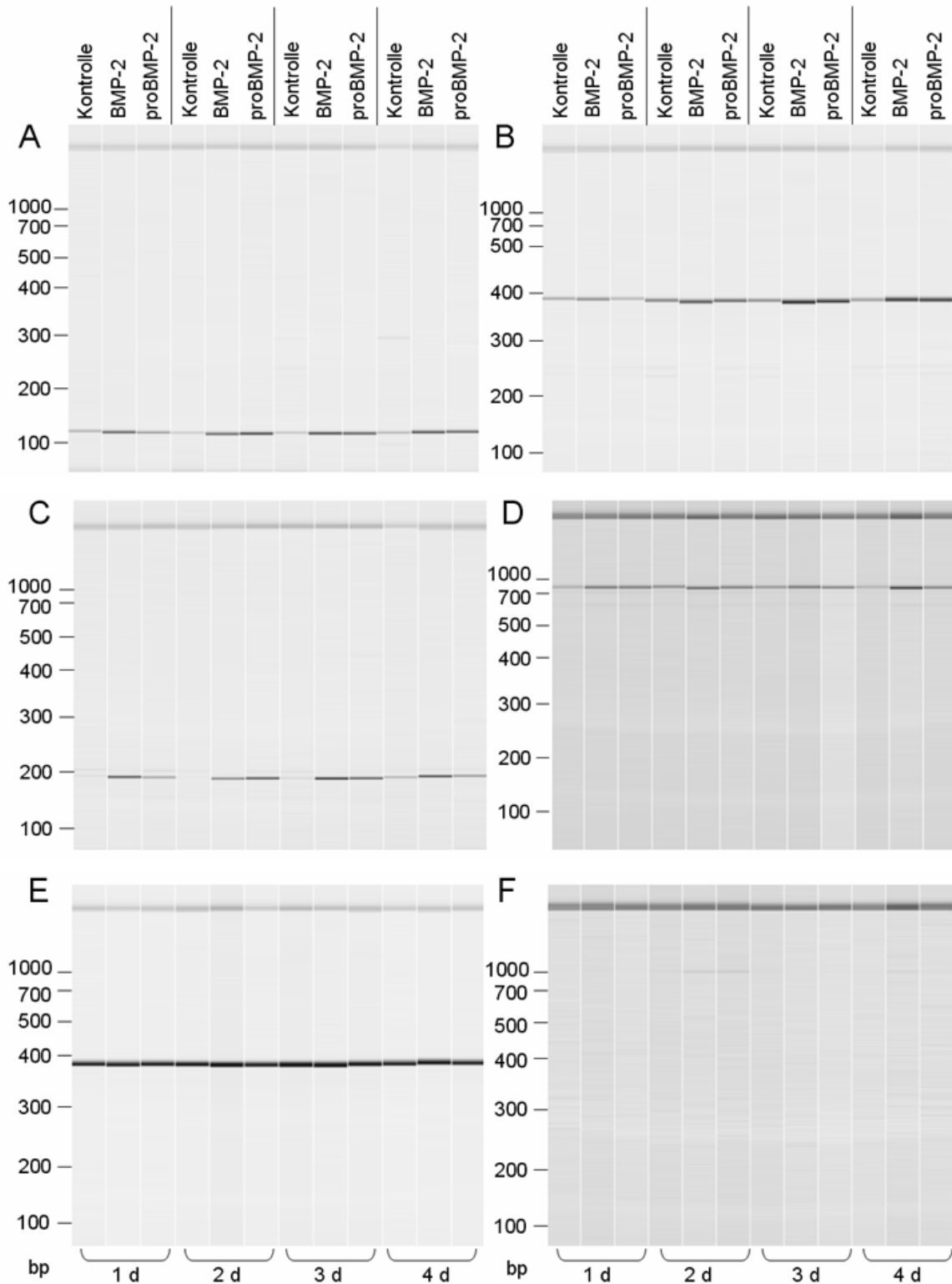


Abbildung 3.18. Zeitabhängige Transkription knochenspezifischer Markergene in C2C12-Zellen nach Stimulation mit BMP-2 oder proBMP-2. Die Zellen wurden für 1-4 d mit 100 nM BMP-2 oder proBMP-2 stimuliert. (A) *alkalische phosphatase* – 120 bp, (B) *osteocalcin* – 370 bp, (C) *osterix* – 183 bp, (D) *runx2* – 726 bp, (E) β -*actin* – 378 bp, (F) RNA-Kontrolle.

Für die Gene *AP*, *osteocalcin* und *osterix* zeigte sich nach Induktion mit BMP-2 und proBMP-2 eine deutliche zeitliche Abhängigkeit der Transkription (Abbildung 3.18 A-C). Zwar konnte auch in nicht-stimulierten Zellen im zeitlichen Verlauf eine Erhöhung der Transkriptmenge beobachtet werden, diese war jedoch in jedem Fall geringer als die, die für stimulierte Zellen erhalten wurde. Darüber hinaus war die Transkription in proBMP-2-induzierten Zellen zu jedem Zeitpunkt geringer als die in BMP-2-stimulierten Zellen. Speziell im Fall der *AP* stimmte dieses Resultat mit dem Ergebnis des AP-Assays auf Proteinebene überein (Abbildung 3.13, Seite 72).

Für die *runx2*-spezifische Amplifikation war, wie auch schon für die konzentrationsabhängige Stimulation gesehen, die basale Transkription in nicht-stimulierten Zellen sehr hoch (Abbildung 3.18 D). Eine Änderung in Abhängigkeit vom Induktionsstatus sowie zeitabhängige Veränderung der Transkriptmenge war nicht erkennbar. Die Amplifikation für das Referenz-Gen *β-actin* zeigte, wie erwartet, ebenfalls weder eine Abhängigkeit von der Zeit noch dem Induktionsstatus (Abbildung 3.18 E).

3.5.2 Transkription von knochenspezifischen Markergenen in C2C12-Zellen – Quantifizierung durch *real-time*-PCR

Nachdem die Untersuchung der Transkription von knochenspezifischen Markergenen in C2C12-Zellen nach Stimulation mit BMP-2 oder proBMP-2 bereits Hinweise auf Unterschiede zwischen der Wirkung beider Proteine ergeben hatte, wurden die Ergebnisse nachfolgend mittels *real-time*-PCR quantifiziert. Die Transkription von *AP*, *osteocalcin* und *osterix*, hervorgerufen durch die Wachstumsfaktoren, wurde ebenfalls in Abhängigkeit von der Konzentration und im Zeitverlauf analysiert. Unterschiede zwischen beiden Proteinen wurden statistisch abgesichert. Aufgrund der höheren Sensitivität der Methode wurde im Rahmen der Bestimmung der zeitabhängigen Induktion der Gene als frühester Zeitpunkt 6 h nach Beginn der Stimulation mit BMP-2 und proBMP-2 gewählt. Auf die Untersuchung der Transkription von *runx2* wurde aufgrund der vorhergehenden Ergebnisse bei der Analyse mittels *real-time*-PCR verzichtet.

Zur Bestimmung der PCR-Effizienz wurden die Proben mit der höchsten cDNA-Konzentration in logarithmischer Verdünnungsreihe als *template* eingesetzt und mittels *real-time*-PCR analysiert. Die resultierenden Eichreihen, die nach Auftragung der C_p -Werte gegen den Logarithmus des entsprechenden Verdünnungsfaktors erhalten wurden, sind in Abbildung 8.9 im Anhang (Seite 125) dargestellt. Anhand der Eichreihen wurde mit Hilfe der Roche LightCycler-Software die PCR-Effizienz wurde mit Werten zwischen 1,953 und 2,017 bestimmt. Die höchste Sensitivität wurde für das Referenzgen *β-actin* erhalten, bei dem in unverdünnten Proben C_p -Werte von ca. 12 erhalten wurde. Der Gehalt an *osterix*-cDNA war

im Vergleich zu den anderen untersuchten Genen am geringsten. Die Reihenfolge des Gehaltes der entsprechenden cDNAs stimmte mit dem überein, das auch schon während der Analyse mittels Kapillarelektrophorese beobachtet worden war. Durch Aufnahme von Schmelzkurven nach jedem Lauf konnte die Anwesenheit von Nebenprodukten der PCR ausgeschlossen werden (Abbildung 8.8 im Anhang, Seite 124).

3.5.2.1 Die konzentrationsabhängige Stimulation mit proBMP-2

Bei der Gegenüberstellung der Transkriptionsniveaus von knochenspezifischen Markergenen in Zellen, die mit verschiedenen Konzentrationen BMP-2 oder proBMP-2 stimuliert worden waren, zeigte sich für *AP*, *osteocalcin* und *osterix* eine ähnliche Tendenz. Für die genannten Gene wurde bereits nach der Stimulation mit der geringsten Konzentration von 10 nM eine signifikante Erhöhung der Transkription beobachtet (ANOVA, BMP-2: $p \leq 0,001$; proBMP-2: $p \leq 0,001$) (Abbildung 3.19).

Die höchste Induktion wurde für das *AP*-Gen beobachtet, das in Anwesenheit von 200 nM BMP-2 im Vergleich zu nicht-stimulierten Zellen eine 2000-fach höhere Transkription aufwies (Abbildung 3.19 A). Für *osteocalcin* und *osterix* wurde die größte Erhöhung des Transkriptionsniveaus ebenfalls durch Zugabe von 200 nM BMP-2 erreicht und lag bei einer Erhöhung um das 1300-Fache bzw. 530-Fache (Abbildung 3.19 B, C). Für keines der Gene konnte im Konzentrationsbereich bis 200 nM BMP-2 ein konstanter Wert für die Induktion beobachtet werden. Dieses Ergebnis stand im Gegensatz zu den Beobachtungen, die nach Stimulation der Zellen mit proBMP-2 gemacht werden konnten. Im Konzentrationsbereich von 50 nM bis 200 nM proBMP-2 konnten nahezu konstante Transkriptionsniveaus beobachtet werden. Sie lagen bei ca. 250-facher Erhöhung im Vergleich zur basalen Transkription im Fall von *AP*, bei ca. 150-facher Erhöhung im Fall von *osteocalcin* und bei ca. 120-facher Erhöhung im Fall von *osterix*. Interessanterweise konnte bei *AP* und *osteocalcin* nach Stimulation mit 20 und 50 nM BMP-2 oder proBMP-2 kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Proteinen beobachtet werden (ANOVA *AP*: 20 nM, $p = 0,14$; 50 nM, $p = 1$; ANOVA *Ocn*: 20 nM $p = 0,19$; 50 nM, $p = 1$).

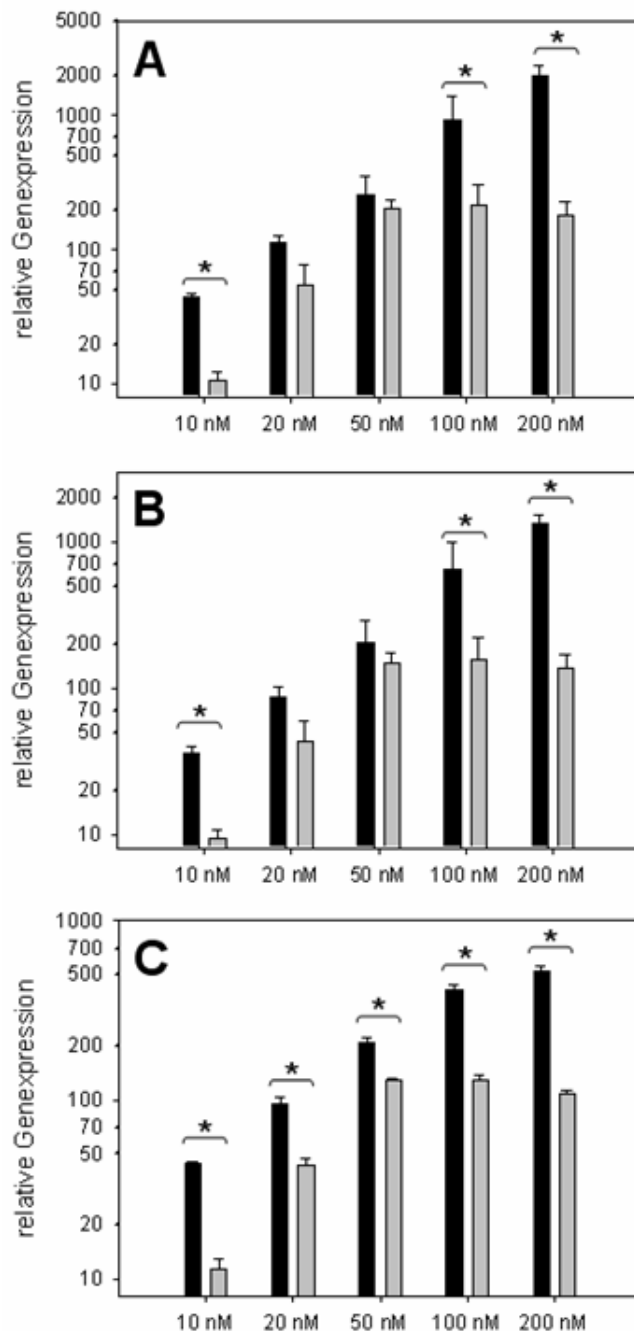


Abbildung 3.19.

Relative Genexpression von knochen-spezifischen Markergenen in Abhängigkeit von der Konzentration.

Induktion mit BMP-2 (schwarz) oder proBMP-2 (grau). Die Gesamt-RNA wurde 48 h nach Beginn der Stimulation isoliert, mRNA revers transkribiert und *alkalische phosphatase* (A), *osteocalcin* (B) und *osterix* (C) spezifisch amplifiziert. Die basale Transkription in nicht-induzierten Zellen wurde auf 1 gesetzt. Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet: (*) ANOVA, $p \leq 0,001$. Die Daten sind logarithmisch aufgetragen und repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messungen.

3.5.2.2 Die zeitabhängige Induktion mit proBMP-2

Nachdem die Antwort der C2C12-Zellen auf die Induktion mit verschiedenen Konzentrationen BMP-2 oder proBMP-2 untersucht worden war, sollte in weiterführenden Tests nun die Transkription von *AP*, *osteocalcin* und *osterix* zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion mit einer konstanten Konzentration von 100 nM BMP-2 oder proBMP-2 analysiert werden. Es konnte eine signifikante Induktion von *AP* (ANOVA, $p \leq 0,001$), *osteocalcin* (ANOVA, $p \leq 0,001$) und *osterix* (ANOVA, $p \leq 0,001$) im Vergleich zur basalen Transkription in Kontrollzellen beobachtet werden (Abbildung 3.20). Die größte Erhöhung des Transkriptionsniveaus wurde auch hier für das *AP*-Gen durch BMP-2 beobachtet

(Abbildung 3.20 A). Eine signifikante Induktion um den Faktor 20 wurde bereits 6 h nach Zugabe des Wachstumsfaktors erhalten (ANOVA, $p \leq 0,001$); 72 h nach Beginn der Stimulation lag das Transkriptionsniveau ca. 8000-fach über dem Basiswert nicht-stimulierter Zellen. Dagegen wurde für proBMP-2-stimulierte Zellen im Vergleich zum reifen Wachstumsfaktor eine Verzögerung in der Antwort auf die Stimulation beobachtet. Eine signifikante Erhöhung des basalen Transkriptionsniveaus lag erst 24 h nach Beginn der Stimulation vor (ANOVA, $p \leq 0,001$).

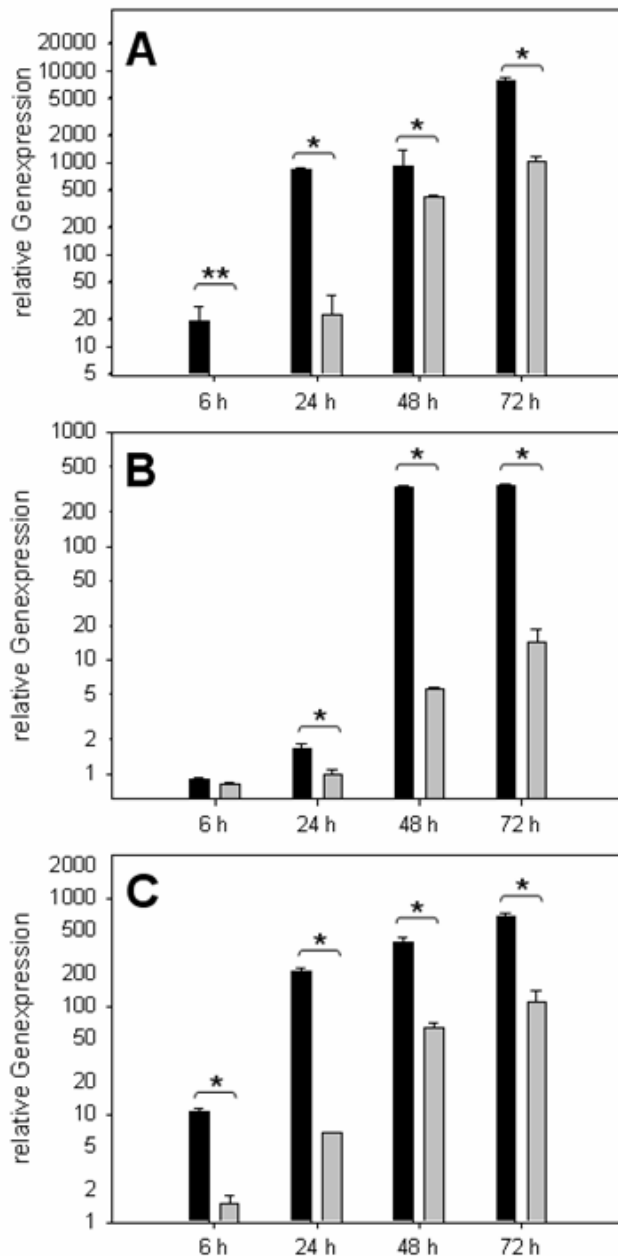


Abbildung 3.20.

Relative Genexpression von knochen-spezifischen Markergenen in Abhängigkeit von der Zeit. Induktion mit 100 nM BMP-2 (schwarz) oder proBMP-2 (grau). Die Gesamt-RNA wurde nach den angegebenen Zeitpunkten isoliert, mRNA revers transkribiert und *alkalische phosphatase* (A), *osteocalcin* (B) und *osterix* (C) spezifisch amplifiziert. Die basale Transkription in nicht-induzierten Zellen wurde 1 gesetzt. Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet: (*) ANOVA, $p \leq 0,001$; (**) ANOVA, $p \leq 0,005$. Die Daten sind in logarithmischer Skalierung aufgetragen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messungen.

Für *osteocalcin* und *osterix* fiel die Induktion geringer aus als die, die für AP erhalten wurde (Abbildung 3.20 B, C). Dieses Ergebnis stimmte mit den Beobachtungen überein, die nach der Induktion mit verschiedenen Konzentrationen von BMP-2 oder proBMP-2 gemacht

wurden. Für die Transkription von *osteocalcin* konnte 6 h nach Zugabe der Proteine weder für BMP-2 noch für proBMP-2 eine signifikante Erhöhung nachgewiesen werden (ANOVA, BMP-2, $p = 0,991$; ANOVA, proBMP-2, $p = 0,593$) (Abbildung 3.20 B). Im Fall von proBMP-2 resultierte die Zugabe des Wachstumsfaktors sogar erst nach 48 h in einer signifikanten Erhöhung des basalen Transkriptionsniveaus (ANOVA, $p \leq 0,001$). Während durch BMP-2 eine bis zu 330-fache Induktion der Transkription von *osteocalcin* erreicht werden konnte, die ab 48 h nahezu konstant war, so lag das maximale erreichte Transkriptionsniveau in proBMP-2-induzierten Zellen nur bei ca. 15-fach über dem Basiswert. Das Erreichen eines Maximalwertes der Induktion wurde im Fall von proBMP-2 nicht beobachtet.

Betreffend das *osterix*-Gen wurde nach Zugabe von BMP-2 oder proBMP-2 zeitabhängig ein annähernd linearer Anstieg des basalen Transkriptionsniveaus erhalten (Abbildung 3.20 C). Im Fall von BMP-2 stieg der Wert von einer 10-fachen Induktion nach 6 h bis zu einer ca. 700-fachen Induktion nach 72 h. Bereits die Induktion zum frühesten Zeitpunkt war signifikant (ANOVA, $p \leq 0,001$). Für proBMP-2-induzierte Zellen wurde ein ähnlicher aber zeitlich verzögerter Anstieg beobachtet. Während die Induktion des Gens 6 h nach Zugabe des Wachstumsfaktors noch nicht signifikant war (ANOVA, $p = 0,238$), ergab sich nachfolgend eine signifikante Erhöhung des basalen Transkriptionsniveaus um das 7-fache nach 24 h bis maximal um das ca. 110-fache 72 h (ANOVA, $p \leq 0,001$).

Die Zahlenwerte der Transkriptionsniveaus von *AP*, *osteocalcin* und *osterix* für die Induktion der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen sowie nach zeitabhängiger Induktion mit BMP-2 oder proBMP-2 sind in Tabelle 8.2 im Anhang (Seite 126) zusammengefasst. Sie sind jeweils normiert auf die basale Transkription in Kontrollzellen.

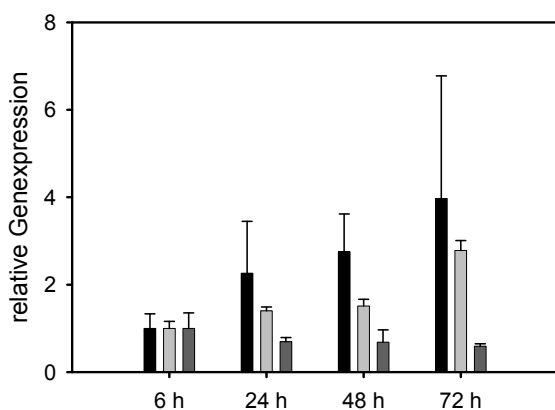


Abbildung 3.21.

Zeitabhängige Transkription von knochen-spezifischen Markergenen in nicht-stimulierten C2C12-Zellen. *Alkalische phosphatase* (schwarz), *osteocalcin* (hellgrau), *osterix* (dunkelgrau). Die Transkription nach 6 h wurde 1 gesetzt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Messungen.

Da die Transkription der Gene *AP*, *osteocalcin* und *osterix* in nicht-stimulierten Zellen während der Kultivierung über 72 h keine signifikante Erhöhung zeigte, ist bewiesen, dass die Induktion der knochenspezifischen Markergene ausschließlich auf die Stimulation mit BMP-2 oder proBMP-2 zurückzuführen ist (Abbildung 3.21). Für das Referenzgen *β -actin*

konnte weder bei konzentrationsabhängiger, noch bei zeitabhängiger Stimulation mit BMP-2 oder proBMP-2 eine signifikante Abhängigkeit beobachtet werden. Auch wurde kein Unterschied zwischen stimulierten und nicht-stimulierten Zellen erhalten (Abbildung 3.22 A, B).

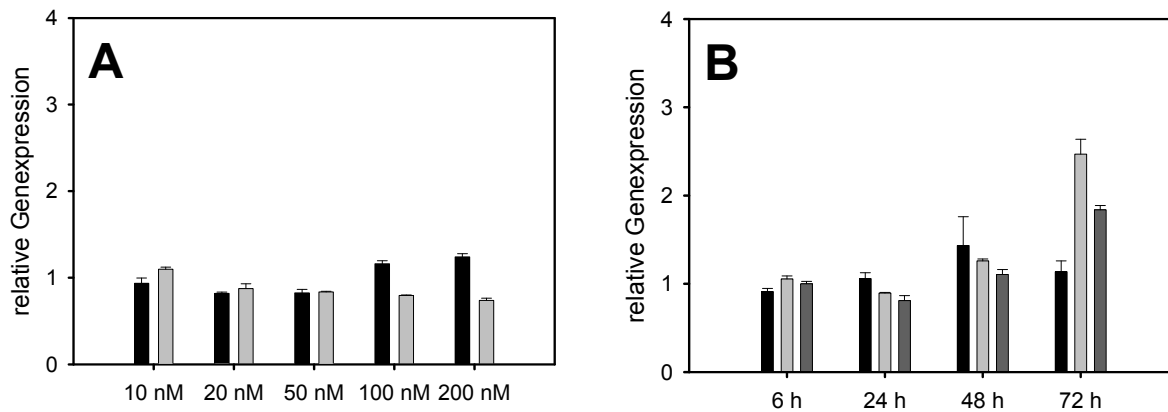


Abbildung 3.22. Transkription des Referenzgens β -actin. (A) nach Stimulation der Zellen mit den angegebenen Konzentrationen BMP-2 (schwarz) und proBMP-2 (grau); (B) nach zeitabhängiger Stimulation in BMP-2- (schwarz), proBMP-2- (grau) und nicht-stimulierten Zellen (dunkelgrau). Die Transkription in nicht-stimulierten Zellen bzw. nach 6 h wurde 1 gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Messungen.

3.5.2.3 Die konzentrationsabhängige Stimulation mit GDF-5 und proGDF-5

Es konnte gezeigt werden, dass proBMP-2 im Vergleich zum reifen Wachstumsfaktor eine geringere und zeitlich verzögerte, induzierende Wirkung auf die Transkription knochenspezifischer Gene hat. Weiterführend sollte nun überprüft werden, ob sich diese Beobachtungen auch auf verwandte Wachstumsfaktoren übertragen lassen. Ausgewählt wurde hierfür GDF-5 (*growth and differentiation factor-5*, auch CDMP1 – *cartilage-derived morphogenetic protein 1*). GDF-5 wird wie BMP-2 der TGF- β -Superfamilie zugeordnet und ist dem BMP-2 nah verwandt (46% Sequenzhomologie, 31% Sequenzidentität). Der Wachstumsfaktor spielt eine essentielle Rolle in der Embryonalentwicklung, indem es mesenchymale Zellen zur Differenzierung zu Chondrozyten anregt (Luyten, 1997). Außerdem ist GDF-5 an der Regulation der endochondralen Ossifikation beteiligt. Durch Induktion der Apoptose bewirkt GDF-5 die Trennung von Skelettvorläuferelementen und damit die Ausbildung von Gelenken (Francis-West *et al.*, 1999). Postnatal wird GDF-5 nur noch auf sehr geringem Niveau exprimiert. Welchem Zweck GDF-5 im adulten Organismus dann dient, konnte bisher nicht geklärt werden (Chang *et al.*, 1994). GDF-5 und proGDF-5,

das in diesen Studien verwendet wurde, wurde von Tino Thieme (Mitarbeiter der Arbeitsgruppe) bereitgestellt.

Nachfolgend wurde überprüft, ob die Stimulation mit GDF-5 einen induzierenden Effekt auf die Transkription der knochenspezifischen Markergene *AP*, *osteocalcin* und *osterix* in der myoblastischen Zelllinie C2C12 hat. Analog zu den Versuchen mit BMP-2 wurden die Zellen sowohl mit dem reifen Wachstumsfaktor als auch mit der Pro-Form stimuliert.

Abbildung 3.23 zeigt die Auswertung der Transkriptionsstudien mit GDF-5 und proGDF-5. Eine induzierende Wirkung konnte lediglich für das *AP*-Gen beobachtet werden, die für GDF-5 ab einer Konzentration von 20 nM signifikant war (ANOVA, $p \leq 0,001$) (Abbildung 3.23 A). Mit steigender Konzentration an GDF-5 erhöhte sich die Transkription in annähernd linearer Abhängigkeit von ca. 10-facher Erhöhung bei Stimulation mit 20 nM des Proteins bis ca. 80-facher Erhöhung bei Stimulation mit 100 nM.

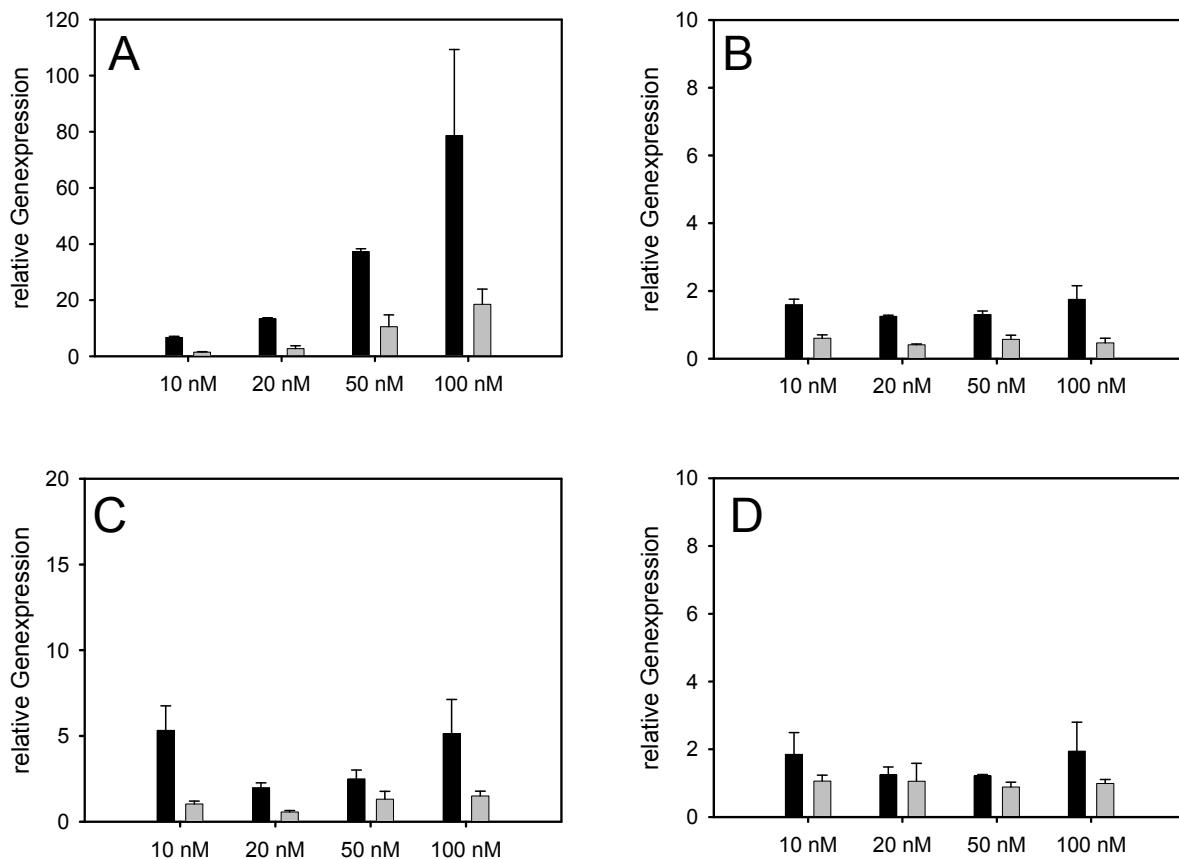


Abbildung 3.23. Relative Genexpression von knochenspezifischen Markergenen in C2C12-Zellen nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen GDF-5 (schwarz) oder proGDF-5 (grau). Untersucht wurde die Transkription von *AP* (A), *osteocalcin* (B) und *osterix* (C). *β-actin* (D) diente als Referenz-Gen. Die basale Transkription in nicht-induzierten Zellen wurde auf 1 gesetzt. Aufgetragen sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messungen.

Analog zu dem Verhalten, das für BMP-2/proBMP-2 beobachtet werden konnte, erfolgte die Induktion des *AP*-Gens durch proGDF-5 im Vergleich zu GDF-5 sowohl zeitlich verzögert als auch in geringerem Umfang. Eine signifikante Erhöhung der basalen Transkription wurde erst bei Stimulation mit 50 nM proGDF-5 erhalten (ANOVA, $p \leq 0,001$). Die maximale Induktion bei 100 nM proGDF-5 lag bei ca. 20-facher Erhöhung bezogen auf das Grundtranskriptionsniveau nicht-stimulierter Zellen.

Für *osteocalcin* und *osterix* ergab sich keine Erhöhung der basalen Transkription durch Stimulation mit dem Wachstumsfaktor oder der Pro-Form, selbst wenn für die Stimulation eine Konzentration von 100 nM eingesetzt wurde (Abbildung 3.23 B, C). Ebenso wurde auch für das Referenzgen *β -actin* keine konzentrationsabhängige Induktion beobachtet (Abbildung 3.23 D).

Da GDF-5 in seiner biologischen Aktivität stark von der von BMP-2 abweicht, war das geringere Potential von GDF-5 bei der Induktion knochenspezifischer Marker wenig überraschend. Eine vergleichende Aussage zur Aktivität von GDF-5 zu proGDF-5 kann anhand der vorliegenden Daten nur zur Transkription des AP-Gens getroffen werden. Für dieses Gen konnte ein ähnliches Verhalten wie durch Induktion mit BMP-2 oder proBMP-2 beobachtet werden, wenn auch auf geringerem Niveau. ProGDF-5 zeigt im Vergleich zu GDF-5 eine geringere und zeitlich verzögerte induzierende Wirkung. Ob dem ein vergleichbarer Mechanismus zugrunde liegt, wonach möglicherweise auch proGDF-5 prozessiert wird, müsste durch Studien zur Stabilität des Proteins unter Zellkulturbedingungen analog denen zu proBMP-2 belegt werden.

4 Diskussion

4.1 Die Optimierung der Rückfaltung von BMP-2 und proBMP-2

Für die Gewinnung von BMP-2 für die medizinische Therapie stehen grundsätzlich zwei verschiedene Systeme zur Verfügung: die rekombinante Expression in eukaryotischen oder prokaryotischen Systemen. Der wohl größte Vorteil der Expression in Eukaryoten ist die Tatsache, dass das Protein direkt in nativer Konformation aus der Zellmasse bzw. aus dem Kulturüberstand gewonnen und aufgereinigt werden kann. Allerdings sind die Expressionseffizienz und damit die Ausbeute relativ gering. Sie betrug beispielsweise bei der Expression von BMP-2 in transgenen Tabakpflanzen lediglich 1 mg natives BMP-2 pro kg Blattmaterial, was 0,02% der löslichen Gesamtproteinmenge entspricht (Suo *et al.*, 2006). Andere eukaryotische Systeme für die Produktion von BMP-2 sind mammalische Zelllinien (Hammonds *et al.*, 1991; Israel *et al.*, 1992) oder Insekten (Ishida *et al.*, 1994). Für die Gewinnung des unter dem Produktnamen InductOs[®] für die klinische Applikation vertriebenen BMP-2 wird die etablierte Ovarialzelllinie CHO (*Chinese hamster ovary*) verwendet (Pfizer AG, 2010). Aktuelle Daten zur Ausbeute in CHO-Zellen sind nicht publiziert. Als Vergleichswert kann möglicherweise die Ausbeute der Expression von BMP-7 in der Epithelzelllinie HEK 293T/17 dienen, die nach Optimierung mit 4,5 mg je l Kulturmedium bestimmt wurde (Bustos-Valenzuela *et al.*, 2010).

Eine Alternative bietet die rekombinante Herstellung von BMP-2 in *Escherichia coli*. Wichtige Vorteile der Expression in dem prokaryotischen Organismus sind die in der Regel einfachere, schnellere und kostengünstigere Kultivierung, sowie höhere Expressionsniveaus. Allerdings lässt das reduzierende cytosolische Milieu in *E. coli* die Ausbildung von Disulfidbrücken nicht zu. Das führt dazu, dass das rekombinante Protein in den Zellen inaktiv in Form von *inclusion bodies* abgelagert wird. Zur Gewinnung der nativen Spezies wird also im Vergleich zur eukaryotischen Expression durch die *in vitro*-Rückfaltung ein zusätzlicher Produktionsschritt notwendig.

Neben BMP-2 ist die Expression in *E. coli* auch für andere Proteine der Familie der BMPs beschrieben (Bessa *et al.*, 2009; Hillger *et al.*, 2005; Honda *et al.*, 2000; Klosch *et al.*, 2005; Long *et al.*, 2006; Vallejo und Rinas, 2004). Allerdings beinhalten nicht alle dieser Publikationen eine Beschreibung der Rückfaltungsprozedur. Wurde nur von einer chromatographischen Reinigung der als IB-Material erhaltenen Proteine ausgegangen, so erwies sich die resultierende biologische Aktivität als vergleichsweise gering. So wurde beispielsweise durch Induktion von C2C12-Zellen mit 500 ng/ml BMP-4 für fünf Tage lediglich eine zweifache Induktion der AP auf Ebene der Transkription erhalten (Bessa *et al.*,

2009). Dagegen führte eine durch Adenovirus-Infektion induzierte Expression von BMP-4 in C2C12-Zellen zu einer Erhöhung der AP-Aktivität um das ca. 70-fache (Cheng *et al.*, 2003). Auch wenn der experimentelle Rahmen in beiden Studien stark voneinander abweicht, ist doch der Unterschied ersichtlich und verdeutlicht die Notwendigkeit einer Rückfaltung der Proteine, wenn für ihre Produktion ein prokaryotisches Expressionssystem gewählt wurde. Bei der *in vitro*-Rückfaltung müssen mehrere Kriterien berücksichtigt werden, die im Labormaßstab und in der großtechnischen Anwendung ähnliche Relevanz haben. Dazu gehören im Wesentlichen die Faltungsausbeute und die Zeit, die der Faltungsprozess in Anspruch nimmt. Ein früheres Protokoll, das in der Arbeitsgruppe erarbeitet wurde, sah für die Renaturierung einen Zeitraum von bis zu 14 Tagen vor (Hillger *et al.*, 2005). Solch langen Inkubationszeiten sind im Labormaßstab zu tolerieren, aber im Hinblick auf industrielle Prozesse sehr kostenintensiv und sollten daher nach Möglichkeit vermieden werden. Durch Verringerung der Konzentration der Redoxkomponenten im Renaturierungspuffer konnte zunächst zwar die benötigte Zeit auf acht bis zehn Tage reduziert werden, aber erst durch das Zwei-Stufen-Protokoll konnte die Renaturierungszeit drastisch verringert werden (von Einem *et al.*, 2010). Durch zeitliche Trennung der intra- und intermolekularen Disulfidverbrückung konnte außerdem der Anteil an dimerer Spezies im Vergleich zu anderen publizierten Protokollen stark erhöht werden (Hillger *et al.*, 2005; Vallejo und Rinas, 2004). In Tabelle 4.1. sind die Ausbeuten und Prozesszeiträume vergleichend zusammengefasst.

Tabelle 4.1. Vergleich publizierter Renaturierungsprotokolle für BMP-2 (* keine Angaben)

Referenz	Anteil an dimerer Spezies vor der Reinigung	Ausbeute an nativer Spezies je eingesetztem IB-Protein	Renaturierungszeit
von Einem <i>et al.</i> , 2010	70-80%	30%	3 Tage
Hillger <i>et al.</i> , 2005	ca. 50%	25%	10-14 Tage
Vallejo und Rinas, 2004	43%	*	3 Tage

Der Vorteil gegenüber dem Protokoll nach Hillger *et al.*, 2005 liegt insbesondere in dem sehr viel geringeren Zeitaufwand. Die Ausbeute an nativer Proteinspezies in Bezug zum eingesetzten IB-Protein ließ sich trotz der verbesserten Dimerisierungsrate nur geringfügig erhöhen. Daten zur Ausbeute sind zum Protokoll nach Vallejo und Rinas, 2004 nicht publiziert. Wird eine vergleichbare Ausbeute angenommen, so besteht der Vorteil gegenüber dieser Methode vor allem in der Übertragbarkeit auf die Rückfaltung von proBMP-2. Während proBMP-2 im Faltungspuffer nach der Zusammensetzung nach Vallejo und Rinas, 2004 präzipitierte, konnte eine solches Verhalten bei Verwendung des Zwei-Stufen-

Protokolls nicht beobachtet werden. Möglicherweise ist das Protokoll aufgrund der sehr ähnlichen Struktur auch für die *in vitro*-Rückfaltung anderer Wachstumsfaktoren der TGF- β -Superfamilie aus IB-Material anwendbar.

4.2 Vergleichende Betrachtung der durch proBMP-2 oder BMP-2 induzierten AP-Aktivität

Wie zuvor schon erwähnt ist die Bestimmung der AP-Induktion ein Maß für die osteogene Aktivität von BMPs. Häufig zu diesem Zweck verwendet wird die Myoblasten-Zelllinie C2C12, aber auch andere, nicht-ausdifferenzierte Zelllinien oder Zelllinien des osteoblastischen Differenzierungswegs kommen dafür in Frage. Dazu gehören beispielsweise die humane Osteosarcom-Zelllinie MG-63 (Kawano *et al.*, 2011), die Prä-Osteoblast-Zelllinie MC3T3-E1 aus Maus (Lee *et al.*, 2010) und mesenchymale Stammzellen (MSC) (Luo *et al.*, 2010).

Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde die Fähigkeit der AP-Induktion durch Zugabe von BMP-2 in C2C12-Zellen dafür genutzt, die biologische Aktivität des rekombinant gewonnenen Proteins nachzuweisen. Eine Erhöhung der AP-Aktivität im Vergleich zu unbehandelten Zellen konnte bereits bei einer Konzentration von 2 nM BMP-2 beobachtet werden. Eine maximale AP-Induktion wurde bei Verwendung von 100-200 nM Wachstumsfaktor erreicht. Dies entspricht Proteinkonzentrationen, die weit über dem physiologischen Bereich liegen. Allerdings werden in Tierversuchen Mengen appliziert, die am Wirkort in noch höheren Konzentrationen resultieren. Beispielsweise wurden zur Untersuchung des Einflusses von BMP-2 bei der Regeneration von Defekten kritischer Größe im Kiefer von Hunden bis zu 0,8 mg des Wachstumsfaktors verwendet (Wikesjö *et al.*, 1999). In Primaten der Gattung *Macaca fascicularis* wurden bis zu 1,8 mg im Bereich des Defekts appliziert (Boyne, 1996). Bei der klinischen Anwendung im Menschen werden sogar insgesamt bis zu 12 mg BMP-2 verwendet (Aro *et al.*, 2011; Pfizer AG, 2010). Daher wurde in Zellkulturversuchen im Rahmen der Arbeit BMP-2 in einem Konzentrationsbereich von 100-200 nM eingesetzt, um eine maximale Wirkung zu erzielen.

Die BMP-2-induzierte AP-Aktivität konnte durch Zugabe von proBMP-2 reduziert werden. Diese inhibierende Wirkung ist auf die Konkurrenz von BMP-2 und proBMP-2 um die Bindung an BMP-Rezeptor IA zurückzuführen, einen der Hauptrezeptoren von BMP-2 (Massagué, 1998; Nohe *et al.*, 2004; ten Dijke *et al.*, 1993). Durch Studien innerhalb der Arbeitsgruppe konnte die Interaktion von proBMP-2 mit der BMPR-IA-ECD *in vitro* durch Oberflächenplasmonresonanz-Experimente nachgewiesen und mittels ELISA bestätigt werden. In Zellkultur mit COS-7-Zellen konnte mittels chemischer Quervernetzung ein Komplex aus proBMP-2 und BMPR-IA gefunden und somit die *in vitro*-Ergebnisse belegt werden (Hauburger *et al.*, 2009). Obwohl für die Komplexe von BMPR-IA-ECD und BMP-2

bzw. proBMP-2 Dissoziationskonstanten in vergleichbarer Größenordnung bestimmt wurden (0,9 nM bzw. 4,0 nM) waren Unterschiede in der Signalwirkung zu beobachten. Diese sind vermutlich darauf zurückzuführen, dass für proBMP-2 keine Interaktion mit dem Typ II-Rezeptor BMPRII nachgewiesen werden konnte (Hauburger *et al.*, 2009). Daraus ergaben sich auch Unterschiede zwischen BMP-2 und proBMP-2 in der bevorzugten Art der Signalwirkung. Es ist bekannt, dass der reife Wachstumsfaktor sowohl mit bestehenden Rezeptorkomplexen (PFC) interagieren, als auch die Ausbildung des Rezeptorkomplexes induzieren kann (BISC) (Gilboa *et al.*, 2000; Nohe *et al.*, 2002). Intrazellulär führt die Interaktion von BMP-Liganden mit PFCs zur Aktivierung des Smad 1/5/8-Signalwegs, während die Ausbildung von BISCs zur Aktivierung des p38/MAPK-Signalwegs führt (siehe auch Kapitel 1.1.2, Seite 9f).

Durch Zugabe von proBMP-2 konnte in C2C12-Zellen eine Phosphorylierung von Smad 1/5/8 und damit eine Aktivierung des Smad-Signalwegs nachgewiesen werden. Allerdings waren dafür Konzentrationen von 200 nM notwendig. Bei einer Konzentration von 10 nM proBMP-2, einer wahrscheinlich physiologischen Konzentration, war zwar keine Smad 1/5/8-Phosphorylierung zu beobachten. Allerdings konnte im Rahmen eines Luciferase-Reportergenexperiments nach Nohe *et al.*, 2002 eine Aktivierung des Smad 1/5/8-Signalwegs nachgewiesen werden, wenn zur Induktion mindestens 10 nM proBMP-2 eingesetzt wurden (Hauburger *et al.*, 2009). Bei Untersuchungen des p38/MAPK-Signalwegs konnte durch proBMP-2 keine Aktivierung beobachtet werden (Hauburger, 2010; Hauburger *et al.*, 2009). Da gezeigt werden konnte, dass die Induktion der AP über eine p38-abhängige Signalkaskade erfolgt (Guicheux *et al.*, 2003; Hsu *et al.*, 2007), ist das Ergebnis, dass eine Induktion mit proBMP-2 nicht zu einer p38-Phosphorylierung führt, konsistent mit der Beobachtung, dass der Wachstumsfaktor in einem Induktionszeitraum von vier Tagen zu keiner AP-Induktion in C2C12-Zellen führte.

Dass die BMP-2-induzierte AP-Aktivität nicht nur durch proBMP-2 sondern auch durch das Propeptid inhibiert werden konnte, unterstützt die bisherigen Erkenntnisse. Es konnte gezeigt werden, dass BMP-2 das Propeptid binden kann. Für die Bindung wurde mittels Oberflächenplasmonresonanz eine Dissoziationskonstante von 28 nM bestimmt. Die nicht-kovalente Interaktion von BMP-2 und dem Propeptid wurde des Weiteren durch chemische Quervernetzung *in vitro* bestätigt (Hauburger, 2010). Die Inhibierung der BMP-2-induzierten AP-Aktivität durch Zugabe des Propeptids war deutlich besser als die durch proBMP-2. Durch proBMP-2 konnte im fünffachen molaren Überschuss eine Inhibierung um ca. 70% erreicht werden, während mit dem Propeptid in zweifachem molaren Überschuss die BMP-2-induzierte AP-Aktivität um ca. 90% reduziert war. Dies lässt sich dadurch erklären, dass hier wahrscheinlich zwei Faktoren zusammen kommen. Zum einen wird BMP-2 durch Interaktion mit dem Propeptid in eine Latenzform überführt und damit inaktiviert. Zum anderen könnte

das nicht-kovalente Propeptid-BMP-2 ebenso wie proBMP-2 in der Lage sein, mit BMP-2 um die Bindung an den Typ I-Rezeptor zu konkurrieren. Die Beobachtung, dass eine Vorinkubation mit dem Propeptid die Interaktion von BMP-2 mit dem Typ II-Rezeptor inhibiert, unterstützt diese Hypothese (Hauburger *et al.*, 2009).

Vor dem Hintergrund der beschriebenen Erkenntnisse ist die Induktion der AP-Aktivität in C2C12-Zellen, die nach Zugabe von proBMP-2 für einen Zeitraum von mehr als fünf Tagen beobachtet wurde, wahrscheinlich auf eine Prozessierung des Proteins und der Aktivität der reifen Form zurückzuführen. Darauf soll im Folgenden eingegangen werden.

4.3 Stabilität von proBMP-2 und BMP-2 unter Zellkulturbedingungen und Internalisierung in C2C12-Zellen

In einer früheren Arbeit der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass proBMP-2 in Ratten die ektope Knochenneubildung auslösen kann (Hillger *et al.*, 2005). Dazu wurden insgesamt ca. 10 mg des Wachstumsfaktors in einen Keramikträger mit einem Volumen von 0,5 cm³ eingebracht und den Versuchstieren implantiert. Während der histologischen Auswertung des Versuchs nach 30 Tagen konnte neben dem neugebildeten Knochen auch Knochenmark nachgewiesen werden. Eine vergleichbare Aktivität ist auch für BMP-2 bekannt. ProBMP-2 konnte jedoch in einem Versuch, der zur Bestimmung der biologischen Aktivität von BMP-2 eingesetzt wird, das Knochenmarkerenzym AP nur bei Verlängerung des zeitlichen Rahmens des Experimentes induzieren. Daher wurde vermutet, dass eine Prozessierung von proBMP-2 durch extrazelluläre Proteasen für die Aktivität verantwortlich sein könnte. Eine solche Prozessierung ist bereits für den phylogenetisch verwandten Wachstumsfaktor Nodal beschrieben worden (Beck *et al.*, 2002). In dieser Studie wurde nachgewiesen, dass die Propeptidkonvertasen Furin und Pace4 (*paired amino acid cleaving enzyme 4*) die Prozessierung von Nodal nach der Sekretion stimulieren. Reifes Nodal wird sehr schnell durch Endocytose in die Zellen aufgenommen, während die unprozessierte Pro-Form nur sehr langsam internalisiert wird (Blanchet *et al.*, 2008).

Um zu untersuchen, ob im Fall von proBMP-2 ebenfalls eine Prozessierung durch extrazelluläre Proteasen stattfindet, wurde die Stabilität des Wachstumsfaktors unter Zellkulturbedingungen getestet. Es zeigte sich, dass proBMP-2 sehr schnell internalisiert und in den Zellen prozessiert wird. Eine Internalisierung des reifen Wachstumsfaktors konnte bereits zuvor nachgewiesen werden (Jortikka *et al.*, 1997). Mittels radioaktiv markierten Liganden wurde die Internalisierung von BMPs in L6-Myoblasten untersucht, und es konnte beobachtet werden, dass bei der Aufnahme der Wachstumsfaktoren innerhalb von zwei Stunden ein Plateau erreicht wurde. Dies ist vergleichbar mit den Beobachtungen, die für BMP-2 bei der Aufnahme in C2C12-Myoblasten gemacht werden konnten. Bei der

Internalisierung von proBMP-2 war dagegen erst nach ca. 15 h ein Maximalwert zu beobachten. In Anbetracht dessen, dass die Internalisierung der Wachstumsfaktoren mit der Internalisierung der spezifischen Rezeptoren in Verbindung gebracht wird, könnte diese Verzögerung mit den bereits erläuterten Unterschieden von BMP-2 und proBMP-2 bei der Rezeptorbindung erklärt werden (Hartung *et al.*, 2006; Zwang und Yarden, 2009).

Diese Unterschiede erklären ferner auch die voneinander abweichende Internalisierung von BMP-2 und proBMP-2 unter dem Einwirken spezifischer Inhibitoren für die clathrin-abhängige und die rezeptor-vermittelte Endozytose. Während bei der Inhibierung der rezeptor-vermittelten Endocytose beide Wachstumsfaktoren eine annähernd gleiche Effizienz zeigten, war die Inhibierung der clathrin-abhängigen Endocytose für BMP-2 deutlich stärker als für proBMP-2. Bei dieser Art der Internalisierung werden die Liganden vermutlich in rezeptor-gebundener Form zusammen mit den Rezeptoren in die Zelle aufgenommen. Eine clathrin-abhängige Internalisierung ist für viele Rezeptoren der TGF- β -Superfamilie beschrieben und kann unabhängig von einer Ligandbindung sein. Dies ist beispielsweise für Typ I- und Typ II-TGF- β -Rezeptor (T β RI und T β RII) dokumentiert. Bei diesen beiden Rezeptoren konnte gezeigt werden, dass eine clathrin-vermittelte Endocytose zu einer verstärkten Signalwirkung führt, während die clathrin-unabhängige Endocytose eine Degradierung des Rezeptors bewirkt (Di Guglielmo *et al.*, 2003; Penheiter *et al.*, 2002; Razani *et al.*, 2001). Für die BMP-Rezeptoren I und II ist eine kontinuierliche Internalisierung mittels clathrin-vermittelter Endocytose ebenfalls dokumentiert (Hartung *et al.*, 2006). Darüber hinaus ist in derselben Studie beschrieben, dass BMPRII zusätzlich auch über einen caveola-abhängigen Weg internalisiert wird. Caveolae sind Membraneinstülpungen, über deren Beteiligung an Endocytosevorgängen in der Zelle in der Literatur kontrovers diskutiert wird (Parton, 2003; Pelkmans *et al.*, 2001; Thomsen *et al.*, 2002). Die unterschiedliche Affinität von BMP-2 und proBMP-2 zu den Rezeptoren BMPRI und II sowie die Unterschiede in der Internalisierung dieser Rezeptoren sind Faktoren, die die unterschiedlichen Effekte der Endocytose-Inhibitoren bei der Internalisierung der beiden Proteinen erklären können.

Eine weitere wichtige Beobachtung, die während der Untersuchungen zur Internalisierung von proBMP-2 gemacht werden konnte, ist die Prozessierung des Wachstumsfaktors zur reifen Form. Vergleichbare Ergebnisse zur Endocytose und Prozessierung von Pro-Formen von BMPs sind bislang nicht veröffentlicht. Untersuchungen zur Internalisierung sind jedoch für die Pro-Formen der Wachstumsfaktoren TGF- α (*transforming growth factor- α*) und NGF (*nerve growth factor*) beschrieben. TGF- α gehört zur Protein-Familie der EGFR (*epidermal growth factor receptor*)-Liganden. Das Protein wird als Transmembranprotein synthetisiert, das als pro-TGF- α bezeichnet wird. Die Freisetzung der extrazellulären Domäne erfolgt durch proteolytische Spaltung durch TNF (*tumor necrosis factor*)- α -kovertierendes Enzym (Peschon *et al.*, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass pro-TGF- α mittels clathrin-

abhängiger Endocytose internalisiert und durch endosomalen Transport wieder zur Zelloberfläche gebracht wird (Martinez-Arca *et al.*, 2005).

Das Neurotrophin NGF gehört zu den Wachstumsfaktoren der NGF- β -Familie und ist wie BMP-2 ein Cystinknoten-Protein. Eine Besonderheit des Proteins ist, dass die unprozessierte Pro-Form eine gegensätzliche biologische Aktivität zur reifen Form aufweist. Während NGF das Überleben von Nervenzellen vermittelt, wirkt proNGF proapoptotisch (Ibanez, 2002; Nykjaer *et al.*, 2004). Die widersprüchliche Beobachtung, dass proNGF eine regenerative Wirkung auf Oligodendrozyten hatte, konnte mittels Untersuchungen zur Endocytose und intrazellulären Prozessierung des Proproteins aufgeklärt werden (Althaus und Kloppner, 2006; Althaus *et al.*, 1992; Boutilier *et al.*, 2008). Die biologische Aktivität von NGF beruht auf der Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden nach Bindung an die extrazelluläre Domäne von Transmembranrezeptoren. Eine Sekretion des intrazellulär prozessierten NGF wird daher vermutet.

Während der Untersuchung zur Internalisierung und Prozessierung von proBMP-2 konnte eine vergleichbare Beobachtung gemacht werden. Im Kulturüberstand von Zellen, die mit proBMP-2 induziert worden waren, konnte mit anti-rhBMP-2-Antikörpern eine immun-reaktive Bande sichtbar gemacht werden, die im Laufverhalten reifem BMP-2 entsprach. Auf diese Weise ließ sich die im Vergleich zu BMP-2 zeitverzögerte und geringere Aktivität von proBMP-2 bei der Induktion der AP in C2C12-Zellen erklären. Ob dies auch bei anderen Knochenmarkern der Fall ist, wurde durch Untersuchung der Wirkung von proBMP-2 im Vergleich zu BMP-2 auf die Transkription der entsprechenden Gene überprüft. Diese Ergebnisse sollen im Folgenden diskutiert werden.

4.4 Die durch Zugabe von proBMP-2 induzierte Transkription knochenspezifischer Markergene

Bei der Untersuchung der Transkription knochenspezifischer Markergene in C2C12-Zellen nach Zugabe von proBMP-2 wurde zunächst die Transkription des AP-Gens betrachtet. Nachdem die Analyse der AP auf Proteinebene nach Zugabe von proBMP-2 eine im Vergleich zur Wirkung von BMP-2 zeitverzögerte und geringere Induktion ergab, konnte dieses Ergebnis bei Untersuchungen zur Transkription des AP-Gens bestätigt werden. Vor dem Hintergrund der Beobachtung, dass proBMP-2 internalisiert und in den Zellen prozessiert wird, deutet dies darauf hin, dass nicht proBMP-2, sondern die prozessierte und sekretierte, reife Proteinspezies für die biologische Aktivität des Wachstumsfaktors verantwortlich ist. Anhand der Zelllinie MC3T3-E1 war nachgewiesen worden, dass die Induktion der AP über den p38/MAPK-Signalweg erfolgt (Guicheux *et al.*, 2003). Da gezeigt werden konnte, dass proBMP-2 im Gegensatz zu BMP-2 in C2C12-Zellen nicht in der Lage

ist, den p38/MAPK-Signalweg zu induzieren, bestätigt das die Vermutung (Hauburger *et al.*, 2009).

Die Induktion von Osteocalcin erfolgt ebenfalls über eine BMP-2-abhängige Aktivierung des p38/MAPK-Signalwegs (Guicheux *et al.*, 2003). Daher war das ähnliche Verhalten bei der Induktion der Transkription von *osteocalcin* nach Zugabe von proBMP-2 und BMP-2 ein erwartetes Ergebnis. Auch bei diesem Knochenmarker erfolgte die Induktion des Gens, die durch Einwirken von proBMP-2 erreicht wurde, zu einem späteren Zeitpunkt als die BMP-2-induzierte Erhöhung des Transkriptionsniveaus. Auch waren im Vergleich höhere Konzentrationen an proBMP-2 notwendig, um in einer ähnlichen Induktion zu resultieren wie durch BMP-2. Dass das Messsignal für die Induktion von Osteocalcin geringer war als das für AP, wurde auch schon zuvor berichtet (Guicheux *et al.*, 2003; Kawaguchi *et al.*, 2005).

Die Zuordnung der untersuchten Knochenmarkergene zu einem spezifischen Signalweg soll hier allerdings nur unter Vorbehalt erfolgen. Das Thema wird aufgrund seiner Komplexität in der Literatur kontrovers diskutiert, und es konnte gezeigt werden, dass die BMP-2-induzierte Aktivierung der verschiedenen Signalwege in Abhängigkeit von der untersuchten Zelllinie sehr unterschiedlich sein kann. So konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass BMP-2 in der Myoblasten-Zelllinie C2C12 den p38- und den ERK- (*extracellular signal-regulated kinase*) vermittelten MAPK-Signalweg induziert, nicht aber den über JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) vermittelten Weg (Gallea *et al.*, 2001; Vinals *et al.*, 2002). Dagegen wurde für die Präosteoblasten-Zelllinie MC3T3-E1 nachgewiesen, dass nach Stimulierung mit BMP-2 der p38- und JNK-abhängige MAPK-Signalweg aktiviert wird, während der Wachstumsfaktor nur geringen Einfluss auf die Aktivierung von ERK hatte (Guicheux *et al.*, 2003). Die Rolle von ERK wird in der Literatur verschieden beschrieben. Zum einen ist nachgewiesen worden, dass es sich hier um einen Negativ-Regulator der BMP-induzierten Transdifferenzierung von C2C12 und MC3T3-E1 handelt (Higuchi *et al.*, 2002; Kozawa *et al.*, 2002). Zum anderen wird aber auch berichtet, dass die Inhibierung des ERK/MAPK-Signalwegs die BMP-induzierte Genexpression von Knochenmarkern inhibiert, und ERK somit für die Differenzierung zu Osteoblasten notwendig ist (Jaiswal *et al.*, 2000; Lai *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 2002).

Von Osterix und Runx2 ist bekannt, dass sie übergeordnete Regulatoren für die Transdifferenzierung zu Osteoblasten darstellen, wobei Osterix wahrscheinlich *downstream* von Runx2 wirkt (Komori *et al.*, 1997; Nakashima *et al.*, 2002; Otto *et al.*, 1997). Im Hinblick darauf war es überraschend, dass die BMP-2-induzierte Erhöhung des Transkriptionsniveaus von *osterix* zum frühesten untersuchten Zeitpunkt von sechs Stunden unter dem des AP-Gens lag. Es wäre zu erwarten gewesen, dass *osterix* zu frühen Zeitpunkten die stärkste Induktion durch BMP-2 erfährt. Die Ursache ist wahrscheinlich darin zu suchen, dass der gewählte Zeitraum für die Untersuchung einer frühen Antwort auf die

Induktion mit dem Wachstumsfaktor zu lang war. In mesenchymalen Stammzellen wird die BMP-2-induzierte Erhöhung der Osterix-Expression durch p38, nicht aber durch ERK vermittelt (Nakashima *et al.*, 2002). Eine p38-Phosphorylierung war in C2C12-Zellen bereits 15 Minuten nach Zugabe von BMP-2 beobachtet worden (Hauburger *et al.*, 2009).

Unerwartet war das Ergebnis, dass im Fall des Transkriptionsfaktors Runx2/Cbfa1 ein sehr hohes basales Transkriptionsniveau beobachtet wurde und daraus folgend keine induzierende Wirkung durch BMP-2 oder proBMP-2 ermittelt werden konnte. Literaturangaben hierzu sind widersprüchlich. Einige Studien berichten von einer BMP-induzierten Erhöhung von Runx2 sowohl auf Proteinebene als auch auf Ebene der Transkription (Lee *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2008). Allerdings ist auch schon dokumentiert, dass während der osteoblastischen Differenzierung die Menge an Runx2 unverändert bleibt und die Funktionalität des Transkriptionsfaktors auf eine Phosphorylierung und Erhöhung der DNA-Bindung zurückzuführen ist (Shui *et al.*, 2003). Die Runx2-Phosphorylierung durch ERK-abhängige MAP-Kinasen ist nachgewiesen (Ge *et al.*, 2009).

Bei vergleichender Betrachtung der induktiven Wirkung von BMP-2 und proBMP-2 auf die Transkription von *AP*, *osteocalcin* und *osterix* war für die untersuchten Gene eine vergleichbare Abhängigkeit zu beobachten. Die Erhöhung des Transkriptionsniveaus nach Zugabe von proBMP-2 setzte in jedem Fall später ein als die nach Zugabe von BMP-2. Desweiteren waren höhere Konzentrationen an proBMP-2 notwendig, um zu einer vergleichbaren Induktion zu führen, wie die Zugabe von BMP-2. Die Verwendung von 50-200 nM proBMP-2 führte zu einer nahezu konstanten Erhöhung des Transkriptionsniveaus der untersuchten Gene. Dies unterstützt die Hypothese, dass nicht proBMP-2, sondern die prozessierte und sekretierte, reife Form für die beobachtete biologische Aktivität verantwortlich ist.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Protokoll erarbeitet werden, mit dem sich rekombinant in *E. coli* hergestelltes, authentisches proBMP-2 mit verbesserter Ausbeute und geringerem Zeitaufwand gegenüber etablierten Protokollen in nativer Form gewinnen lässt. Dieses Protokoll ist ferner übertragbar auf die *in vitro*-Rückfaltung von reifem BMP-2 und möglicherweise auch anderen Wachstumsfaktoren der BMP-Familie. Desweiteren konnten Fragestellungen zur biologischen Wirksamkeit von proBMP-2 während der Differenzierung zu Osteoblasten geklärt werden.

1. Zunächst wurde ein Expressionskonstrukt für proBMP-2 hergestellt, das die rekombinante Expression als authentischem, *tag*-freiem Protein erlaubte.
2. Es wurde ein Zwei-Stufen-Protokoll für die *in vitro*-Rückfaltung von BMP-2 und proBMP-2 aus *inclusion body*-Material erarbeitet. Das Protokoll sieht eine Trennung von intra- und intermolekularer Disulfidverbrückung vor und ist anderen publizierten Protokollen hinsichtlich Faltungsausbeute und Prozesszeit überlegen.
3. Das Reinigungsprotokoll für proBMP-2 wurde dahingehend optimiert, dass ein endotoxinfreies Produkt gewonnen wurde.
4. Es konnte gezeigt werden, dass proBMP-2 die durch BMP-2-Zugabe induzierte Aktivität der Alkalischen Phosphatase inhibieren kann. Eine inhibierende Wirkung der BMP-2-induzierten AP-Aktivität wurde auch durch das isolierte BMP-2-Propeptid erhalten.
5. Durch Zugabe von proBMP-2 konnte in C2C12-Zellen eine Induktion der AP nachgewiesen werden, wenn die Inkubationszeit der Zellen mit dem Wachstumsfaktor verlängert wurde.
6. Es wurde nachgewiesen, dass proBMP-2 und BMP-2 in C2C12- und b/C3T3-Zellen internalisiert wird. ProBMP-2 wird in den Zellen prozessiert und als reifes BMP-2 sekretiert. Die Internalisierung konnte durch Inhibierung der Endocytose vermindert werden. Dabei zeigten BMP-2 und proBMP-2 eine unterschiedliche Abhängigkeit vom Endocytoseweg.
7. ProBMP-2 konnte die Transkription der knochenspezifischen Markergene *alkalische phosphatase*, *osteocalcin* und *osterix* induzieren. Die Induktion war im Vergleich zur Wirkung von BMP-2 zeitverzögert und geringer.

Die Arbeit stellt für Überlegungen, ob sich proBMP-2 als therapeutischer Wirkstoff eignet, eine Basis dar. Nachfolgend sollte geklärt werden, ob die Prozessierung von proBMP-2, die im Zellkulturmodell nachgewiesen wurde, auch in einer komplexeren Umgebung im Tierversuch beobachtet werden kann.

6 Literaturverzeichnis

- Akiyama, S., Katagiri, T., Namiki, M., Yamaji, N., Yamamoto, N., Miyama, K., Shibuya, H., Ueno, N., Wozney, J.M. und Suda, T. 1997. Constitutively active BMP type I receptors transduce BMP-2 signals without the ligand in C2C12 myoblasts. *Exp Cell Res* 235: 362-9
- Althaus, H.H. und Kloppner, S. 2006. Mature pig oligodendrocytes rapidly process human recombinant pro-nerve growth factor and do not undergo cell death. *J Neurochem* 98: 506-17
- Althaus, H.H., Kloppner, S., Schmidt-Schultz, T. und Schwartz, P. 1992. Nerve growth factor induces proliferation and enhances fiber regeneration in oligodendrocytes isolated from adult pig brain. *Neurosci Lett* 135: 219-23
- Aoki, H., Fujii, M., Imamura, T., Yagi, K., Takehara, K., Kato, M. und Miyazono, K. 2001. Synergistic effects of different bone morphogenetic protein type I receptors on alkaline phosphatase induction. *J Cell Sci* 114: 1483-9
- Arnold, U. und Ulbrich-Hofmann, R. 1999. Quantitative protein precipitation from guanidine hydrochloride-containing solutions by sodium deoxycholate/trichloroacetic acid. *Anal Biochem* 271: 197-9
- Aro, H.T., Govender, S., Patel, A.D., Hernigou, P., Perera de Gregorio, A., Popescu, G.I., Golden, J.D., Christensen, J. und Valentin, A. 2011. Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2: A Randomized Trial in Open Tibial Fractures Treated with Reamed Nail Fixation. *J Bone Joint Surg Am*
- Avsian-Kretchmer, O. und Hsueh, A.J. 2004. Comparative genomic analysis of the eight-membered ring cystine knot-containing bone morphogenetic protein antagonists. *Mol Endocrinol* 18: 1-12
- Bajorunaite, E., Sereikaite, J. und Bumelis, V.A. 2007. L-arginine suppresses aggregation of recombinant growth hormones in refolding process from *E. coli* inclusion bodies. *Protein J* 26: 547-55
- Beck, S., Le Good, J.A., Guzman, M., Ben Haim, N., Roy, K., Beermann, F. und Constam, D.B. 2002. Extraembryonic proteases regulate Nodal signalling during gastrulation. *Nat Cell Biol* 4: 981-5
- Benglis, D., Wang, M.Y. und Levi, A.D. 2008. A comprehensive review of the safety profile of bone morphogenetic protein in spine surgery. *Neurosurgery* 62: ONS423-31; discussion ONS431
- Bessa, P.C., Cerqueira, M.T., Rada, T., Gomes, M.E., Neves, N.M., Nobre, A., Reis, R.L. und Casal, M. 2009. Expression, purification and osteogenic bioactivity of recombinant human BMP-4, -9, -10, -11 and -14. *Protein Expr Purif* 63: 89-94
- Birnboim, H.C. und Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-23
- Bishop, G.B. und Einhorn, T.A. 2007. Current and future clinical applications of bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery. *Int Orthop* 31: 721-7

- Blanchet, M.H., Le Good, J.A., Mesnard, D., Oorschot, V., Baflast, S., Minchiotti, G., Klumperman, J. und Constam, D.B. 2008. Cripto recruits Furin and PACE4 and controls Nodal trafficking during proteolytic maturation. *Embo J* 27: 2580-91
- Blau, H.M., Pavlath, G.K., Hardeman, E.C., Chiu, C.P., Silberstein, L., Webster, S.G., Miller, S.C. und Webster, C. 1985. Plasticity of the differentiated state. *Science* 230: 758-66
- Bottinger, E.P., Factor, V.M., Tsang, M.L., Weatherbee, J.A., Kopp, J.B., Qian, S.W., Wakefield, L.M., Roberts, A.B., Thorgeirsson, S.S. und Sporn, M.B. 1996. The recombinant proregion of transforming growth factor beta1 (latency-associated peptide) inhibits active transforming growth factor beta1 in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 5877-82
- Boutillier, J., Ceni, C., Pagdala, P.C., Forgie, A., Neet, K.E. und Barker, P.A. 2008. Proneurotrophins require endocytosis and intracellular proteolysis to induce TrkA activation. *J Biol Chem* 283: 12709-16
- Boyne, P.J. 1996. Animal studies of application of rhBMP-2 in maxillofacial reconstruction. *Bone* 19: 83S-92S
- Brinkmann, U., Mattes, R.E. und Buckel, P. 1989. High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the *dnaY* gene product. *Gene* 85: 109-14
- Brown, M.A., Zhao, Q., Baker, K.A., Naik, C., Chen, C., Pukac, L., Singh, M., Tsareva, T., Parice, Y., Mahoney, A., Roschke, V., Sanyal, I. und Choe, S. 2005. Crystal structure of BMP-9 and functional interactions with pro-region and receptors. *J Biol Chem* 280: 25111-8
- Brunet, L.J., McMahon, J.A., McMahon, A.P. und Harland, R.M. 1998. Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science* 280: 1455-7
- Brunner, A.M., Marquardt, H., Malacko, A.R., Lioubin, M.N. und Purchio, A.F. 1989. Site-directed mutagenesis of cysteine residues in the pro region of the transforming growth factor beta 1 precursor. Expression and characterization of mutant proteins. *J Biol Chem* 264: 13660-4
- Bustos-Valenzuela, J.C., Halcsik, E., Bassi, E.J., Demasi, M.A., Granjeiro, J.M. und Sogayar, M.C. 2010. Expression, purification, bioactivity, and partial characterization of a recombinant human bone morphogenetic protein-7 produced in human 293T cells. *Mol Biotechnol* 46: 118-26
- Cao, X. und Chen, D. 2005. The BMP signaling and in vivo bone formation. *Gene* 357: 1-8
- Chang, S.C., Hoang, B., Thomas, J.T., Vukicevic, S., Luyten, F.P., Ryba, N.J., Kozak, C.A., Reddi, A.H. und Moos, M., Jr. 1994. Cartilage-derived morphogenetic proteins. New members of the transforming growth factor-beta superfamily predominantly expressed in long bones during human embryonic development. *J Biol Chem* 269: 28227-34
- Chen, C., Grzegorzewski, K.J., Barash, S., Zhao, Q., Schneider, H., Wang, Q., Singh, M., Pukac, L., Bell, A.C., Duan, R., Coleman, T., Duttaroy, A., Cheng, S., Hirsch, J., Zhang, L., Lazard, Y., Fischer, C., Barber, M.C., Ma, Z.D., Zhang, Y.Q., Reavey, P., Zhong, L., Teng, B., Sanyal, I., Ruben, S.M., Blondel, O. und Birse, C.E. 2003. An

- integrated functional genomics screening program reveals a role for BMP-9 in glucose homeostasis. *Nat Biotechnol* 21: 294-301
- Chen, C.L., Hou, W.H., Liu, I.H., Hsiao, G., Huang, S.S. und Huang, J.S. 2009. Inhibitors of clathrin-dependent endocytosis enhance TGFbeta signaling and responses. *J Cell Sci* 122: 1863-71
- Chen, D., Zhao, M. und Mundy, G.R. 2004a. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 22: 233-41
- Chen, H., Shi, S., Acosta, L., Li, W., Lu, J., Bao, S., Chen, Z., Yang, Z., Schneider, M.D., Chien, K.R., Conway, S.J., Yoder, M.C., Haneline, L.S., Franco, D. und Shou, W. 2004b. BMP10 is essential for maintaining cardiac growth during murine cardiogenesis. *Development* 131: 2219-31
- Cheng, H., Jiang, W., Phillips, F.M., Haydon, R.C., Peng, Y., Zhou, L., Luu, H.H., An, N., Breyer, B., Vanichakarn, P., Szatkowski, J.P., Park, J.Y. und He, T.C. 2003. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am* 85-A: 1544-52
- Chi, M.M., Schlein, A.L. und Moley, K.H. 2000. High insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and insulin concentrations trigger apoptosis in the mouse blastocyst via down-regulation of the IGF-1 receptor. *Endocrinology* 141: 4784-92
- Clark, J. und Steiner, D.F. 1968. Studies on the biosynthesis of insulin in the rat. *Diabetes* 17: 309-10
- Cui, Y., Jean, F., Thomas, G. und Christian, J.L. 1998. BMP-4 is proteolytically activated by furin and/or PC6 during vertebrate embryonic development. *Embo J* 17: 4735-43
- Daluiski, A., Engstrand, T., Bahamonde, M.E., Gamer, L.W., Agius, E., Stevenson, S.L., Cox, K., Rosen, V. und Lyons, K.M. 2001. Bone morphogenetic protein-3 is a negative regulator of bone density. *Nat Genet* 27: 84-8
- De Crescenzo, G., Grothe, S., Zwaagstra, J., Tsang, M. und O'Connor-McCourt, M.D. 2001. Real-time monitoring of the interactions of transforming growth factor-beta (TGF-beta) isoforms with latency-associated protein and the ectodomains of the TGF-beta type II and III receptors reveals different kinetic models and stoichiometries of binding. *J Biol Chem* 276: 29632-43
- De Luca, F., Barnes, K.M., Uyeda, J.A., De-Levi, S., Abad, V., Palese, T., Mericq, V. und Baron, J. 2001. Regulation of growth plate chondrogenesis by bone morphogenetic protein-2. *Endocrinology* 142: 430-6
- Deckers, M.M., van Bezooijen, R.L., van der Horst, G., Hoogendam, J., van Der Bent, C., Papapoulos, S.E. und Lowik, C.W. 2002. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology* 143: 1545-53
- Deprich, R., Handschel, J., Sebald, W., Kubler, N.R. und Wurzler, K.K. 2005. [Comparison of the osteogenic activity of bone morphogenetic protein (BMP) mutants]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 9: 363-8
- Derynck, R. und Zhang, Y.E. 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425: 577-84

- Di Guglielmo, G.M., Le Roy, C., Goodfellow, A.F. und Wrana, J.L. 2003. Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nat Cell Biol* 5: 410-21
- Dubois, C.M., Laprise, M.H., Blanchette, F., Gentry, L.E. und Leduc, R. 1995. Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J Biol Chem* 270: 10618-24
- Dudley, A.T., Lyons, K.M. und Robertson, E.J. 1995. A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes Dev* 9: 2795-807
- Duprez, D., Bell, E.J., Richardson, M.K., Archer, C.W., Wolpert, L., Brickell, P.M. und Francis-West, P.H. 1996. Overexpression of BMP-2 and BMP-4 alters the size and shape of developing skeletal elements in the chick limb. *Mech Dev* 57: 145-57
- Ebisawa, T., Tada, K., Kitajima, I., Tojo, K., Sampath, T.K., Kawabata, M., Miyazono, K. und Imamura, T. 1999. Characterization of bone morphogenetic protein-6 signaling pathways in osteoblast differentiation. *J Cell Sci* 112 (Pt 20): 3519-27
- Ellman, G.L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82: 70-7
- Falzon, L., Patel, S., Chen, Y.J. und Inouye, M. 2007. Autotomic behavior of the propeptide in propeptide-mediated folding of prosubtilisin E. *J Mol Biol* 366: 494-503
- Feeney, B. und Clark, A.C. 2005. Reassembly of active caspase-3 is facilitated by the propeptide. *J Biol Chem* 280: 39772-85
- Francis-West, P.H., Abdelfattah, A., Chen, P., Allen, C., Parish, J., Ladher, R., Allen, S., MacPherson, S., Luyten, F.P. und Archer, C.W. 1999. Mechanisms of GDF-5 action during skeletal development. *Development* 126: 1305-15
- Gallea, S., Lallemand, F., Atfi, A., Rawadi, G., Ramez, V., Spinella-Jaegle, S., Kawai, S., Faucheu, C., Huet, L., Baron, R. und Roman-Roman, S. 2001. Activation of mitogen-activated protein kinase cascades is involved in regulation of bone morphogenetic protein-2-induced osteoblast differentiation in pluripotent C2C12 cells. *Bone* 28: 491-8
- Gao, Y., Jheon, A., Nourkeyhani, H., Kobayashi, H. und Ganss, B. 2004. Molecular cloning, structure, expression, and chromosomal localization of the human Osterix (SP7) gene. *Gene* 341: 101-10
- Ge, C., Xiao, G., Jiang, D., Yang, Q., Hatch, N.E., Roca, H. und Franceschi, R.T. 2009. Identification and functional characterization of ERK/MAPK phosphorylation sites in the Runx2 transcription factor. *J Biol Chem* 284: 32533-43
- Ge, G. und Greenspan, D.S. 2006. Developmental roles of the BMP1/TLD metalloproteinases. *Birth Defects Res C Embryo Today* 78: 47-68
- Ge, G., Hopkins, D.R., Ho, W.B. und Greenspan, D.S. 2005. GDF11 forms a bone morphogenetic protein 1-activated latent complex that can modulate nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells. *Mol Cell Biol* 25: 5846-58
- Geiger, M., Li, R.H. und Friess, W. 2003. Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2. *Adv Drug Deliv Rev* 55: 1613-29

- Gentry, L.E. und Nash, B.W. 1990. The pro domain of pre-pro-transforming growth factor beta 1 when independently expressed is a functional binding protein for the mature growth factor. *Biochemistry* 29: 6851-7
- Gilboa, L., Nohe, A., Geissendorfer, T., Sebald, W., Henis, Y.I. und Knaus, P. 2000. Bone morphogenetic protein receptor complexes on the surface of live cells: a new oligomerization mode for serine/threonine kinase receptors. *Mol Biol Cell* 11: 1023-35
- Glistler, C., Kemp, C.F. und Knight, P.G. 2004. Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: actions of BMP-4, -6 and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin. *Reproduction* 127: 239-54
- Greenwald, J., Groppe, J., Gray, P., Wiater, E., Kwiatkowski, W., Vale, W. und Choe, S. 2003. The BMP7/ActRII extracellular domain complex provides new insights into the cooperative nature of receptor assembly. *Mol Cell* 11: 605-17
- Gregory, K.E., Ono, R.N., Charbonneau, N.L., Kuo, C.L., Keene, D.R., Bachinger, H.P. und Sakai, L.Y. 2005. The prodomain of BMP-7 targets the BMP-7 complex to the extracellular matrix. *J Biol Chem* 280: 27970-80
- Griffith, D.L., Keck, P.C., Sampath, T.K., Rueger, D.C. und Carlson, W.D. 1996. Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: structural paradigm for the transforming growth factor beta superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 878-83
- Groppe, J., Greenwald, J., Wiater, E., Rodriguez-Leon, J., Economides, A.N., Kwiatkowski, W., Affolter, M., Vale, W.W., Belmonte, J.C. und Choe, S. 2002. Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin. *Nature* 420: 636-42
- Guicheux, J., Lemonnier, J., Ghayor, C., Suzuki, A., Palmer, G. und Caverzasio, J. 2003. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun-NH2-terminal kinase by BMP-2 and their implication in the stimulation of osteoblastic cell differentiation. *J Bone Miner Res* 18: 2060-8
- Hammonds, R.G., Jr., Schwall, R., Dudley, A., Berkemeier, L., Lai, C., Lee, J., Cunningham, N., Reddi, A.H., Wood, W.I. und Mason, A.J. 1991. Bone-inducing activity of mature BMP-2b produced from a hybrid BMP-2a/2b precursor. *Mol Endocrinol* 5: 149-55
- Harada, S. und Rodan, G.A. 2003. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 423: 349-55
- Hartmann, C. und Tabin, C.J. 2001. Wnt-14 plays a pivotal role in inducing synovial joint formation in the developing appendicular skeleton. *Cell* 104: 341-51
- Hartung, A., Bitton-Worms, K., Rechtman, M.M., Wenzel, V., Boergermann, J.H., Hassel, S., Henis, Y.I. und Knaus, P. 2006. Different routes of bone morphogenetic protein (BMP) receptor endocytosis influence BMP signaling. *Mol Cell Biol* 26: 7791-805
- Hata, A., Lagna, G., Massague, J. und Hemmati-Brivanlou, A. 1998. Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev* 12: 186-97
- Hauburger, A. 2010. Die Pro-Form des Knochenwachstumsfaktors BMP-2: Charakterisierung der Rezeptorbindung und Identifizierung einer Subdomäne. Dissertation. Institut für Biotechnologie. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

- Hauburger, A., von Einem, S., Schwaerzer, G.K., Buttstedt, A., Zebisch, M., Schraml, M., Hortschansky, P., Knaus, P. und Schwarz, E. 2009. The pro-form of BMP-2 interferes with BMP-2 signalling by competing with BMP-2 for IA receptor binding. *Febs J* 276: 6386-98
- Hentunen, T.A., Lakkakorpi, P.T., Tuukkanen, J., Lehenkari, P.P., Sampath, T.K. und Vaananen, H.K. 1995. Effects of recombinant human osteogenic protein-1 on the differentiation of osteoclast-like cells and bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun* 209: 433-43
- Herpin, A. und Cunningham, C. 2007. Cross-talk between the bone morphogenetic protein pathway and other major signaling pathways results in tightly regulated cell-specific outcomes. *Febs J* 274: 2977-85
- Higuchi, C., Myoui, A., Hashimoto, N., Kuriyama, K., Yoshioka, K., Yoshikawa, H. und Itoh, K. 2002. Continuous inhibition of MAPK signaling promotes the early osteoblastic differentiation and mineralization of the extracellular matrix. *J Bone Miner Res* 17: 1785-94
- Hill, J.J., Davies, M.V., Pearson, A.A., Wang, J.H., Hewick, R.M., Wolfman, N.M. und Qiu, Y. 2002. The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. *J Biol Chem* 277: 40735-41
- Hillger, F. 2005. Rekombinante Herstellung und biophysikalische Charakterisierung von proBMP-2, BMP-2 und dem BMP-2-Propeptid. Dissertation. Institut für Biotechnologie. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Hillger, F., Herr, G., Rudolph, R. und Schwarz, E. 2005. Biophysical comparison of BMP-2, ProBMP-2, and the free pro-peptide reveals stabilization of the pro-peptide by the mature growth factor. *J Biol Chem* 280: 14974-80
- Hills, C.E., Al-Rasheed, N., Willars, G.B. und Brunskill, N.J. 2009. C-peptide reverses TGF-beta1-induced changes in renal proximal tubular cells: implications for treatment of diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 296: F614-21
- Hills, C.E. und Brunskill, N.J. 2009. Cellular and physiological effects of C-peptide. *Clin Sci (Lond)* 116: 565-74
- Honda, J., Andou, H., Mannen, T. und Sugimoto, S. 2000. Direct refolding of recombinant human growth differentiation factor 5 for large-scale production process. *J Biosci Bioeng* 89: 582-9
- Hsu, Y.L., Chang, J.K., Tsai, C.H., Chien, T.T. und Kuo, P.L. 2007. Myricetin induces human osteoblast differentiation through bone morphogenetic protein-2/p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Biochem Pharmacol* 73: 504-14
- Huang, Z., Ren, P.G., Ma, T., Smith, R.L. und Goodman, S.B. 2010. Modulating osteogenesis of mesenchymal stem cells by modifying growth factor availability. *Cytokine* 51: 305-10
- Ibanez, C.F. 2002. Jekyll-Hyde neurotrophins: the story of proNGF. *Trends Neurosci* 25: 284-6
- Ikemura, H., Takagi, H. und Inouye, M. 1987. Requirement of pro-sequence for the production of active subtilisin E in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 262: 7859-64

- Imamura, T., Takase, M., Nishihara, A., Oeda, E., Hanai, J., Kawabata, M. und Miyazono, K. 1997. Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature* 389: 622-6
- Ishida, N., Tsujimoto, M., Kanaya, T., Shimamura, A., Tsuruoka, N., Kodama, S., Katayama, T., Oikawa, S., Matsui, M., Nakanishi, T. und et al. 1994. Expression and characterization of human bone morphogenetic protein-2 in silkworm larvae infected with recombinant *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *J Biochem* 115: 279-85
- Israel, D.I., Nove, J., Kerns, K.M., Moutsatsos, I.K. und Kaufman, R.J. 1992. Expression and characterization of bone morphogenetic protein-2 in Chinese hamster ovary cells. *Growth Factors* 7: 139-50
- Itoh, K., Udagawa, N., Katagiri, T., Iemura, S., Ueno, N., Yasuda, H., Higashio, K., Quinn, J.M., Gillespie, M.T., Martin, T.J., Suda, T. und Takahashi, N. 2001. Bone morphogenetic protein 2 stimulates osteoclast differentiation and survival supported by receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand. *Endocrinology* 142: 3656-62
- Jaiswal, R.K., Jaiswal, N., Bruder, S.P., Mbalaviele, G., Marshak, D.R. und Pittenger, M.F. 2000. Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 275: 9645-52
- Jasuja, R., Ge, G., Voss, N.G., Lyman-Gingerich, J., Branam, A.M., Pelegri, F.J. und Greenspan, D.S. 2007. Bone morphogenetic protein 1 prodomain specifically binds and regulates signaling by bone morphogenetic proteins 2 and 4. *J Biol Chem* 282: 9053-62
- Jha, A.K., Yang, W., Kirn-Safran, C.B., Farach-Carson, M.C. und Jia, X. 2009. Perlecan domain I-conjugated, hyaluronic acid-based hydrogel particles for enhanced chondrogenic differentiation via BMP-2 release. *Biomaterials* 30: 6964-75
- Jiang, S., Zhang, S., Langenfeld, J., Lo, S.C. und Rogers, M.B. 2007. Mycoplasma infection transforms normal lung cells and induces bone morphogenetic protein 2 expression by post-transcriptional mechanisms. *J Cell Biochem* 104: 580-94
- Jones, A.A., Buser, D., Schenk, R., Wozney, J. und Cochran, D.L. 2006. The effect of rhBMP-2 around endosseous implants with and without membranes in the canine model. *J Periodontol* 77: 1184-93
- Jortikka, L., Laitinen, M., Lindholm, T.S. und Marttinen, A. 1997. Internalization and intracellular processing of bone morphogenetic protein (BMP) in rat skeletal muscle myoblasts (L6). *Cell Signal* 9: 47-51
- Kaneko, H., Arakawa, T., Mano, H., Kaneda, T., Ogasawara, A., Nakagawa, M., Toyama, Y., Yabe, Y., Kumegawa, M. und Hakeda, Y. 2000. Direct stimulation of osteoclastic bone resorption by bone morphogenetic protein (BMP)-2 and expression of BMP receptors in mature osteoclasts. *Bone* 27: 479-86
- Katagiri, S., Moon, Y.S. und Yuen, B.H. 1996. The role for the uterine insulin-like growth factor I in early embryonic loss after superovulation in the rat. *Fertil Steril* 65: 426-36
- Katagiri, S., Moon, Y.S. und Yuen, B.H. 1997. A somatostatin analogue decreases embryonic loss following superovulation in rats by normalizing insulin-like growth factor-I action in the uterus. *Hum Reprod* 12: 671-6

- Katagiri, T., Yamaguchi, A., Komaki, M., Abe, E., Takahashi, N., Ikeda, T., Rosen, V., Wozney, J.M., Fujisawa-Sehara, A. und Suda, T. 1994. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol* 127: 1755-66
- Kato, S., Sangadala, S., Tomita, K., Titus, L. und Boden, S.D. 2011. A synthetic compound that potentiates bone morphogenetic protein-2-induced transdifferentiation of myoblasts into the osteoblastic phenotype. *Mol Cell Biochem* 349: 97-106
- Kawaguchi, J., Mee, P.J. und Smith, A.G. 2005. Osteogenic and chondrogenic differentiation of embryonic stem cells in response to specific growth factors. *Bone* 36: 758-69
- Kawano, M., Ariyoshi, W., Iwanaga, K., Okinaga, T., Habu, M., Yoshioka, I., Tominaga, K. und Nishihara, T. 2011. Mechanism involved in enhancement of osteoblast differentiation by hyaluronic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 405: 575-80
- Kirsch, T., Nickel, J. und Sebald, W. 2000a. Isolation of recombinant BMP receptor IA ectodomain and its 2:1 complex with BMP-2. *FEBS Lett* 468: 215-9
- Kirsch, T., Sebald, W. und Dreyer, M.K. 2000b. Crystal structure of the BMP-2-BRIA ectodomain complex. *Nat Struct Biol* 7: 492-6
- Kliemann, M., Weininger, U., Balbach, J., Schwarz, E. und Rudolph, R. 2006. Examination of the slow unfolding of pro-nerve growth factor argues against a loop threading mechanism for nerve growth factor. *Biochemistry* 45: 3517-24
- Klosch, B., Furst, W., Kneidinger, R., Schuller, M., Rupp, B., Banerjee, A. und Redl, H. 2005. Expression and purification of biologically active rat bone morphogenetic protein-4 produced as inclusion bodies in recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett* 27: 1559-64
- Koenig, B.B., Cook, J.S., Wolsing, D.H., Ting, J., Tiesman, J.P., Correa, P.E., Olson, C.A., Pecquet, A.L., Ventura, F., Grant, R.A. und et al. 1994. Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol* 14: 5961-74
- Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R.T., Gao, Y.H., Inada, M., Sato, M., Okamoto, R., Kitamura, Y., Yoshiki, S. und Kishimoto, T. 1997. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89: 755-64
- Kozawa, O., Hatakeyama, D. und Uematsu, T. 2002. Divergent regulation by p44/p42 MAP kinase and p38 MAP kinase of bone morphogenetic protein-4-stimulated osteocalcin synthesis in osteoblasts. *J Cell Biochem* 84: 583-9
- Krause, M. 2003. Untersuchungen zur Rolle des Propeptids von BMP-2. Diplomarbeit. Institut für Biotechnologie. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Kurozumi, K., Nishita, M., Yamaguchi, K., Fujita, T., Ueno, N. und Shibuya, H. 1998. BRAM1, a BMP receptor-associated molecule involved in BMP signalling. *Genes Cells* 3: 257-64
- Lai, C.F., Chaudhary, L., Fausto, A., Halstead, L.R., Ory, D.S., Avioli, L.V. und Cheng, S.L. 2001. Erk is essential for growth, differentiation, integrin expression, and cell function in human osteoblastic cells. *J Biol Chem* 276: 14443-50

- Lai, C.F. und Cheng, S.L. 2002. Signal transductions induced by bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta in normal human osteoblastic cells. *J Biol Chem* 277: 15514-22
- Lee, H.S., Jung, E.Y., Bae, S.H., Kwon, K.H., Kim, J.M. und Suh, H.J. 2010. Stimulation of osteoblastic differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells by yeast hydrolysate. *Phytother Res*
- Lee, K.S., Kim, H.J., Li, Q.L., Chi, X.Z., Ueta, C., Komori, T., Wozney, J.M., Kim, E.G., Choi, J.Y., Ryoo, H.M. und Bae, S.C. 2000. Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Mol Cell Biol* 20: 8783-92
- Lee, N.K., Sowa, H., Hinoi, E., Ferron, M., Ahn, J.D., Confavreux, C., Dacquin, R., Mee, P.J., McKee, M.D., Jung, D.Y., Zhang, Z., Kim, J.K., Mauvais-Jarvis, F., Ducy, P. und Karsenty, G. 2007. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 130: 456-69
- Lee, S.J. und McPherron, A.C. 2001. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 9306-11
- Li, R.H. und Wozney, J.M. 2001. Delivering on the promise of bone morphogenetic proteins. *Trends Biotechnol* 19: 255-65
- Li, Z., Hassan, M.Q., Volinia, S., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Croce, C.M., Lian, J.B. und Stein, G.S. 2008. A microRNA signature for a BMP2-induced osteoblast lineage commitment program. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 13906-11
- Lochmann, A., Nitzsche, H., von Einem, S., Schwarz, E. und Mäder, K. 2010. The influence of covalently linked and free polyethylene glycol on the structural and release properties of rhBMP-2 loaded microspheres. *J Control Release* 147: 92-100
- Long, S., Truong, L., Bennett, K., Phillips, A., Wong-Staal, F. und Ma, H. 2006. Expression, purification, and renaturation of bone morphogenetic protein-2 from *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 46: 374-8
- Lopez-Munoz, F., Alamo, C., Cuenca, E., Shen, W.W., Clervoy, P. und Rubio, G. 2005. History of the discovery and clinical introduction of chlorpromazine. *Ann Clin Psychiatry* 17: 113-35
- Luo, G., Hofmann, C., Bronckers, A.L., Sohocki, M., Bradley, A. und Karsenty, G. 1995. BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes Dev* 9: 2808-20
- Luo, J., Tang, M., Huang, J., He, B.C., Gao, J.L., Chen, L., Zuo, G.W., Zhang, W., Luo, Q., Shi, Q., Zhang, B.Q., Bi, Y., Luo, X., Jiang, W., Su, Y., Shen, J., Kim, S.H., Huang, E., Gao, Y., Zhou, J.Z., Yang, K., Luu, H.H., Pan, X., Haydon, R.C., Deng, Z.L. und He, T.C. 2010. TGFbeta/BMP type I receptors ALK1 and ALK2 are essential for BMP9-induced osteogenic signaling in mesenchymal stem cells. *J Biol Chem* 285: 29588-98
- Luyten, F.P. 1997. Cartilage-derived morphogenetic protein-1. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 1241-4

- Luyten, F.P., Cunningham, N.S., Ma, S., Muthukumaran, N., Hammonds, R.G., Nevins, W.B., Woods, W.I. und Reddi, A.H. 1989. Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein initiating bone differentiation. *J Biol Chem* 264: 13377-80
- Macias, D., Ganan, Y., Sampath, T.K., Piedra, M.E., Ros, M.A. und Hurle, J.M. 1997. Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development. *Development* 124: 1109-17
- Martin, G.J., Jr., Boden, S.D., Marone, M.A. und Moskovitz, P.A. 1999. Posterolateral intertransverse process spinal arthrodesis with rhBMP-2 in a nonhuman primate: important lessons learned regarding dose, carrier, and safety. *J Spinal Disord* 12: 179-86
- Martinez-Arca, S., Bech-Serra, J.J., Hurtado-Kuttner, M., Borroto, A. und Arribas, J. 2005. Recycling of cell surface pro-transforming growth factor- α regulates epidermal growth factor receptor activation. *J Biol Chem* 280: 36970-7
- Massagué, J. 1998. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67: 753-91
- Massagué, J., Attisano, L. und Wrana, J.L. 1994. The TGF-beta family and its composite receptors. *Trends Cell Biol* 4: 172-8
- Mathews, L.S. und Vale, W.W. 1991. Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. *Cell* 65: 973-82
- McDonald, N.Q. und Hendrickson, W.A. 1993. A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell* 73: 421-4
- Minina, E., Wenzel, H.M., Kreschel, C., Karp, S., Gaffield, W., McMahon, A.P. und Vortkamp, A. 2001. BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. *Development* 128: 4523-34
- Miyazono, K., Hellman, U., Wernstedt, C. und Heldin, C.H. 1988. Latent high molecular weight complex of transforming growth factor beta 1. Purification from human platelets and structural characterization. *J Biol Chem* 263: 6407-15
- Mornet, E. 2008. Hypophosphatasia. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 22: 113-27
- Murakami, G., Watabe, T., Takaoka, K., Miyazono, K. und Imamura, T. 2003. Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory Smads. *Mol Biol Cell* 14: 2809-17
- Mussano, F., Ciccone, G., Ceccarelli, M., Baldi, I. und Bassi, F. 2007. Bone morphogenetic proteins and bone defects: a systematic review. *Spine* 32: 824-30
- Nakao, A., Afrakhte, M., Moren, A., Nakayama, T., Christian, J.L., Heuchel, R., Itoh, S., Kawabata, M., Heldin, N.E., Heldin, C.H. und ten Dijke, P. 1997. Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature* 389: 631-5
- Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R. und de Crombrughe, B. 2002. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108: 17-29
- Namiki, M., Akiyama, S., Katagiri, T., Suzuki, A., Ueno, N., Yamaji, N., Rosen, V., Wozney, J.M. und Suda, T. 1997. A kinase domain-truncated type I receptor blocks bone

- morphogenetic protein-2-induced signal transduction in C2C12 myoblasts. *J Biol Chem* 272: 22046-52
- Newfeld, S.J., Wisotzkey, R.G. und Kumar, S. 1999. Molecular evolution of a developmental pathway: phylogenetic analyses of transforming growth factor-beta family ligands, receptors and Smad signal transducers. *Genetics* 152: 783-95
- Nicholls, P.K., Harrison, C.A., Gilchrist, R.B., Farnworth, P.G. und Stanton, P.G. 2009. Growth differentiation factor 9 is a germ cell regulator of Sertoli cell function. *Endocrinology* 150: 2481-90
- Nickel, J., Dreyer, M.K., Kirsch, T. und Sebald, W. 2001. The crystal structure of the BMP-2:BMPRII complex and the generation of BMP-2 antagonists. *J Bone Joint Surg Am* 83-A Suppl 1: S7-14
- Nohe, A., Hassel, S., Ehrlich, M., Neubauer, F., Sebald, W., Henis, Y.I. und Knaus, P. 2002. The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways. *J Biol Chem* 277: 5330-8
- Nohe, A., Keating, E., Knaus, P. und Petersen, N.O. 2004. Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell Signal* 16: 291-9
- Nykjaer, A., Lee, R., Teng, K.K., Jansen, P., Madsen, P., Nielsen, M.S., Jacobsen, C., Kliemannel, M., Schwarz, E., Willnow, T.E., Hempstead, B.L. und Petersen, C.M. 2004. Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* 427: 843-8
- Olwin, B.B., Burrus, L.W., Zuber, M.E. und Lueddecke, B. 1991. Characterization of a non-tyrosine kinase FGF-binding protein. *Ann N Y Acad Sci* 638: 195-203
- Onichtchouk, D., Chen, Y.G., Dosch, R., Gawantka, V., Delius, H., Massague, J. und Niehrs, C. 1999. Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* 401: 480-5
- Otsuka, F., Moore, R.K., Iemura, S., Ueno, N. und Shimasaki, S. 2001. Follistatin inhibits the function of the oocyte-derived factor BMP-15. *Biochem Biophys Res Commun* 289: 961-6
- Otto, F., Thornell, A.P., Crompton, T., Denzel, A., Gilmour, K.C., Rosewell, I.R., Stamp, G.W., Beddington, R.S., Mundlos, S., Olsen, B.R., Selby, P.B. und Owen, M.J. 1997. *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89: 765-71
- Oury, F., Sumara, G., Sumara, O., Ferron, M., Chang, H., Smith, C.E., Hermo, L., Suarez, S., Roth, B.L., Ducy, P. und Karsenty, G. 2011. Endocrine Regulation of Male Fertility by the Skeleton. *Cell* 144: 796-809
- Parton, R.G. 2003. Caveolae - from ultrastructure to molecular mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 162-7
- Patel, Z.S., Yamamoto, M., Ueda, H., Tabata, Y. und Mikos, A.G. 2008. Biodegradable gelatin microparticles as delivery systems for the controlled release of bone morphogenetic protein-2. *Acta Biomater* 4: 1126-38
- Pelkmans, L., Kartenbeck, J. und Helenius, A. 2001. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol* 3: 473-83

- Penheiter, S.G., Mitchell, H., Garamszegi, N., Edens, M., Dore, J.J., Jr. und Leof, E.B. 2002. Internalization-dependent and -independent requirements for transforming growth factor beta receptor signaling via the Smad pathway. *Mol Cell Biol* 22: 4750-9
- Pereira, C.T., Huang, W., Jarrahy, R., Rudkin, G., Yamaguchi, D.T. und Miller, T.A. 2009. Human and mouse osteoprogenitor cells exhibit distinct patterns of osteogenesis in three-dimensional tissue engineering scaffolds. *Plast Reconstr Surg* 124: 1869-79
- Peroutka, S.J. und Snyder, S.H. 1980. Relationship of neuroleptic drug effects at brain dopamine, serotonin, alpha-adrenergic, and histamine receptors to clinical potency. *Am J Psychiatry* 137: 1518-22
- Peschon, J.J., Slack, J.L., Reddy, P., Stocking, K.L., Sunnarborg, S.W., Lee, D.C., Russell, W.E., Castner, B.J., Johnson, R.S., Fitzner, J.N., Boyce, R.W., Nelson, N., Kozlosky, C.J., Wolfson, M.F., Rauch, C.T., Cerretti, D.P., Paxton, R.J., March, C.J. und Black, R.A. 1998. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* 282: 1281-4
- Pfizer AG, Z.: InductOs, Arzneimittelkompendium der Schweiz. Documed AG, Basel, 2010.
- Pledger, W.J., Stiles, C.D., Antoniades, H.N. und Scher, C.D. 1977. Induction of DNA synthesis in BALB/c 3T3 cells by serum components: reevaluation of the commitment process. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 4481-5
- Rattenholl, A., Lilie, H., Grossmann, A., Stern, A., Schwarz, E. und Rudolph, R. 2001a. The pro-sequence facilitates folding of human nerve growth factor from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Eur J Biochem* 268: 3296-303
- Rattenholl, A., Ruoppolo, M., Flagiello, A., Monti, M., Vinci, F., Marino, G., Lilie, H., Schwarz, E. und Rudolph, R. 2001b. Pro-sequence assisted folding and disulfide bond formation of human nerve growth factor. *J Mol Biol* 305: 523-33
- Razani, B., Zhang, X.L., Bitzer, M., von Gersdorff, G., Bottinger, E.P. und Lisanti, M.P. 2001. Caveolin-1 regulates transforming growth factor (TGF)-beta/SMAD signaling through an interaction with the TGF-beta type I receptor. *J Biol Chem* 276: 6727-38
- Reddi, A.H. 1998. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol* 16: 247-52
- Rider, C.C. und Mulloy, B. 2010. Bone morphogenetic protein and growth differentiation factor cytokine families and their protein antagonists. *Biochem J* 429: 1-12
- Rosen, V. 2009. BMP2 signaling in bone development and repair. *Cytokine Growth Factor Rev* 20: 475-80
- Rottem, S. und Barile, M.F. 1993. Beware of mycoplasmas. *Trends Biotechnol* 11: 143-51
- Rudolph, R., Böhm, G., Lilie, H., and Jaenicke, R.: Folding Proteins. In: Creighton, T.E., ed (Ed.), *Protein Function: A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford, 1997, pp. 57-99.
- Rudolph, R., Schwarz, E., Herr, G. und Hillger, F. 2008. United States Patent: US7354901B2 - Production of recombinant BMP-2. USA
- Samad, T.A., Rebbapragada, A., Bell, E., Zhang, Y., Sidis, Y., Jeong, S.J., Campagna, J.A., Perusini, S., Fabrizio, D.A., Schneyer, A.L., Lin, H.Y., Brivanlou, A.H., Attisano, L.

- und Woolf, C.J. 2005. DRAGON, a bone morphogenetic protein co-receptor. *J Biol Chem* 280: 14122-9
- Sandhu, H.S., Kanim, L.E., Kabo, J.M., Toth, J.M., Zeegan, E.N., Liu, D., Seeger, L.L. und Dawson, E.G. 1995. Evaluation of rhBMP-2 with an OPLA carrier in a canine posterolateral (transverse process) spinal fusion model. *Spine (Phila Pa 1976)* 20: 2669-82
- Sandhu, H.S., Kanim, L.E., Kabo, J.M., Toth, J.M., Zeegan, E.N., Liu, D., Delamarter, R.B. und Dawson, E.G. 1996. Effective doses of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in experimental spinal fusion. *Spine (Phila Pa 1976)* 21: 2115-22
- Scheffe, J.H., Lehmann, K.E., Buschmann, I.R., Unger, T. und Funke-Kaiser, H. 2006. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. *J Mol Med* 84: 901-10
- Scheufler, C., Sebald, W. und Hulsmeyer, M. 1999. Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. *J Mol Biol* 287: 103-15
- Sebald, W., Nickel, J., Zhang, J.L. und Mueller, T.D. 2004. Molecular recognition in bone morphogenetic protein (BMP)/receptor interaction. *Biol Chem* 385: 697-710
- Seeherman, H., Wozney, J. und Li, R. 2002. Bone morphogenetic protein delivery systems. *Spine (Phila Pa 1976)* 27: S16-23
- Sellers, R.S., Zhang, R., Glasson, S.S., Kim, H.D., Peluso, D., D'Augusta, D.A., Beckwith, K. und Morris, E.A. 2000. Repair of articular cartilage defects one year after treatment with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *J Bone Joint Surg Am* 82: 151-60
- Sengle, G., Ono, R.N., Lyons, K.M., Bachinger, H.P. und Sakai, L.Y. 2008. A new model for growth factor activation: type II receptors compete with the prodomain for BMP-7. *J Mol Biol* 381: 1025-39
- Shanmugarajan, S., Tsuruga, E., Swoboda, K.J., Maria, B.L., Ries, W.L. und Reddy, S.V. 2009. Bone loss in survival motor neuron (Smn^{-/-}) SMN2) genetic mouse model of spinal muscular atrophy. *J Pathol* 219: 52-60
- Shen, Q., Little, S.C., Xu, M., Haupt, J., Ast, C., Katagiri, T., Mundlos, S., Seemann, P., Kaplan, F.S., Mullins, M.C. und Shore, E.M. 2009. The fibrodysplasia ossificans progressiva R206H ACVR1 mutation activates BMP-independent chondrogenesis and zebrafish embryo ventralization. *J Clin Invest* 119: 3462-72
- Shields, L.B., Raque, G.H., Glassman, S.D., Campbell, M., Vitaz, T., Harpring, J. und Shields, C.B. 2006. Adverse effects associated with high-dose recombinant human bone morphogenetic protein-2 use in anterior cervical spine fusion. *Spine* 31: 542-7
- Shore, E.M., Xu, M., Feldman, G.J., Fenstermacher, D.A., Cho, T.J., Choi, I.H., Connor, J.M., Delai, P., Glaser, D.L., LeMerrer, M., Morhart, R., Rogers, J.G., Smith, R., Triffitt, J.T., Urtizberea, J.A., Zasloff, M., Brown, M.A. und Kaplan, F.S. 2006. A recurrent mutation in the BMP type I receptor ACVR1 causes inherited and sporadic fibrodysplasia ossificans progressiva. *Nat Genet* 38: 525-7
- Shui, C., Spelsberg, T.C., Riggs, B.L. und Khosla, S. 2003. Changes in Runx2/Cbfa1 expression and activity during osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* 18: 213-21

- Smith, D.M., Cooper, G.M., Mooney, M.P., Marra, K.G. und Losee, J.E. 2008. Bone morphogenetic protein 2 therapy for craniofacial surgery. *J Craniofac Surg* 19: 1244-59
- Sopory, S., Nelsen, S.M., Degnin, C., Wong, C. und Christian, J.L. 2006. Regulation of bone morphogenetic protein-4 activity by sequence elements within the prodomain. *J Biol Chem* 281: 34021-31
- Subbian, E., Yabuta, Y. und Shinde, U.P. 2005. Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone: intrinsically unstructured propeptide modulates stochastic activation of subtilisin. *J Mol Biol* 347: 367-83
- Sun, P.D. und Davies, D.R. 1995. The cystine-knot growth-factor superfamily. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 24: 269-91
- Suo, G., Chen, B., Zhang, J., Gao, Y., Wang, X., He, Z. und Dai, J. 2006. Expression of active hBMP2 in transgenic tobacco plants. *Plant Cell Rep* 25: 1316-24
- Takada, T., Katagiri, T., Ifuku, M., Morimura, N., Kobayashi, M., Hasegawa, K., Ogamo, A. und Kamijo, R. 2003. Sulfated polysaccharides enhance the biological activities of bone morphogenetic proteins. *J Biol Chem* 278: 43229-35
- Tang, D.Z., Yang, F., Yang, Z., Huang, J., Shi, Q., Chen, D. und Wang, Y.J. 2011. Psoralen stimulates osteoblast differentiation through activation of BMP signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 405: 256-61
- ten Dijke, P. 2006. Bone morphogenetic protein signal transduction in bone. *Curr Med Res Opin* 22 Suppl 1: S7-11
- ten Dijke, P., Fu, J., Schaap, P. und Roelen, B.A. 2003. Signal transduction of bone morphogenetic proteins in osteoblast differentiation. *J Bone Joint Surg Am* 85-A Suppl 3: 34-8
- ten Dijke, P., Ichijo, H., Franzen, P., Schulz, P., Saras, J., Toyoshima, H., Heldin, C.H. und Miyazono, K. 1993. Activin receptor-like kinases: a novel subclass of cell-surface receptors with predicted serine/threonine kinase activity. *Oncogene* 8: 2879-87
- ten Dijke, P., Miyazono, K. und Heldin, C.H. 1996. Signaling via hetero-oligomeric complexes of type I and type II serine/threonine kinase receptors. *Curr Opin Cell Biol* 8: 139-45
- ten Dijke, P., Yamashita, H., Sampath, T.K., Reddi, A.H., Estevez, M., Riddle, D.L., Ichijo, H., Heldin, C.H. und Miyazono, K. 1994. Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *J Biol Chem* 269: 16985-8
- Thies, R.S., Chen, T., Davies, M.V., Tomkinson, K.N., Pearson, A.A., Shakey, Q.A. und Wolfman, N.M. 2001. GDF-8 propeptide binds to GDF-8 and antagonizes biological activity by inhibiting GDF-8 receptor binding. *Growth Factors* 18: 251-9
- Thompson, T.B., Woodruff, T.K. und Jardetzky, T.S. 2003. Structures of an ActRIIB:activin A complex reveal a novel binding mode for TGF-beta ligand:receptor interactions. *Embo J* 22: 1555-66
- Thomsen, P., Roepstorff, K., Stahlhut, M. und van Deurs, B. 2002. Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking. *Mol Biol Cell* 13: 238-50

- Tsuji, K., Bandyopadhyay, A., Harfe, B.D., Cox, K., Kakar, S., Gerstenfeld, L., Einhorn, T., Tabin, C.J. und Rosen, V. 2006. BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nat Genet* 38: 1424-9
- Tsumoto, K., Ejima, D., Kita, Y. und Arakawa, T. 2005. Review: Why is arginine effective in suppressing aggregation? *Protein Pept Lett* 12: 613-9
- Urist, M.R. 1965. Bone: formation by autoinduction. *Science* 150: 893-9
- Valdimarsdottir, G., Goumans, M.J., Rosendahl, A., Brugman, M., Itoh, S., Lebrin, F., Sideras, P. und ten Dijke, P. 2002. Stimulation of Id1 expression by bone morphogenetic protein is sufficient and necessary for bone morphogenetic protein-induced activation of endothelial cells. *Circulation* 106: 2263-70
- Valentin-Opran, A., Wozney, J., Csimma, C., Lilly, L. und Riedel, G.E. 2002. Clinical evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Clin Orthop Relat Res* 110-20
- Vallejo, L.F. und Rinas, U. 2004. Optimized procedure for renaturation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 at high protein concentration. *Biotechnol Bioeng* 85: 601-9
- Vinals, F., Lopez-Rovira, T., Rosa, J.L. und Ventura, F. 2002. Inhibition of PI3K/p70 S6K and p38 MAPK cascades increases osteoblastic differentiation induced by BMP-2. *FEBS Lett* 510: 99-104
- Vitt, U.A., Hsu, S.Y. und Hsueh, A.J. 2001. Evolution and classification of cystine knot-containing hormones and related extracellular signaling molecules. *Mol Endocrinol* 15: 681-94
- Vogelstein, B. und Gillespie, D. 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 615-9
- von Bubnoff, A. und Cho, K.W. 2001. Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network? *Dev Biol* 239: 1-14
- von Einem, S., Schwarz, E. und Rudolph, R. 2010. A novel TWO-STEP renaturation procedure for efficient production of recombinant BMP-2. *Protein Expr Purif* 73: 65-9
- Wakefield, L.M., Smith, D.M., Flanders, K.C. und Sporn, M.B. 1988. Latent transforming growth factor-beta from human platelets. A high molecular weight complex containing precursor sequences. *J Biol Chem* 263: 7646-54
- Walton, K.L., Makanji, Y., Wilce, M.C., Chan, K.L., Robertson, D.M. und Harrison, C.A. 2009. A common biosynthetic pathway governs the dimerization and secretion of inhibin and related transforming growth factor beta (TGFbeta) ligands. *J Biol Chem* 284: 9311-20
- Wang, C.K., Ho, M.L., Wang, G.J., Chang, J.K., Chen, C.H., Fu, Y.C. und Fu, H.H. 2009. Controlled-release of rhBMP-2 carriers in the regeneration of osteonecrotic bone. *Biomaterials* 30: 4178-86
- Wang, E.A., Rosen, V., Cordes, P., Hewick, R.M., Kriz, M.J., Luxenberg, D.P., Sibley, B.S. und Wozney, J.M. 1988. Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 9484-8

- Weiskirchen, R., Meurer, S.K., Gressner, O.A., Herrmann, J., Borkham-Kamphorst, E. und Gressner, A.M. 2009. BMP-7 as antagonist of organ fibrosis. *Front Biosci* 14: 4992-5012
- Widersten, M., Huang, M. und Mannervik, B. 1996. Optimized heterologous expression of the polymorphic human glutathione transferase M1-1 based on silent mutations in the corresponding cDNA. *Protein Expr Purif* 7: 367-72
- Wieser, R., Wrana, J.L. und Massague, J. 1995. GS domain mutations that constitutively activate T beta R-I, the downstream signaling component in the TGF-beta receptor complex. *Embo J* 14: 2199-208
- Wikesjö, U.M., Guglielmoni, P., Promsudthi, A., Cho, K.S., Trombelli, L., Selvig, K.A., Jin, L. und Wozney, J.M. 1999. Periodontal repair in dogs: effect of rhBMP-2 concentration on regeneration of alveolar bone and periodontal attachment. *J Clin Periodontol* 26: 392-400
- Wikesjö, U.M., Huang, Y.H., Polimeni, G. und Qahash, M. 2007. Bone morphogenetic proteins: a realistic alternative to bone grafting for alveolar reconstruction. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 19: 535-51
- Winnier, G., Blessing, M., Labosky, P.A. und Hogan, B.L. 1995. Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev* 9: 2105-16
- Wozney, J.M. 1992. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev* 32: 160-7
- Wozney, J.M., Rosen, V., Celeste, A.J., Mitsock, L.M., Whitters, M.J., Kriz, R.W., Hewick, R.M. und Wang, E.A. 1988. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242: 1528-34
- Wrana, J.L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F. und Massagué, J. 1994. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 370: 341-7
- Xiao, G., Gopalakrishnan, R., Jiang, D., Reith, E., Benson, M.D. und Franceschi, R.T. 2002. Bone morphogenetic proteins, extracellular matrix, and mitogen-activated protein kinase signaling pathways are required for osteoblast-specific gene expression and differentiation in MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res* 17: 101-10
- Yamaguchi, A. 1995. Regulation of differentiation pathway of skeletal mesenchymal cells in cell lines by transforming growth factor-beta superfamily. *Semin Cell Biol* 6: 165-73
- Yamaguchi, K., Nagai, S., Ninomiya-Tsuji, J., Nishita, M., Tamai, K., Irie, K., Ueno, N., Nishida, E., Shibuya, H. und Matsumoto, K. 1999. XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway. *Embo J* 18: 179-87
- Yamashita, H., Ten Dijke, P., Heldin, C.H. und Miyazono, K. 1996. Bone morphogenetic protein receptors. *Bone* 19: 569-74
- Yanai, T., Katagiri, T., Akiyama, S., Imada, M., Yamashita, T., Chiba, H., Takahashi, N. und Suda, T. 2001. Expression of mouse osteocalcin transcripts, OG1 and OG2, is differentially regulated in bone tissues and osteoblast cultures. *J Bone Miner Metab* 19: 345-51

- Yayon, A., Klagsbrun, M., Esko, J.D., Leder, P. und Ornitz, D.M. 1991. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* 64: 841-8
- Yeh, L.C., Tsai, A.D. und Lee, J.C. 2002. Osteogenic protein-1 (OP-1, BMP-7) induces osteoblastic cell differentiation of the pluripotent mesenchymal cell line C2C12. *J Cell Biochem* 87: 292-304
- Zhang, H. und Bradley, A. 1996. Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. *Development* 122: 2977-86
- Zhang, Y., Chang, C., Gehling, D.J., Hemmati-Brivanlou, A. und Derynck, R. 2001. Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 974-9
- Zhao, B., Katagiri, T., Toyoda, H., Takada, T., Yanai, T., Fukuda, T., Chung, U.I., Koike, T., Takaoka, K. und Kamijo, R. 2006. Heparin potentiates the in vivo ectopic bone formation induced by bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem* 281: 23246-53
- Zhao, M., Harris, S.E., Horn, D., Geng, Z., Nishimura, R., Mundy, G.R. und Chen, D. 2002. Bone morphogenetic protein receptor signaling is necessary for normal murine postnatal bone formation. *J Cell Biol* 157: 1049-60
- Zhu, H., Kavsak, P., Abdollah, S., Wrana, J.L. und Thomsen, G.H. 1999. A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature* 400: 687-93
- Zwang, Y. und Yarden, Y. 2009. Systems biology of growth factor-induced receptor endocytosis. *Traffic* 10: 349-63

7 Abkürzungsverzeichnis

Alk	<i>activin-like receptor kinase</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BISC	<i>BMP-induced signaling complex</i>
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
BMPR	<i>bone morphogenetic protein receptor</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
cDNA	komplementäre DNA
CHAPS	3-(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio-1-propansulfonat
CHES	2-(N-Cyclohexylamino)-ethansulfonsäure
Cbfa1	<i>core binding factor $\alpha 1$</i>
C _p	<i>crossing point</i>
CV	Säulenvolumen (<i>column volume</i>)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNTB	Dithionitrobenzoesäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECD	Extrazelluläre Ligandenbindedomäne
ECL	<i>enzyme-dependent chemoluminescence</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immuno-sorbent assay</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDF	<i>growth and differentiation factor</i>
GdmCl	Guanidinium-Hydrochlorid
GSH/GSSG	Glutathion reduziert/oxidiert
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IB	<i>inclusion body</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
K _D	Dissoziationskonstante
LAL	Limulus Amöbozyten-Lysat
LB	<i>lysogeny broth</i>

LDH	Lactat-Dehydrogenase
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MBP	Maltose-bindendes Protein
MW	Molekulargewicht
MWCO	Molekulare Ausschlussgröße (<i>molecular weight cut-off</i>)
NaDOC	Desoxycholsäure-Natriumsalz
NGF	<i>nerve growth factor</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFC	<i>pre-formed complex</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
RP-HPLC	<i>reversed phase-high performance liquid chromatography</i>
RT	Reverse Transkription
Runx2	<i>runt-related transcription factor 2</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOB	<i>super optimal broth</i>
SOC	<i>salt-optimized broth with carbon-source</i>
TCA	Trichloracetat
TE	Trypsin-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylendiamin
TEV	<i>tobacco etch virus</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UDG	Uracil-DNA-Glycosylase

8 Anhang

8.1 Ergänzende Daten und Schlussfolgerungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die biologische Aktivität des rekombinant hergestellten BMP-2 durch Untersuchungen zur AP-Induktion in C2C12-Zellen nach Zugabe des Wachstumsfaktors bestimmt. Ergänzend wurden außerdem Studien zum Nachweis der Interaktion von BMP-2 mit dem Antagonisten Noggin sowie der extrazellulären Ligandenbindedomäne von BMPR-IA durchgeführt.

8.1.1 Inhibierung der BMP-2-induzierten AP-Aktivität durch Noggin

Durch Inkubation mit Noggin konnte die BMP-2-stimulierte AP-Aktivität reduziert werden. Große Unterschiede zeigten sich allerdings zwischen dem prokaryotisch exprimierten, im Rahmen der Arbeit gereinigten und rückgefalteten Protein und dem eukaryotisch exprimierten, kommerziell erworbenen Protein (Abbildung 8.1). Das prokaryotisch wie auch das eukaryotisch produzierte Noggin wurde mit BMP-2 in der gleichen molaren Menge, sowie im zweifachen molaren Überschuss vorinkubiert und die Proteinlösung anschließend für die Stimulation von C2C12-Zellen eingesetzt. Das in *E. coli* exprimierte Protein zeigte dabei eine Verringerung der BMP-2-induzierten AP-Aktivität um $11 \pm 7,0$ % bei gleichem molarem Verhältnis bzw. um $27 \pm 7,4$ %, wenn es im zweifachen molaren Überschuss eingesetzt wurde. Dagegen konnte mit eukaryotisch exprimierten Noggin eine deutlich bessere Inhibierung erreicht werden. Sie betrug bei gleichem molarem Verhältnis von BMP-2 zu Noggin in der Prä-Inkubation $67 \pm 18,9$ % und im zweifachen molaren Überschuss $96 \pm 8,1$ %.

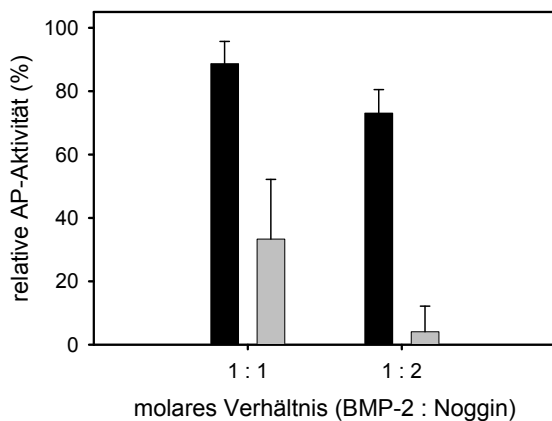


Abbildung 8.1.

Inhibierung der BMP-2-induzierten AP-Aktivität durch Noggin. 100 nM BMP-2 wurde im angegebenen molaren Verhältnis mit prokaryotisch (schwarz) bzw. eukaryotisch exprimierten Noggin (grau) vorinkubiert. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messungen. Die AP-Aktivität nach Stimulation mit 100 nM BMP-2 wurde 100% gesetzt.

Da das prokaryotisch gewonnene Noggin mittels Fern-UV-CD-Spektroskopie überprüft worden war und eine Übereinstimmung mit publizierten Daten belegt werden konnte, legt diese Beobachtung nahe, dass der Glykosylierungsstatus des Noggin für die Bindung von BMP-2 eine große Rolle spielt. Im humanen Protein ist bislang die Aminosäure Asp35 der Polypeptidkette als eine mögliche Glykosylierungsstelle bekannt. Aufgrund der hohen Sequenzidentität zu Noggin aus Maus wird die gleiche Glykosylierungsstelle auch für das humane Protein vermutet. Ein experimenteller Nachweis der Glykosylierung ist bisher jedoch noch nicht publiziert (Quelle: UniProt Protein-Datenbank).

8.1.2 Inhibierung der BMP-2-induzierten AP-Aktivität durch Interaktion mit der BMPR-IA-ECD

Wurde BMP-2 in verschiedenen molaren Verhältnissen mit der extrazellulären Ligandenbindedomäne des BMP-Rezeptors IA vorinkubiert und diese Proteinlösung nachfolgend zur Stimulation von C2C12-Zellen eingesetzt, so konnte eine konzentrationsabhängige Abnahme der BMP-2-induzierten AP-Aktivität beobachtet werden (Abbildung 8.2). Auf diese Weise konnte sowohl die Interaktion der BMPR-IA-ECD mit BMP-2 als auch deren Funktionalität nachgewiesen werden. Die Abnahme der AP-Aktivität ist dadurch zu erklären, dass BMP-2, das in Interaktion mit der BMPR-IA-ECD stand, nicht mehr zur Interaktion mit den Rezeptoren an der Zelloberfläche und somit zur Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden zur Verfügung stand. Eine messbare Reduktion der AP-Aktivität wurde erreicht, wenn die BMPR-IA-ECD in mindestens fünffachem molarem Überschuss mit BMP-2 prä-inkubiert wurde. In diesem Fall betrug die BMP-2-stimulierte AP-Aktivität bezogen auf die nicht-inhibierte Kontrolle $93 \pm 3,2\%$. Bei Erhöhung des molaren Verhältnisses zugunsten der Rezeptor-ECD auf 1:10 bzw. 1:20 sank die resultierende AP-Aktivität auf $81 \pm 2,1\%$ bzw. $63 \pm 4,9\%$.

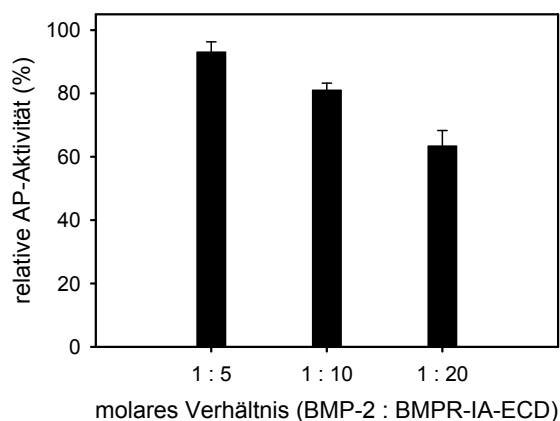


Abbildung 8.2.

Inhibierung der BMP-2-stimulierten AP-Aktivität durch BMPR-IA-ECD. 100 nM BMP-2 wurde im angegebenen molaren Verhältnis mit BMPR-IA-ECD prä-inkubiert. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messungen. Die AP-Aktivität nach Stimulation mit 100 nM BMP-2 wurde 100% gesetzt.

8.2 Ergänzende Abbildungen und Tabellen

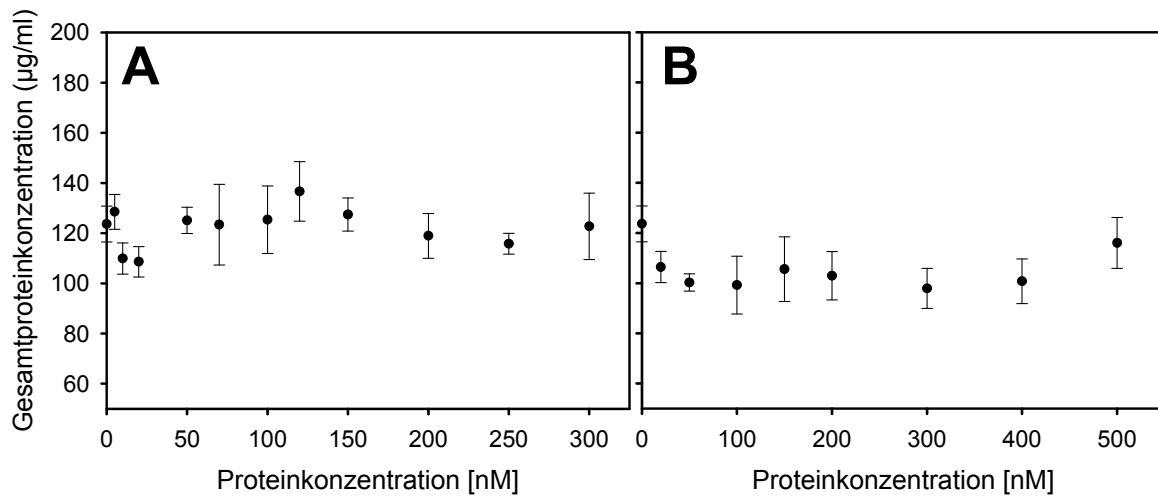


Abbildung 8.3. Einfluss von BMP-2 und proBMP-2 auf das Wachstum von C2C12-Zellen. Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen BMP-2 (A) oder proBMP-2 (B) kultiviert und anschließend lysiert. Im Zelllysat wurde die Gesamtproteinkonzentration mittels BCA-Assay bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier unabhängigen Messungen.

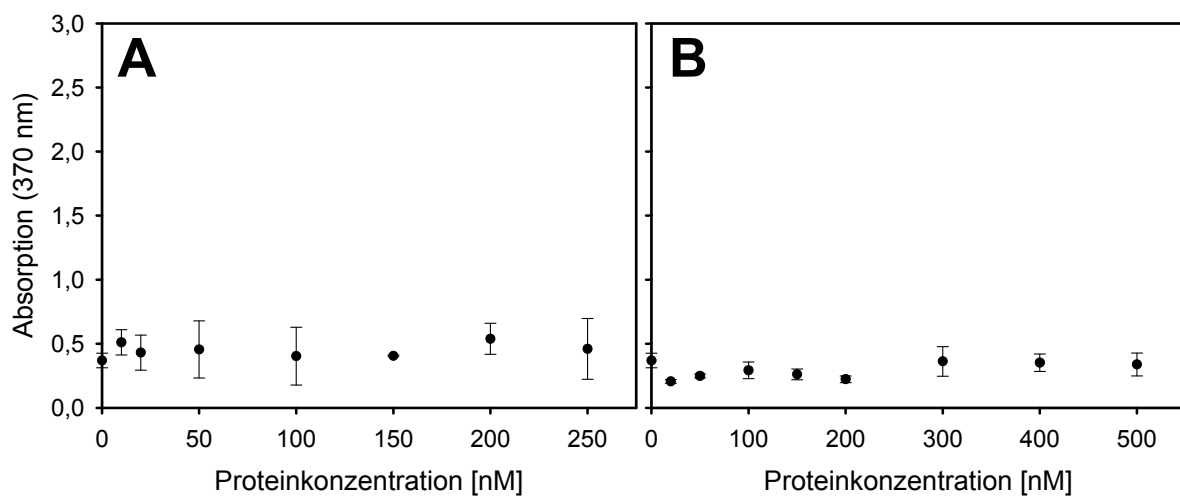


Abbildung 8.4. Proliferationstest in C2C12-Zellen nach Induktion mit BMP-2 oder proBMP-2. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen BMP-2 (A) oder proBMP-2 (B) behandelt. Aufgetragen sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier unabhängigen Messungen.

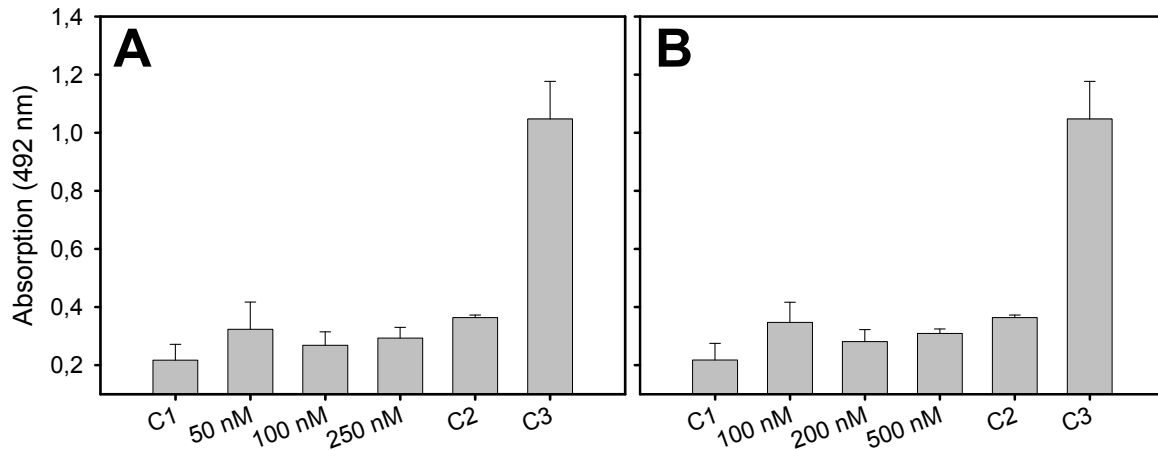


Abbildung 8.5. Bestimmung der cytotoxischen Wirkung von BMP-2 (A) oder proBMP-2 (B) auf C2C12-Zellen. Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen der Wachstumsfaktoren induziert. C1 – basale LDH-Aktivität des Mediums; C2 – LDH-Aktivität in Kontrollzellen; C3 – maximale LDH-Aktivität nach induzierter Zelllyse. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messungen.

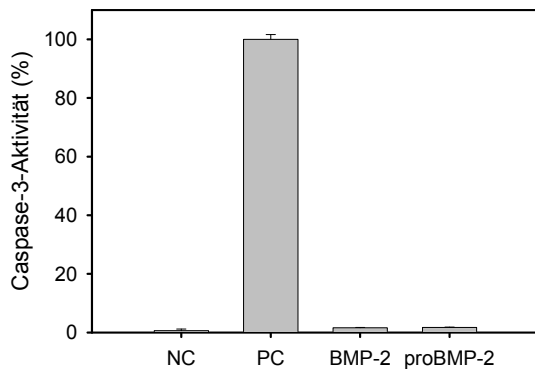


Abbildung 8.6.

Test auf proapoptotische Wirkung von proBMP-2 und BMP-2 in C2C12-Zellen. Die Zellen wurden mit 250 nM BMP-2 bzw. 500 nM proBMP-2 induziert. Die Caspase-3-Aktivität in Staurosporin-behandelten Zellen (Positivkontrolle - PC) wurde auf 100% gesetzt. Unbehandelte Zellen dienten als Negativkontrolle (NC). Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messungen.

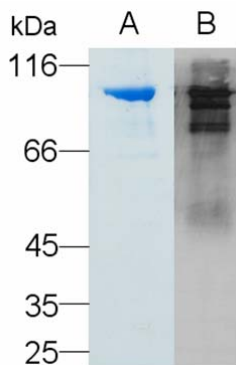


Abbildung 8.7.

Vergleich von rekombinantem proBMP-2 in Coomassie-Färbung (A) und Western Blot (B). Die SDS-PAGE wurde in beiden Fällen unter nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Für (A) wurden 8 µg und für (B) 10 ng Protein aufgetragen.

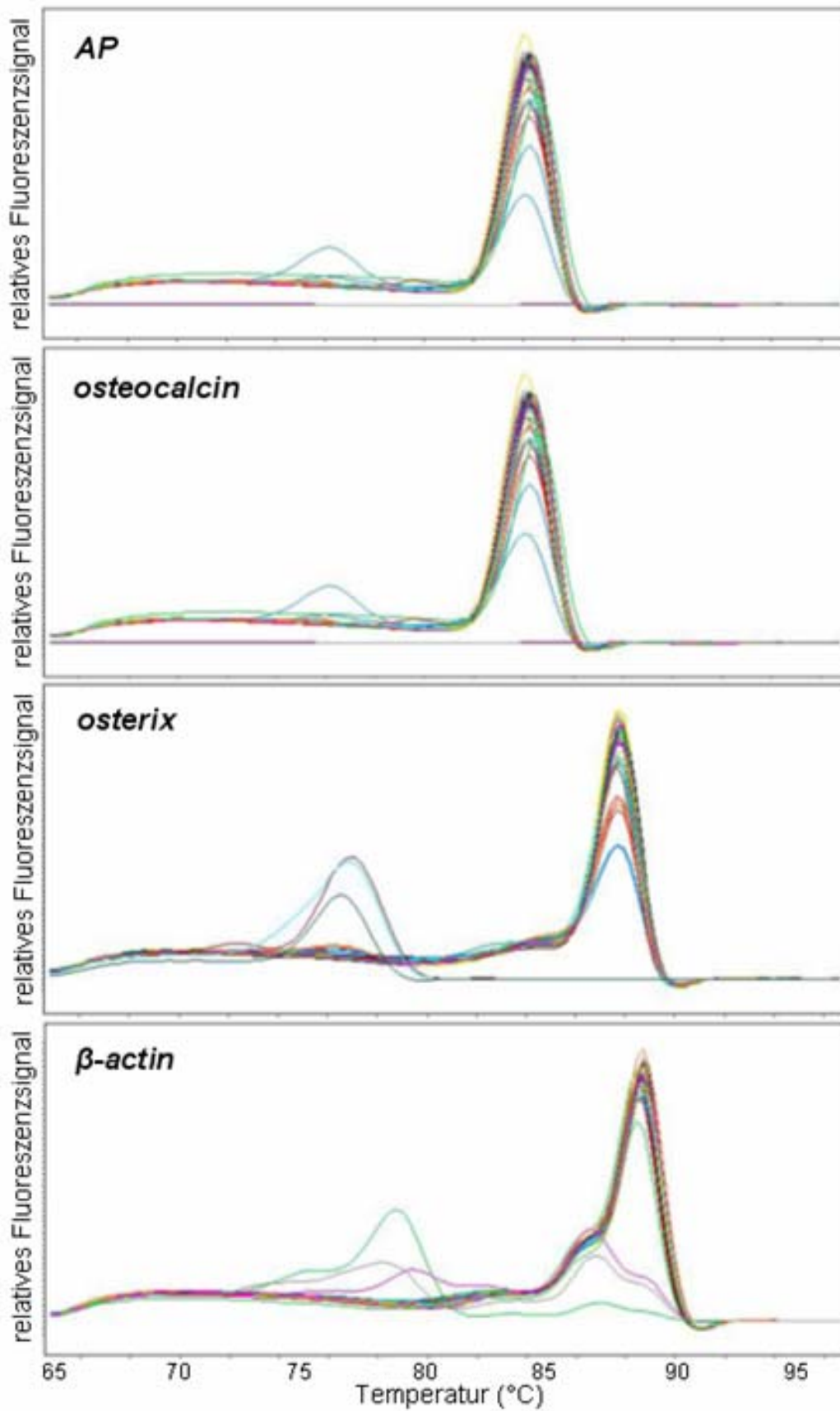


Abbildung 8.8. Schmelzkurven der *real-time*-PCR-Ansätze nach Abschluss des Amplifikationsprogramms. Die abweichenden Kurven gehören zu Kontrollläufen, in denen statt *template* das gleiche Volumen an Wasser eingesetzt wurde.

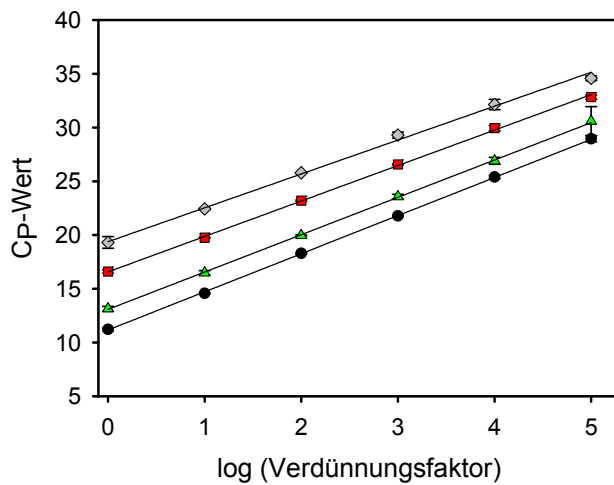


Abbildung 8.9.

Eichreihen zur Bestimmung der PCR-Effizienz. β -actin (schwarz), osteocalcin (grün), AP (rot), osterix (grau).

Tabelle 8.1. Molekulargewicht und molare Absorptionskoeffizienten der in dieser Arbeit verwendeten Proteine. Berechnet mit Hilfe des *ExpASy Proteomics Servers* des *Swiss Institute of Bioinformatics* SIB (<http://kr.expasy.org/tools/protparam.html>).

Protein	Molekulargewicht (Da)	molarer Absorptionskoeffizient ($M^{-1} \times cm^{-1}$)	
		reduziert	nicht-reduziert
BMP-2	12905	18450	18825
proBMP-2	42738	39420	39795
Propeptid	32015	20910	-
Noggin	23048	40450	40950
GDF-5	13738	15470	15845
proGDF-5	54534	40910	41410

Tabelle 8.2. Transkriptionsniveaus von *AP*, *osteocalcin* und *osterix* in C2C12-Zellen nach konzentrations- bzw. zeitabhängiger Stimulation mit BMP-2 oder proBMP-2

	Konzentration	BMP-2	proBMP-2
<i>AP</i>	10 nM	44 ± 3	10 ± 2
	20 nM	112 ± 14	54 ± 23
	50 nM	259 ± 93	200 ± 38
	100 nM	928 ± 469	216 ± 92
	200 nM	1970 ± 361	183 ± 43
<i>osteocalcin</i>	10 nM	36 ± 3	9 ± 1
	20 nM	88 ± 14	44 ± 17
	50 nM	207 ± 83	148 ± 27
	100 nM	660 ± 332	158 ± 63
	200 nM	1328 ± 228	138 ± 33
<i>osterix</i>	10 nM	45 ± 1	11 ± 2
	20 nM	95 ± 9	43 ± 4
	50 nM	207 ± 14	130 ± 2
	100 nM	410 ± 26	130 ± 8
	200 nM	525 ± 33	107 ± 6

	Zeit	BMP-2	proBMP-2
<i>AP</i>	6 h	19 ± 8	4 ± 1
	24 h	844 ± 54	23 ± 13
	48 h	928 ± 469	436 ± 19
	72 h	7910 ± 643	1038 ± 167
<i>osteocalcin</i>	6 h	1 ± 1	1 ± 1
	24 h	2 ± 1	1 ± 1
	48 h	331 ± 13	6 ± 1
	72 h	338 ± 11	15 ± 4
<i>osterix</i>	6 h	10 ± 1	2 ± 1
	24 h	214 ± 9	7 ± 1
	48 h	393 ± 64	64 ± 7
	72 h	687 ± 34	112 ± 26

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Frau Prof. Elisabeth Schwarz möchte ich Dank sagen für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, für die Überlassung des interessanten Themas und für die gute Zusammenarbeit, die Unterstützung und Betreuung der Arbeit. Herrn Prof. Rainer Rudolph danke ich für seine wertvollen Anregungen und Ideen.

Ein ganz besonderer Dank gilt allen „Bewohnern“ von Labor 262. Insbesondere möchte ich hier Reno Winter und Anja Buttstedt für ihre moralische und praktische Unterstützung und ihre stete Diskussionsbereitschaft danken. Danke für eine unvergleichliche Arbeitsatmosphäre. Ebenso danke ich den ehemaligen Doktoranden Anja Hauburger, Mirko Sackewitz und Grit Lodderstedt, sowie meinen Praktikanten und Diplomanden. Ein großes Dankeschön auch an Christiane Harnisch, die beste TA der Welt.

Nicht zuletzt möchte ich natürlich auch meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung danken, und dafür, dass sie mein Selbstvertrauen gestärkt haben, wann immer es nötig war.

Lebenslauf

❖ Persönliche Daten

Sabrina von Einem

geboren am 25.04.1980 in Schönebeck/Elbe

wohnhaft in 06110 Halle/Saale, Türkstr. 3

❖ Promotion

seit 09/2006 an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biotechnologie, Abteilung
Technische Biochemie, AG Schwarz, betreut von Prof. Dr. Elisabeth Schwarz
gefördert im Rahmen des Projekts DFG SCHW 375/5-1 der Deutschen
Forschungsgemeinschaft

❖ Studium

10/2001 – 07/2006 Diplomstudiengang Biochemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Diplomarbeit: „Untersuchungen zum Einfluss der Proteinumgebung auf die poly-L-
Alanin-vermittelte Fibrillenbildung“

❖ Berufliche Erfahrungen

02/2001 – 08/2001 als Chemielaborantin bei der LUS GmbH, Magdeburg

❖ Berufsausbildung

08/1998 – 01/2001 IHK-Lehrberuf Chemielaborantin bei der LUS GmbH, Magdeburg

❖ Schulbildung

09/1991 – 07/1998 Friedrich-Schiller-Gymnasium, Calbe/Saale mit Abschluss: Abitur

09/1986 – 08/1991 Goethe-Grundschule, Calbe/Saale

Publikationen

The pro-form of BMP-2 exhibits a delayed and reduced activity when compared to mature BMP-2

S. von Einem, S. Erler, K. Bigl, B. Frerich, E. Schwarz

Growth Factors, 2011

Published online: March 2011

A novel TWO-STEP renaturation procedure for efficient production of recombinant BMP-2.

S. von Einem, E. Schwarz and R. Rudolph

Protein Expression and Purification, 2010

Volume 73, Issue 1, Pages 65-69

Published online: March 2010

The influence of covalently linked and free polyethylene glycol on the structural and release properties of rhBMP-2 loaded microspheres.

A. Lochmann, H. Nitzsche, S. von Einem, E. Schwarz, K. Mäder

Journal of Controlled Release, 2010

Volume 147, Issue 1, Pages 92-100

Published online: July 2010

The pro-form of BMP-2 interferes with BMP-2 signalling by competing with BMP-2 for IA receptor binding.

A. Hauburger, S. von Einem, G.K. Schwaerzer, A. Buttstedt, M. Zebisch, M. Schräml, P.

Hortschansky, P. Knaus, E. Schwarz

FEBS Journal, 2010

Volume 276, Issue 21, Pages 6386-6398

Published online: October 2009

A folded and functional protein domain in an amyloid-like fibril.

M. Sackewitz, S. von Einem, G. Hause, M. Wunderlich, FX. Schmid, E. Schwarz

Protein Science, 2008

Volume 17, Issue 6, Pages 1044-1054

Published online: February 2008

Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe. Ich habe diese Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst. Ich versichere weiterhin, dass ich die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe. Ich habe mich mit dieser Arbeit weder an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, noch an einer anderen Universität oder Einrichtung um die Erlangung eines akademischen Grades beworben.

Sabrina von Einem