

Untersuchungen zur Renaturierung und
Aufreinigung von BMP-2 und BMP-4
aus *Escherichia coli*

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von
M.Sc. Matthias Krätzig
geboren am 1. Oktober 1984 in Hannover

2015

Referent: Prof. Dr. Ursula Rinas
Institut für Technische Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Korreferent: Prof. Dr. Thomas Scheper
Institut für Technische Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Tag der Promotion: 17. 12. 2015

Danksagung

Per aspera ad astra
[Seneca]

Meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Ursula Rinas danke ich herzlich für die Betreuung meiner Arbeit, die vielen Ratschläge und die freundliche Unterstützung während der gesamten Zeit.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper danke ich für die gebotenen Arbeitsmöglichkeiten, die tolle Arbeitsatmosphäre und die Übernahme des Korreferats.

Ferner danke ich Dr. Sascha Beutel und Dr. Iliyana Pepelanova für die Begleitung meiner Arbeit bis zum Schluss.

Des Weiteren danke ich meinen Projektpartnern bei Miltenyi Biotech und Sartorius für die Bereitstellung von Material und die anregende und kollegiale Zusammenarbeit.

Ich danke Martina Weiß, Cornelia Alic und Martin Pähler für die alltägliche, praktische Unterstützung.

In loser Reihenfolge danke ich insbesondere den Kollegen, die mich über die Jahre als Weggefährten intensiv begleitet haben: Michael Meyer, Christopher Wagner, Patrick Jonczyk, Bernd Tscheschke, Alexandra Heilkenbrinker, Steffen Hartwig, Thore Frister und Satish Nemani.

Den gesamten weiteren Mitarbeitern des TCI danke ich für die großartige Zeit, das tolle Arbeitsklima und die ständige Unterstützung als KellerMeister. Ferner danke ich an dieser Stelle allen, die ich vergessen habe.

Nicht zuletzt danke ich meiner gesamten Familie dafür, dass sie während der gesamten Zeit immer für mich da war; die Bedeutung dieses Beistands lässt sich in Worte nicht fassen.

Zusammenfassung

Knochenmorphogenetische Proteine (*Bone Morphogenetic Proteins, BMPs*) sind Cytokine, die zur *Transforming-Growth-Factor- β (TGF- β)*-Proteinfamilie gehören. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Wundheilung, der Zelldifferenzierung und der embryonalen Entwicklung. BMPs steuern die Osteo- und Chondrogenese und insbesondere BMP-2 und BMP-4 sind bedeutend für die Erneuerung und Heilung von Knochen.

In den letzten Jahren wurden humane BMPs mit Hilfe von rekombinanter Gentechnik hergestellt. Derzeit werden rekombinante BMPs klinisch erprobt, die mit Hilfe von Säugerzellkulturen hergestellt werden. Problematisch dabei sind die damit verbundenen hohen Kosten und geringen Ausbeuten, was die Untersuchung von Alternativen wie dem Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) interessant macht.

Eine mögliche Form der Herstellung von BMPs ist die *Renaturierung* der Cytokine aus inaktiven Proteinaggregaten (*Inclusion Bodies, IB*), die in *E. coli* produziert wurden. In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl für BMP-2 als auch BMP-4 ein spezialisierter Prozess untersucht, der die Darstellung des Homodimers ermöglicht. Zentraler Ansatzpunkt dieses Prozesses war zunächst die Herstellung des jeweiligen Cytokins in unlöslichen *IB*. Im Anschluss daran wurde für beide Proteine jeweils ein Verfahren zur Renaturierung mit dem Ergebnis der Bildung eines Homodimers entwickelt.

Im ersten Prozessschritt zur Herstellung von BMP-2 und BMP-4 wurden geeignete Kultivierungsbedingungen der rekombinanten Bakterien bestimmt. Die Anwendbarkeit eines Autoinduktionsmediums wurde gezeigt. Die Kultivierung im Schüttelkolbenmaßstab konnte erfolgreich auf einen 10-L-Bioreaktor übertragen werden.

Nach der Produktion der beiden Proteine in Form von *IB* erfolgte die Renaturierung der Cytokine. Dabei zeigte sich, dass für jedes Protein die Renaturierungspuffer separat angepasst werden müssen. Durch den Vergleich der Renaturierungskinetiken konnte erstmals ein relativer Vergleich des Renaturierungsverhaltens der beiden Proteine erbracht werden. Die abschließende Isolierung des BMP-2 erfolgte mittels Heparin-Affinitätschromatographie. Für BMP-4 zeigte sich, dass Heparin für die affinitätschromatographische Aufreinigung prinzipiell geeignet ist. Unter Verwendung der myoblastischen Zelllinie C2C12 wurde die biologische Aktivität des hergestellten BMP-2 nachgewiesen.

Schlagwörter: BMP-2, BMP-4, *E. coli*, Renaturierung

Abstract

Bone morphogenetic proteins (BMPs) are cytokines belonging to members of transforming growth factor β super family. They play a potent role in wound healing, cell differentiation and embryonic development. BMPs are known to regulate osteogenesis, in particular BMP-2 and BMP-4 are associated with bone regeneration.

During the recent years human BMPs were produced using recombinant techniques. Currently, rhBMPs evaluated in clinical trials were produced using mammalian cell cultures, however the problems associated with high cost and low yield have drifted interest towards production in *Escherichia coli* (*E. coli*).

A feasible option for the production of BMPs is the *renaturation* of the cytokines from inactive protein aggregates (inclusion bodies, *IB*), produced in *E. coli*. In the present study a specialized process has been examined for each of the two cytokines, which enables the creation of homodimers. Starting point of this approach was initially the production of both cytokines as insoluble *IB*. Subsequently a method for the renaturation of each protein has been developed, resulting in the formation of a homodimer by both proteins.

The first process step for the production of BMP - 2 and BMP - 4 led to suitable culturing conditions of the recombinant bacteria. The applicability of an autoinduction-medium was shown. Culturing in shake flasks was successfully transferred to a 10-L-bioreactor.

Following the production of the two proteins in form of *IB*, the renaturation of the cytokines was performed. It was found that for each protein renaturation-buffer must be adjusted separately. By comparing the renaturation-kinetics of the two proteins, a relative comparison of the renaturation-behavior could be provided for the first time. The final isolation of BMP-2 was performed by heparin affinity-chromatography. For BMP-4 it was shown that heparin affinity-chromatography is suitable for purification in principle. Utilizing the myoblastic cell line C2C12, the biological activity of the produced BMP-2 was proven.

Keywords: BMP-2, BMP-4, *E. coli*, renaturation

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Zielsetzung.....	2
3	Theoretische Grundlagen	3
3.1	Cytokine	3
3.1.1	TGF- β -Superfamilie.....	3
3.1.2	Knochenmorphogenetische Proteine (BMPs).....	6
3.1.3	BMP-4.....	13
3.1.4	BMP-2.....	19
4	Experimenteller Teil.....	21
4.1	Konzeptvorstellung	21
4.2	Expressionssystem.....	23
4.3	Produktion von BMP-2 und BMP-4 als <i>IB</i> in <i>E. coli</i>	25
4.3.1	LB-Medium	25
4.3.2	Auto-Induktions-Medium (AI-Medium).....	29
4.3.3	AI-Medium 10-L-Bioreaktor	30
4.3.4	AI-Medium 10-L-Bioreaktor BMP-2.....	31
4.3.5	AI-Medium 10-L-Bioreaktor BMP-4.....	35
4.4	Prozessierung BMP-2 und BMP-4.....	38
4.5	Renaturierung des BMP-X Monomers	39
4.5.1	CHES	40
4.5.2	CHAPS	40
4.5.3	Vergleich der Renaturierung mit CHES und CHAPS.....	41
4.5.4	Einfluss der Ionenstärke.....	43
4.5.5	Vergleich der Kinetik von BMP-2 und BMP-4	45
4.6	Aufreinigung von BMP-X.....	49
4.6.1	BMP-2 Heparin-Chromatographie.....	50
4.6.2	BMP-4 Heparin-Chromatographie.....	53
4.6.3	Fazit des Kapitels.....	56
4.7	Biologische Testung.....	57
4.7.1	Qualitative und quantitative Analyse.....	57
4.7.2	C2C12-Zellen als Testsystem	57
4.7.3	Alkaline Phosphatase Aktivitäts Assay / EC ₅₀ -Bestimmung	58
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	60
6	Anhang.....	64
6.1	Betreute Arbeiten	64

6.2	Proteinsequenzen BMP-2 und BMP-4	65
6.3	Zusätzliche experimentelle Daten	66
6.3.1	Weitere SDS-Gele	66
6.4	Methoden	73
6.4.1	Allgemeine Techniken	73
6.4.2	Zellaufschluss	74
6.4.3	HPLC-Analytik	75
6.4.4	Bradford	76
6.4.5	Prozessierung	76
6.4.6	SDS-PAGE und Färbungen	77
6.4.7	Densitometrie	80
6.4.8	Renaturierung	80
6.4.9	Aufreinigung	82
6.4.10	Dialyse	83
6.4.11	Quantifizierung	83
6.4.12	Alkaline Phosphatase Aktivitäts Assay	84
6.4.13	MALDI-TOF-MS	84
6.4.14	Anlegen von Gefrierkulturen	85
6.4.15	Kultivierungen in LB-Medium	85
6.4.16	Kultivierungen im Auto-Induktions-Medium	86
6.4.17	Kultivierungen im Auto-Induktions-Medium im 10-L-Bioreaktor	87
6.5	Materialien	89
6.5.1	Verwendete Chemikalien	89
6.5.2	Verwendete Verbrauchsmaterialien	91
6.5.3	Verwendete Geräte	91
6.5.4	Verwendete Stämme und Vektorkarten	92
7	Literatur	95

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur des BMP-2 als repräsentativem Vertreter der TGF- β -Superfamilie.	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Struktur von reifem BMP.	5
Abbildung 3: Phylogenetischer Baum der menschlichen Proteine der TGF- β -Familie.	8
Abbildung 4: Flussdiagramm des Produktionsprozesses von BMP-2 und BMP-4 (= BMP-X)	22
Abbildung 5: Exemplarische Vektorkarte eines verwendeten pET-Vektors (pET24a(+)-hBMP4. .	24
Abbildung 6: Überprüfung der BMP-2-Proteinsynthese, Ganzzellprotein (WCP).	26
Abbildung 7: Überprüfung der BMP-2-Proteinsynthese, unlösliche Fraktion (IP).....	27
Abbildung 8: Überprüfung der BMP-2-Proteinsynthese, lösliche Fraktion (SP).	27
Abbildung 9: Überprüfung der BMP-4-Proteinsynthese, unlösliche Fraktion (IP).....	28
Abbildung 10: Überprüfung der BMP-Proteinsynthese in Auto-Induktions-Medium (AIM), unlösliche Fraktion (IP).....	30
Abbildung 11: Analyse der 10-L-Auto-Induktions-Kultivierung von BMP-2.....	32
Abbildung 12: Zeitlicher Verlauf der BMP-2 Expression als SDS-PAGE des normierten Ganzzellproteins (WCP).....	34
Abbildung 13: Analyse der 10-L-Auto-Induktions-Kultivierung von BMP-4.....	35
Abbildung 14: Zeitlicher Verlauf der BMP-4 Expression (normiertes WCP)	37
Abbildung 15: Vergleich der Renaturierungen von BMP-2 und BMP-4 mit CHES bzw. CHAPS. Gradienten-Gel (Übersichts-Gel I).	42
Abbildung 16: Einfluss der Ionenstärke auf die Renaturierung von BMP-4	44
Abbildung 17: Exemplarische SDS-PAGE der CHAPS-Renaturierung (Detail-Gel CHAPS I).	45
Abbildung 18: Relativer Vergleich der Renaturierungs-Kinetiken	47
Abbildung 19: Normierte Dimerisierung-Kinetiken.....	48
Abbildung 20: Chromatogramm der BMP-2 Aufreinigung mittels Heparinaffinitäts-Chromatographie.	51
Abbildung 21: Ergebnis der BMP-2 Aufreinigung mittels Heparinaffinitätschromatographie.	52
Abbildung 22: Chromatogramm der BMP-4 Aufreinigung mittels Heparinaffinitäts-Chromatographie.	53
Abbildung 23: Ergebnis der BMP-4 Aufreinigung mittels Heparinaffinitätschromatographie.	55
Abbildung 24: EC ₅₀ -Bestimmung von BMP-2.....	58
Abbildung 25: SDS-PAGE der BMP-4 Proteinsynthese, Ganzzellprotein (WCP)	66
Abbildung 26: SDS-PAGE der BMP-4 Proteinsynthese, lösliche Fraktion (SP).....	67
Abbildung 27: SDS-PAGE der normierten unlöslichen Fraktion (IP) der BMP-2 Expression	68
Abbildung 28: Vergleich der Renaturierungen mit CHES bzw. CHAPS (Übersichts-Gel II).....	69
Abbildung 29: SDS-PAGE der CHAPS-Renaturierung (Detail-Gel CHAPS II)	70
Abbildung 30: SDS-PAGE der CHES-Renaturierung (Detail-Gel CHES I).....	71
Abbildung 31: SDS-PAGE der CHES-Renaturierung (Detail-Gel CHES II)	72
Abbildung 32: CHES (N Cyclohexyl 2 aminoethansulfonsäure)	80
Abbildung 33: CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat)	81
Abbildung 34: Hemmung der Proteinfaltung durch Zugabe von Iodacetamid.	81
Abbildung 35: Vektorkarte pET9a-hBMP2	92
Abbildung 36: Vektorkarte pET24a(+)-hBMP2	93
Abbildung 37: Vektorkarte pET9a-hBMP4	93

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation der BMPs. Tabelle nach [18]	10
Tabelle 2: Zusammensetzung des CHES-Renaturierungs-Puffers.....	40
Tabelle 3: Zusammensetzung des CHAPS-Renaturierungs-Puffers	41
Tabelle 4: Normierte Dimerisierung von BMP-2_{CHES}	49
Tabelle 5: Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele (Angaben für zwei Gele).....	78
Tabelle 6: Zusammensetzung des CHES-Renaturierungs-Puffers.....	80
Tabelle 7: Zusammensetzung des CHAPS-Renaturierungs-Puffers	81
Tabelle 8: Übersicht der Puffer für die Isolierung von BMP-X.....	82
Tabelle 9: Übersicht der verwendeten Chemikalien.....	89

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure(n)
AIM	Auto-Induktions-Medium
(rh)BMP	rekombinantes, humanes Bone Morphogenetic Protein
bp	Basenpaar
CDMP	Cartilage-derived-morphogenetic-proteins
Cys	Cystein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DAB	Defined Autoinducing Broth
DNB	Defined Noninducing Broth
DSB	Disulfidbrücke(n)
E. coli	Escherichia coli
FDA	US Food and Drug Administration
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GFCK	Growth Factor Cystin Knot
GDF	Growth Differtiation Factor
GVO	Gentechnisch veränderter Organismus
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
ICK	Inhibitor Cystin Knot
IB	Einschlusskörperchen (Inclusion Bodies)
IP	Unlösliche Fraktion (Insoluble Part)
k_La	volumenbezogener Sauerstoffübergangskoeffizient
kDa	Kilo-Dalton
L	Liter
LB	<i>engl.</i> lysogeny broth
LAL-Test	Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test
M	Proteinmarker
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization
MAP	mitogen-activated protein
OD₆₀₀	Optische Dichte, bei $\lambda = 600$ nm
pET	Plasmid Expression by T7-RNA-Polymerase
pH	<i>lat.</i> Potentia Hydrogenii
PMID	PubMed-Identifikator
pO₂	Sauerstoffpartialdruck
rel. AU	Relative Absorptionseinheiten
RPM	<i>engl.</i> rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur (~23 °C)
S	Siemens

SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SMAD	small () mothers against decapentaplegic
SP	Lösliche Fraktion (Soluble Part)
VE-Wasser	voll entsalztes Wasser
WCP	Ganzzellprotein (Whole Cell Protein)

1 Einleitung

Zentrale Akteure im komplexen Wechselspiel der Knochenbildung sind Eiweiße in den Knochenzellen, die so genannten Knochenmorphogenetischen Proteine (*Bone Morphogenetic Proteins, BMPs*). Neben ihrer namensgebenden Funktion erfüllen sie viele weitere, verschiedene und wichtige Aufgaben im gesamten menschlichen Organismus. Diese BMPs zählen zu den hormonähnlichen Cytokinen. Sie werden von verschiedensten Geweben ausgeschüttet, um Wachstum und Differenzierung anderer Zellen zu beeinflussen. Diese Beeinflussung kann beispielsweise die Spezialisierung hin zu einer Knochenzelle sein. Aber die Wirkung erstreckt sich auch auf viele andere Bereiche wie etwa die embryonale Entwicklung. Nicht zuletzt haben BMPs auch Einfluss auf andere Krankheiten wie Gefäßerkrankungen oder Krebs. Die Erforschung von BMPs ist somit von großem, medizinischem Interesse. Zwei Mitglieder der BMP-Proteinfamilie sind bereits als Arzneimittel zugelassen.

BMPs wurden ursprünglich unmittelbar aus Knochen isoliert, allerdings mit geringer Ausbeute (1-3 µg/kg) [1]. Ferner stellen die potentiellen Gesundheitsrisiken von solchen Isolaten aus Gewebespenden eine hohe Hürde für die klinische Anwendung dar [2]. Die naheliegende, rekombinante Herstellung (also die biotechnologische Herstellung mittels gentechnisch veränderten Organismen) humaner BMPs (rhBMP) wurde auf verschiedene Weisen demonstriert.

Eine davon besteht in der Produktion mit Hilfe des Darmbakteriums *E. coli*. Allerdings stellt dieses das Protein in unlöslichen Einschlusskörperchen her und eine aufwändige Nachbehandlung des Cytokins wird nötig. Dabei können die Bedingungen für die Behandlung von Protein zu Protein variieren, was eine individuelle Herangehensweise erforderlich macht. Diese Arbeit befasst sich mit der Herstellung der beiden Proteine BMP-2 und BMP-4 aus der Proteinfamilie der BMPs.

2 Zielsetzung

Die Aufgabenstellung im Rahmen dieser Dissertation verfolgte zwei Ziele. Zum einen sollte die Produktion von bioaktivem BMP-2 aus *E. coli* realisiert werden. Zum anderen sollte untersucht werden, ob die existierende Methode zur Herstellung von BMP-2 auf das nahverwandte Cytokin BMP-4 übertragbar ist. Im Anschluss sollten die Verfahren und Ergebnisse miteinander verglichen werden.

Beide Cytokine aus der Familie der knochenmorphogenetischen Proteine (BMPs) spielen eine wichtige Rolle im Zuge der Osteo- und Chondrogenese und stellen somit einen wichtigen Gegenstand der medizinischen Forschung dar.

Der Ansatz geht dabei von der Produktion beider Proteine als unlösliche *Inclusion Bodies* aus. Diese müssen anschließend im Zuge der *Renaturierung in vitro* solubilisiert und in die Form des bioaktiven Homodimers überführt werden. Die gesamten Prozessbedingungen zur Produktion von BMP-2 und BMP-4 (Kultivierung der Bakterien, Renaturierung des Zielproteins, Aufreinigung) sollten erarbeitet und verglichen werden. Die Testung der biologischen Aktivität der beiden Cytokine sollte die Arbeit abschließen.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Cytokine

Der Begriff Cytokine beschreibt eine umfangreiche und lose Gruppe kleiner (5-100 kDa) Proteine [3] die eine wichtige Rolle in der Signalübertragung von Zellen spielen. Der Name leitet sich vom Griechischen „κύτταρο“ *kyttaro* „Zelle“ und „κίνησης“ *kinesis* „Bewegung“ und bedeutet so viel wie „sich zwischen den Zellen bewegend“. Cytokine regulieren insbesondere die Differenzierung und Proliferation ihrer Zielzellen [4].

In der unscharfen Abgrenzung zu Hormonen wird die Mannigfaltigkeit von Cytokinen deutlich: Während Hormone eine Zellart zum Produzenten haben und üblicherweise eine bestimmte Funktion in einem oder wenigen Zielzelltypen im Organismus erfüllen, werden Cytokine häufig in verschiedensten Geweben produziert. Bei Cytokinen hingegen kommt es zur Überschneidung von Wirkspektren (Redundanz), d. h. gleiche oder ähnliche Reaktionen der Zellen werden von unterschiedlichen Cytokinen ausgelöst [5]. Und umgekehrt haben Cytokine mehrere Funktionen (*Pleiotropie*), können also in unterschiedlichen Zellarten verschiedene Effekte hervorrufen. Darüber hinaus werden Hormone durchweg endokrin sezerniert. Cytokine hingegen wirken meist auto- oder parakrin. Schließlich besitzen Hormone eine typische Konzentration im nanomolaren Bereich, wohingegen Cytokine bereits im picomolaren Bereich beginnen zu wirken.

Historisch bedingt werden innerhalb der Cytokine mehrere Hauptgruppen unterschieden: Beispielsweise Interferone (INF), Interleukine (IL), Tumornekrosefaktoren (TNF), Chemokine, Koloniestimulierende Faktoren (CSF). Gleichwohl ist diese Unterteilung aufgrund von Pleiotropie und Redundanz der Cytokine nicht abgeschlossen und streng genommen obsolet.

Genauso wie die Namensgebung ist auch die Einteilung der Cytokine historisch gewachsen: Für gewöhnlich lassen sich drei Arten von Einteilungen unterscheiden; nach Struktur, Funktion oder Rezeptoren. Eine Einteilung nach Funktion erlaubt auch, bestimmte Proteine als Gruppe der Wachstumsfaktoren (Growth Factors, GFs) zu subsumieren. Der Ausdruck Wachstumsfaktor wird auch synonym für Cytokin verwendet [6]; erster zielt eher auf die proliferativen Eigenschaften eines Cytokins ab [7].

3.1.1 TGF- β -Superfamilie

Ordnet man die Wachstumsfaktoren nach ihrer Struktur bzw. ihren Rezeptoren, so ergibt sich unter anderem die sog. TGF- β -Proteinsuperfamilie. Ihr gehören als größte Proteinfamilie die Knochenmorphogenetischen Proteine (*Bone Morphogenetic Proteins*,

BMPs) an [8]. Deren nächste Verwandte sind die Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (*Growth Differentiation Factors*, GDFs). Weitere Mitglieder sind die Gruppen der Aktivine (Acts) bzw. Inhibine (Inhs) oder auch einzelne Proteine wie das NODAL oder Anti-Müller-Hormon (AMH), welches bei der Geschlechtsentwicklung eine Rolle spielt [9]. Die Anzahl der TGF- β -Familienmitglieder steigt mit zunehmender Komplexität des Organismus. So finden sich im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* 5, in Säugern über 30 Mitglieder [10]. Erstaunlich ist, dass diese Mitglieder über Speziesgrenzen hinweg einen sehr hohen Konservierungsgrad aufweisen [11].

Allen Proteinen der TGF- β -Superfamilie gemein ist ihre Struktur, in der zwei Monomere sich zu einem Dimer zusammenlagern. Bei der Mehrheit der Proteine wird dieses Dimer über eine intermolekulare Disulfidbrücke verbunden. Jedes Monomer wiederum formt als hochkonserviertes Strukturmotiv einen sog. Cystinknoten aus. Er findet sich in fast allen sekretorischen Glykoproteinen, zu denen neben den TGF- β -Proteinen auch die Glykoprotein-Hormone (GP) gehören [12]. Das Motiv besteht aus 10 Aminosäuren, wobei 6 Aminosäuren Cysteine sind. Diese sechs Cysteine formen drei intramolekulare Disulfidbrücken. Besonders daran ist, dass zwei dieser Brücken einen Ring formen und die dritte Brücke durch diesen Ring hindurch gebildet wird. Die so gebildete Rotaxane-Substruktur ist besonders stabil [13].

BMP-2

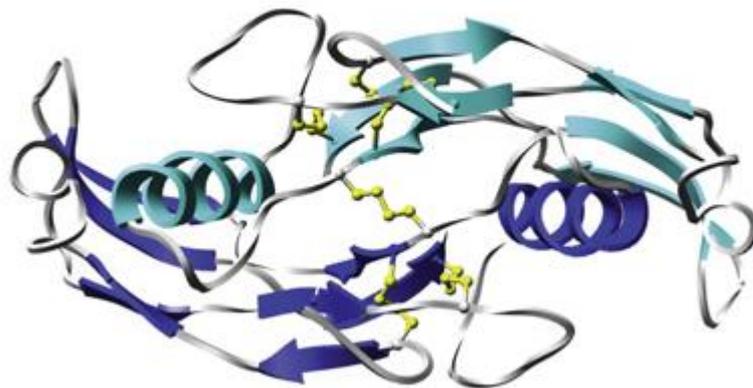


Abbildung 1: Struktur des BMP-2 als repräsentativem Vertreter der TGF- β -Superfamilie. Die beiden Monomere sind in hellem und dunklem Blau dargestellt. Die Disulfidbrücken sind gelb hervorgehoben. Die Dimerstruktur wird bildlich auch beschrieben als ein Paar linker Hände: Das Handgelenk (α -Helix) der einen Hand liegt dabei auf dem Handballen (den zentralen, konkaven β -Faltblättern) der anderen Hand. Quelle: [14]; mit Genehmigung des Elsevier-Verlags.

Abbildung 1 zeigt die Struktur von BMP-2 als repräsentativem Vertreter der TGF- β -Superfamilie. Die beiden Monomere sind in verschiedenen Blautönen abgebildet. Die intermolekulare Disulfidbrücke ist zentral in gelb zu erkennen. Auch die

jeweils drei intramolekulare Disulfidbrücken, die den Cystinknoten bilden, sind gelb dargestellt.

Die Dimerstruktur wird bildlich auch beschrieben als ein Paar linker Hände: Das Handgelenk (α -Helix) der einen Hand liegt dabei auf dem Handballen (den zentralen, konkaven β -Faltblättern) der anderen Hand [14]. Der Cystinknoten bildet darin die Handflächen. Die beiden Handflächen wiederum werden über die intermolekulare Disulfidbrücke zum Dimer verknüpft.

Bei Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie liegt im Cystinknoten das Aminosäuremuster $\text{Cys}_2\text{-X-Gly-X-Cys}_3$ und $\text{Cys}_5\text{-X-Cys}_6$ vor. Der Cystinknoten in Wachstumsfaktoren (GFCK) wie beispielsweise TGF- β -Mitgliedern wird von drei Disulfidbrücken gebildet; die Cysteine werden von 1 bis 6 durchnummeriert. Die Cysteine 2 und 5 bzw. 3 und 6 bilden den Ring und die ihn durchdringende Brücke wird von Cystein 1 und 4 gebildet (s. Abbildung 2).

Hierin unterscheidet sich der GFCK vom „Inhibitor Cystine Knot“ (ICK) wie er in Toxinen von z. B. Schlangen vorkommt. Bei dieser Klasse von Proteinen, die als *Knottins* bezeichnet werden, wird die durchdringende Brücke von den Cysteinen 3 und 6 realisiert [12].

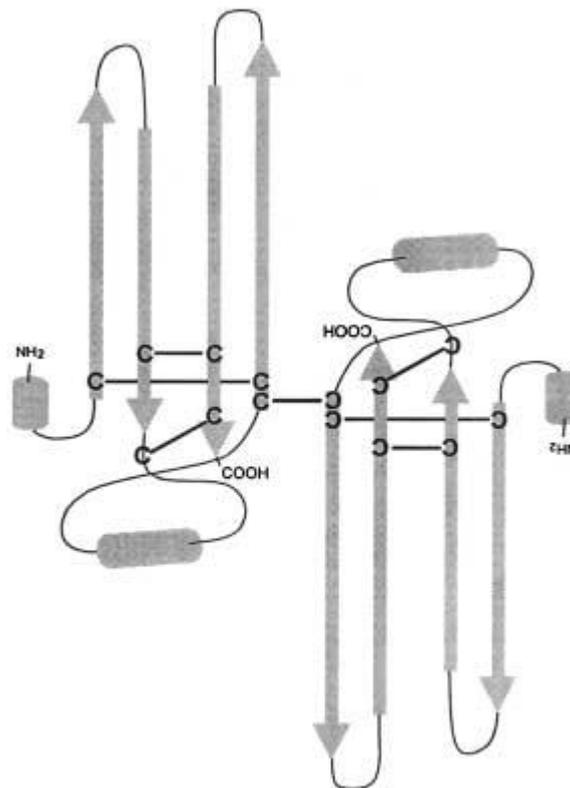


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Struktur von reifem BMP.

Das aktive Molekül ist ein Dimer in dem 6 Cysteine den Cystinknoten ausbilden und insgesamt 7 bis 9 Cysteinreste an der Ausbildung der Dimerstruktur beteiligt sein können. Die Disulfidbrücken $\text{Cys}_2\text{-Cys}_5$ und $\text{Cys}_3\text{-Cys}_6$ formen einen Ring, der von der Disulfidbrücke $\text{Cys}_1\text{-Cys}_4$ durchzogen wird. Ein häufig vorhandenes siebtes Cystein, zwischen den Cysteinen Cys_3 und Cys_4 bildet eine intermolekulare Disulfidbrücke, die das Dimer zusätzlich stabilisiert. Quelle: [15]; mit Genehmigung des Springer-Verlags.

BMPs sind stets als Dimere bioaktiv. Durch Anlagerung der hydrophoben Bereiche der Monomere entsteht ein hydrophober Kern im Innern des Dimers; dieser stabilisiert das Protein zusätzlich [16].

Die meisten Mitglieder der TGF- β -Familie besitzen ein siebtes Cystein. Dieses bildet in den meisten Fällen eine intermolekulare Disulfidbrücke aus; es befindet sich in der Polypeptidkette zwischen Cystein 3 und 4. Die für die Bioaktivität notwendige Dimerisierung wird dadurch begünstigt [17]. Es können sowohl Hetero- als auch Homodimere gebildet werden, die Anzahl der Kombination steigt dadurch an [11]. Nicht alle Mitglieder der Superfamilie besitzen dieses siebte Cystein (z. B. GDF-3 und GDF-9). Diese Tatsache lässt den Schluss zu, dass die Bildung der intermolekularen Disulfidbrücke für die Dimerisierung nicht essentiell ist [17].

3.1.2 Knochenmorphogenetische Proteine (BMPs)

Innerhalb der TGF- β -Superfamilie bilden die Knochenmorphogenetische Proteine (*Bone Morphogenetic Protein, BMP*) mit einem Drittel der bis heute identifizierten Mitglieder die größte Subgruppe [17]. BMPs sind eine Gruppe von kleinen, etwa 120 Aminosäuren (AS) langen, dimeren [18] Cytokinen, die aufgrund ihrer vielfältigen Funktionen auch als Metabologene bezeichnet werden [19].

Der Proteinfamilie wurden bisher 20 Mitglieder zugeordnet [8]. BMPs regulieren die Osteo- und Chondrogenese, also das Wachstum von Knochen- und Knorpelzellen, sind aber auch an vielen, verschiedenen anderen Vorgängen wie z. B. der Embryogenese beteiligt [20]. Auf Grund der engen Verwandtschaft tragen manche BMPs synonym Namen von den Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (*Growth Differentiation Factors, GDFs*), die an vielfältigsten Entwicklungsvorgängen Anteil haben [21].

BMPs bzw. ihre homologen Pendanten und der entsprechende TGF- β -Signalweg kommen, neben dem Menschen, in vielen unterschiedlichen Organismen vor; so z. B. in der Taufliege *Drosophila melanogaster*, dem Zebrafisch *Danio rerio* oder dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*.

Als pleiotropes Cytokin haben die Art des BMPs, die Modulation des Signals oder auch der Status der angesteuerten Zellen einen Einfluss auf die Wirkung des BMPs. Daher ist eine vereinfachende Beschreibung der Funktion der BMPs schwierig. Ihren Namen erhielten die Proteine, weil sie u. a. die Fähigkeit besitzen, als Wachstumsfaktoren die Knochenbildung anzuregen: 1965 zeigte Urist erstmals, dass ektopische Knochenbildung mittels Autoinduktion möglich ist [22]. Hierzu hatte er demineralisierte Knochenteile in Muskeln von Versuchstieren verpflanzt. Durch weiterführende Arbeiten konnte er spezielle Proteine für diese Vorgänge ausmachen und taufte sie 1971 als *Bone Morphogenetic Proteins* [23]. Ein zentrales Problem für die Aufreinigung der BMPs war die Unlöslichkeit der demineralisierten

Knochenmatrix. Diese Hürde konnten Reddi und Sampath überwinden, indem sie hochmolekulare Lösungen chaotroper Substanzen wie Harnstoff oder Guanidinhydrochlorid zur Extraktion verwendeten. Ferner konnten sie zeigen, dass sich die Extrakte renaturieren lassen und so die biologische Aktivität wiederhergestellt werden kann [24]. Diese Arbeiten waren grundlegend für die spätere, erstmalige rekombinante Herstellung von BMPs durch Wozney [25].

Ursprünglich wurden 7 Proteine deklariert. Später konnte gezeigt werden, dass 6 davon (BMP-2 bis BMP-7) zur TGF- β -Familie gehören [25]. BMP-1 hingegen gehört nicht zu dieser Gruppe. Es handelt sich vielmehr um eine Metalloprotease, die in die Knorpelentwicklung und der Umwandlung von Prokollagen zu Kollagen involviert ist [26]. Im Laufe der Zeit wurden weitere 13 BMPs entdeckt, womit sich die Gesamtzahl auf 20 beläuft.

Alle Mitglieder der TGF- β -Familie wirken als Liganden für enzymgekoppelte Rezeptoren. Diese weisen auf der cytosolischen Seite der Plasmamembran eine Serin/Threonin-Kinase-Domäne auf. Es wird zwischen zwei Arten dieser Kinasen unterschieden. Es wird immer eine bestimmte Kombination von Typ I und Typ II Rezeptoren von jeweils einem Monomer aktiviert, womit ein tetramerer Komplex entsteht [27]. BMPs haben üblicherweise eine höhere Affinität zu Typ I Rezeptoren. Allerdings variieren die Affinitäten über die einzelnen Mitglieder der BMP-Familie und zahlreiche Kombinationen wurden gefunden. Die Art der Aktivierung bestimmt den weiteren Verlauf des Signalwegs. Rekrutiert der Typ I Rezeptor den Typ II Rezeptor, erfolgt die Signaltransduktion über den *MAP-Kinase* Signalweg. Wird ein bereits gebildeter Rezeptorkomplex aktiviert, so erfolgt die Signalweiterleitung *Smad*-abhängig.

3.1.2.1 Klassifikation von BMPs

Der Gruppierung aller gefundenen BMPs liegt ein Sequenzvergleich der C-terminalen Growth-Factor-Domäne zugrunde [28]. Das mature Protein besitzt neben dem hochkonservierten Cystinknotenmotiv eine aminoterminal Sequenz von etwa 120 Aminosäuren [29, 30]. Beide Bereiche werden in den Vergleich mit einbezogen und erlauben eine Einteilung der BMPs in 4 Subgruppen [18]. Die Sequenzidentität innerhalb einer Gruppe beträgt 75-92 %, die Identität zu Mitgliedern anderer Gruppen 40-60 % [28].

Die erste Subgruppe bilden die in dieser Arbeit behandelten Proteine BMP-2 und BMP-4. Ihre Sequenzidentität liegt bei 80 % [18], die Sequenzähnlichkeit bei 92 % [31]. Wegen der großen Ähnlichkeit (83 % Sequenzidentität) werden BMP-3 und GDF-10 als zweite Gruppe zusammengefasst [32]. Das besser als Nodal bekannte BMP-16 ist am engsten mit der zweiten Gruppe verwandt. Die dritte Gruppe bilden die

fünf Proteine BMP-5, -6, -7, 8A (auch OP-2) und BMP-8B. Deren Sequenzähnlichkeit beträgt im Mittel 78 %. Die Proteine GDF-5 bis GDF-7 bilden die vierte Gruppe. Aufgrund der Entdeckungsgeschichte als GDFs benannt, weisen sie gleichwohl auch knorpel- und knocheninduktive Eigenschaften auf; daher fasst man sie auch als *cartilage-derived-morphogenetic-proteins* (CDMP) zusammen. Synonym finden die Bezeichnungen BMP-14 bzw. BMP-13 und -12 Verwendung. Die Sequenzübereinstimmung beträgt in dieser Gruppe 80-86 %. Die anderen BMPs wurden bisher nicht in weitere Untergruppen eingeteilt [33].

Abbildung 3 [14] zeigt einen phylogenetischen Baum der menschlichen Proteine der TGF- β -Familie. Die Konstruktion des Baums basiert auf einem Alignment der reifen, C-terminalen Domäne. In der Abbildung lassen sich sehr gut die vier beschriebenen Subgruppen erkennen. Ferner wird die enge Verwandtschaft zu den GDF deutlich.

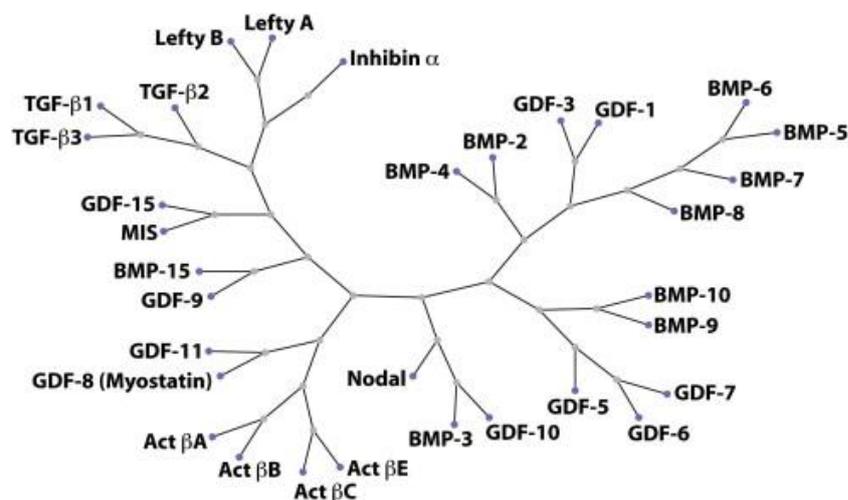


Abbildung 3: Phylogenetischer Baum der menschlichen Proteine der TGF- β -Familie. Die Konstruktion des Baums basiert auf einem Alignment der reifen, C-terminalen Domäne. Quelle: [14]; mit Genehmigung des Elsevier-Verlags.

Die Pleiotropie der BMPs führt dazu, dass sie in vielen Geweben anwesend sind. Der originäre Name Knochenmorphogenetische Proteine ist daher irritierend. Die namensgebende Eigenschaft dieser Proteine, Knochen- und Knorpel(neu-)bildung zu induzieren, wurde nur für sieben BMPs (BMP-2 bis -7 und -9) gefunden [33]. Demgegenüber gibt es mit BMP-3 und BMP-13 interessanterweise zwei BMPs die die Knochenbildung negativ regulieren bzw. sogar als Inhibitor derselben wirken [18, 34].

Insgesamt haben alle Mitglieder der BMP-Familie ein sehr breites Wirkspektrum. BMPs sind in Zelldifferenzierung und -proliferation aber auch in Morpho- und Organogenese in verschiedenster Weise involviert [17]. Auch steuern sie über Apoptose beispielsweise die Rückbildung der Schwimmhäute [35], was bei Menschen und Fröschen zur Ausbildung der Finger führt. Erstaunlicherweise sind BMPs die einzigen

Wachstumsfaktoren, die Bindegewebszellen in Osteoprogenitorzellen umzuwandeln vermögen – und damit fähig, den Zelltyp zu verändern [29].

Pleiotropie und die hohe Anzahl an Wirkorten brachte eine große Zahl an Synonymen für die Mitglieder der BMP-Familie hervor. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die verschiedenen BMPs, ihre Funktionen und Synonyme.

Tabelle 1: Klassifikation der BMPs. Tabelle nach [18]

Subgruppe	BMP	Synonym	Funktion	Genexpression	Entdeckungsjahr/ PMID
BMP-2/4	BMP-2	BMP-2A BDA-2	Induziert Knochen- und Knorpelbildung	Darm; Niere; Kehlkopf; Bindegewebe; Milz; Prostata; Fruchtwasser; Auge; Herz; Ganglien; Gebärmutterhals; Plazenta; Lunge; Pankreas; Gehirn; Magen; embryonales Bindegewebe; Leber	1988 (3201241)
	BMP-4	BMP-2B MCOPS6 OFC11 ZYME	Induziert Knorpel- und Knochenbildung; Mesoderminduktion; Zahnentwicklung; Gliedmaßenentwicklung; Frakturheilung Stimuliert Bildung der Milchgänge; Inhibiert Haarfollikel-induktion.	Embryonales Bindegewebe; Plazenta; Leber; Bauch; Gehirn; Knochen; Prostata; Gefäße; Auge; Hoden; Mund	1988 (3201241)
BMP-3	BMP-3A	Osteoginin BMP-3	Negativ-Regulator der Knochendichte; inhibiert Osteoblasten-Differenzierung.	Knochenmark; Auge; Lunge; Rachen; Muskeln; embryonales Bindegewebe; Prostata; Blut	1988 (3201241)
	BMP-3B	GDF-10	Zellwachstum und Differenzierung in embryonalem und adulten Gewebe.	Hoden, Gehirn; Ohr; Lunge; Auge; embryonales Bindegewebe; Zirbeldrüse; Kehlkopf; Herz	1995 (8679252)
	BMP-16	Nodal	Essentiell für die Bildung des Mesoderms.	Embryonales Bindegewebe; Hoden	1999 (US Patent No.596503)
BMP-5	BMP-5	/	Induziert Knorpel- und Knochenbildung	Plazenta; Herz; Thymus; Uterus; Hoden; Bindegewebe; Eierstöcke; Brustdrüse; embryonales Bindegewebe; Lunge; Pankreas; Leber; Gehirn; Muskeln; Luftröhre, Prostata; Auge; Darm	1990 (2263636)
	BMP-6	VGR (-1)	Induziert Knorpel- und Knochenbildung; mögliche Rolle in der frühen Entwicklung.	Gefäße; Auge; embryonales Bindegewebe; Darm; Blut; Plazenta; Gehirn; Eierstöcke; Lunge; Prostata; Uterus; Hoden; Nabelschnur; Kehlkopf, Gebärmutterhals; Niere; Brustdrüse; Bindegewebe; Mund; Nebenschilddrüse	1990 (2263636)
	BMP-7	OP-1	Induziert Knorpel- und Knochenbildung; Vermutlich der osteoinduktive Faktor der für das Phänomen der epithelen Osteogenese verantwortlich ist; Calcium-Regeneration; Knochenhomöostase	Gehirn; Plazenta; Auge; Hoden; Niere; Prostata; Muskel; Herz; embryonales Bindegewebe; Darm; Brustdrüse; Bauch; Eierstöcke; Mund; Thymus; Luftröhre; Bindegewebe; Uterus; Haut; Mandel; Lymphe; Lymphknoten; Lunge; Ganglion; Pankreas; Knochen	1990 (2263636)
	BMP-8A	OP-2	Induziert Knorpel- und Knochenbildung; Vermutlich der osteoinduktive Faktor der für das Phänomen der epithelen Osteogenese verantwortlich ist; Calcium-Regeneration; Knochenhomöostase. (Ähnlichkeitsvergleich).	Haut; Schilddrüse; Brustdrüse; Gehirn; Hoden; Darm; Thymus; Kehlkopf; Plazenta; Bindegewebe; Knochen; Milz; embryonales Bindegewebe; Bauch; Prostata	2002 (1460021)
	BMP-8B	BMP-8	Induziert Knorpel- und Knochenbildung; Vermutlich der osteoinduktive Faktor der für das Phänomen der epithelen Osteogenese verantwortlich ist; Calcium-Regeneration; Knochenhomöostase. (Ähnlichkeitsvergleich).	Haut; Hoden, Leber; Gehirn; Aszites; Darm; Pankreas; Muskeln; Uterus; Eierstöcke; Knochen; Knochenmark; Nabelschnur; Auge; embryonales Bindegewebe; Bauch; Prostata	1992 (12477932)

Subgruppe	BMP	Synonym	Funktion	Genexpression	Entdeckungsjahr/ PMID
CDMP	BMP-12	GDF-7 CDMP-3	Könnte eine aktive Rolle in dem motorischen Teil des Neocortexes von Primaten spielen. (Ähnlichkeitsvergleich)	Niere, Gehirn; Hoden	1994 (8145850)
	BMP-13	GDF-6 CDMP-2 MCOP-4	Notwendig für die normale Ausbildung von Knochen und Gelenken der Gliedmaßen, des Schädels und des Axialskelettes; Spielt Schlüsselrolle in der Herstellung von Grenzen zwischen den versch. Skelettelementen während der Entwicklung. (Ähnlichkeitsvergleich); Augenentwicklung	Embryonales Bindegewebe; Hoden; Gehirn; Knochen; Plazenta	1994 (8145850)
	BMP-14	GDF-5 CDMP-1 LAP-4 OS-5 SYNS-2	Könntein der Knorpel-und Knochenbildung Involviert sein; chondrogenes Signalisieren durch den hoch affinen BMPRII-Rezeptor.	Auge; embryonales Bindegewebe, Lunge; Herz; Knochen; Hypophyse; Gehirn; Bindegewebe; Prostata; Haut; Uterus	1994 (8145850)
Einzelne	BMP-9	GDF-2	Starker, zirkulierender Inhibitor der Angiogenese; Könnte an der Knochenbildung beteiligt sein; Signalisiert durch den TypI-Aktivin-Rezeptor ACVRL1 (Alk-1), aber nicht durch andere Alk-Rezeptoren.	Leber	2000 (10849432)
	BMP-10	/	Nötig zur Ausbildung der proliferativen Aktivität von embryonalen Herzmuskelzellen; Ist ein Ligand von Alk-1, Alk-3 und Alk-6, wodurch die Transkriptionsfaktoren SMAD1, SMAD5 und SMAD8 aktiviert werden; Inhibiert das Wachstum und die Migration von Endothelzellen.	Askites	1999 (10072785)
	BMP-11	GDF-11	Spielt eine Rolle in der Aus- und Nachbildung von mesodermalen und neuralem Gewebe und des Skelettmusters.	Auge; Gehirn; Haut; Milchdrüse; Mund; Darm; Lunge; Uterus; Fruchtwasser; Muskeln; Blut; Hoden; Leber; Pankreas; Mandel; Niere; Plazenta, Prostata; Bindegewebe; Nebenschilddrüse; Nerv; Knochen; embryonales Bindegewebe; Thymus; Nabelschnur; Herz; Nebenniere; Lymphknoten	1999 (10075854)
	BMP-15	GDF-9B ODG-2 POF-4	Oozyten-spezifische Wachstums/Differenzierungsfaktoren, die sowohl die Follikulogenese als auch das Wachstum von Granulosazellen stimulieren.		1998 (9849956)
	BMP-17	Lefty-1 LeftyB	Nötig für die Entwicklung der embryonalen Längsachse als Regulator von Lefty-2 und Nodal.	Embryonales Bindegewebe; Gelenk; Gehirn; Milchdrüsen; Lymphknoten; Milz; Pankreas; Hoden; Harnblase; Darm; Lunge; Leber; Haut	2000 (US Patent No.6027917)
	BMP-18	Lefty-2 LeftyA	Nötig für die Entstehung der Rechts-Links-Asymmetrie der Organ-Anordnung in Säugetieren.	embryonales Bindegewebe; Hoden; Gehirn	2000 (US Patent No.6027917)

Subgruppe	BMP	Synonym	Funktion	Genexpression	Entdeckungsjahr/ PMID
Einzelne	GDF-1	DORV DTGA-3	Spielt möglicherweise eine Rolle in der Zelldifferenzierung während der Embryonalentwicklung.		1990 (1704486)
	GDF-3	KFS-3 MCOP-7 MCOPCB-6	Negative und positive Kontrolle der Differenzierung embryonaler Stammzellen; Spielt eine Rolle in der Mesoderm und Entoderm-Bildung während der Prägastrulationsphasen.	Hoden; embryonales Bindegewebe; Niere; Nebenhoden	1993 (8429021)
	GDF-8	MSTN Myostatin	Negativer Regulator des Skelettmuskel-Wachstums.	Herz; Gehirn; Bindegewebe; Lunge; Augen; embryonales Bindegewebe; Muskeln, Plazenta	1997
	GDF-9	/	Wichtig für die Bildung von Ovarialfollikel; Stimuliert die Proliferation von Granulosazellen.	Hoden; Gehirn; Niere; Milchdrüsen; Leber; Nebenniere; Eierstöcke	1993 (8429021)
	GDF-15	MIC-1 NAG-1 PDF PLAB PTGFB	Eventuell involviert in die Follikelbildung; oocytenspezifischer Wachstums- und Differenzierungsfaktor der die Follikulogenese und den Wachstum von Granulosazellen stimuliert.	Plazenta; Haut; Lunge; Darm; Niere; Prostata; Leber; Pankreas; Muskeln; Bauch; Bindegewebe; Uterus; Luftröhre, Auge; Gehirn; Askites; embryonales Bindegewebe, Fruchtwasser; Blut; Hoden; Milchdrüsen; Eierstöcke; Lymphknoten; Lymphe, Gefäße; Nabelschnur; Herz; Gebärmutterhals; Milz; Harnblase; Nebenschilddrüse	1997 (9139826)

Der Forschungsstand für BMP-2 ist viel umfangreicher als der Forschungsstand für BMP-4. Daher wird der Fokus des theoretischen Teils dieser Arbeit auf BMP-4 gelegt.

3.1.3 BMP-4

BMP-4 ist ein sekretorisches und hydrophobes Protein. Es ist mit BMP-2 sehr nah verwandt, seine Sequenzidentität liegt bei 80 %, die Ähnlichkeit bei 92 %. Es ist zu erwarten, dass sich das Verhalten der beiden Proteine bezüglich Expression, Prozessierung und Aufreinigung ähnelt.

Das Gen für BMP-4 liegt auf Chromosom 14 (14q22-q23) mit einer Länge von 1957 Basenpaaren (bp) [36]. *In vivo* erfolgt die Synthese als Prä-Pro-Protein [37]. Dieses setzt sich zusammen aus einem hydrophoben Signalpeptid, das für die Sekretion verantwortlich ist, einer Pro-Region, welche die Proteinfaltung beeinflusst und aus dem reifen Peptid [38, 39]. Das Prä-Pro-BMP-4 wird von Furin, einer Pro-Protein-Konvertase, gespalten. Dieser proteolytischen Trennung dient die Arg-X-X-Arg-Sequenz vor dem Maturpeptid als Erkennungssignal [40]. Eine Anlagerung der Prodomänen nach der Spaltung kann die osteoinduktiven Effekte des BMP-4 beeinflussen. Hierdurch sind weitere Anwendungen im Bereich des Tissue Engineering denkbar [38].

Zwei verschiedene Varianten von BMP-4 wurden bisher im Menschen gefunden. Die bekanntere Variante findet sich u. a. im Placentagewebe, die andere wurde in einem Osteosarkom (einem Knochentumor) gefunden. Das mature Monomer besteht aus 116 Aminosäuren und weist im unglykosilierten Zustand eine molare Masse von 13129 Da auf. Der theoretische isoelektrische Punkt liegt bei pH 7,60. Die Sequenz von BMP-4 beinhaltet auch das TGF- β -typische, hochkonservierte Cystinknotenmotiv. Das gesamte Motiv umfasst insgesamt 7 Cysteine. Davon bilden sechs Cysteine den Cystinknoten, wobei drei intramolekulare Disulfidbrücken gebildet werden. Das siebte Cystein bildet mit dem Cystein eines zweiten Monomers eine intermolekulare Bindung [41]. Erst die Dimerisierung führt zu einem bioaktiven Protein [42].

Die Bioaktivität kann dabei von einem BMP-4 Homodimer ausgehen. Jedoch werden *in vivo* bevorzugt Heterodimere mit BMP-7 gebildet. Die Osteoinduktivität dieses Heterodimers ist deutlich höher als selbige des BMP-4 Homodimers [37, 43-45]. Auch sind Heterodimere mit BMP-8 bekannt. BMP-4/-7 hat ferner einen induktiven Einfluss auf das Mesoderm [43], während BMP-4/-8 die Ausbildung von Urkeimzellen bewirkt [40].

Die namensgebende Bioaktivität von BMP-4 wurde erstmals beschrieben als die Fähigkeit, die Bildung von Knochen- und Knorpelgewebe zu induzieren (Osteoinduktivität) [23]. Gleichwohl ist BMP-4 an zahlreichen anderen Prozessen beteiligt. Hierzu zählen unter anderem die embryonale Entwicklung [46], Entwicklung von Nervengewebe [47] oder auch die Ausbildung von Fingern [48].

Wirkspektrum von BMP-4

BMP-4 ist an vielen, verschiedenen Vorgängen in der embryonalen Entwicklung beteiligt und stellt daher ein elementares Protein für die gesunde Embryonalentwicklung dar. Diese Relevanz soll an BMP-4 als Steuerungsprotein der Ausbildung der Bauch-Rücken-Achse verdeutlicht werden:

Im Zuge der Gastrulation (Keimblattbildung) bilden sich die drei Keimblätter Ektoderm, Endoderm und Mesoderm heraus, aus denen sich später die hochdifferenzierten Organe entwickeln. Die Ausbildung dieser Zelltypen wird u. a. von BMP-4 und seinen Antagonisten Chordin und Noggin [49] bewirkt. Der Gastrulation vorgelagert ist die Blastulation (Blasenkeimung), also die Umwandlung von einem Zellhaufen in einen Zwei-Schichten-Zustand. BMP-4 befindet sich im gesamten Blastomer, sein Antagonist Chordin hingegen nur an der dorsalen Seite. Daraus resultiert ein Aktivitätsgradient. Chordin bindet BMP-4, so dass die Komplexbildung mit den BMP-4-Rezeptoren unmöglich wird [50]. Entlang dieses Gradienten bildet sich die dorso-ventrale (Rücken-Bauch-) Achse. Entlang dieser Achse wiederum werden in der Folge die drei Keimblätter gebildet [51].

Transgene Mäuse mit inaktiviertem BMP-4 sterben während der Gastrulation [52], für Menschen wäre dasselbe zu erwarten. Im weiteren Verlauf der Entwicklung bildet sich das Neuralrohr, dessen Ausbildung durch ein Wechselspiel zwischen BMP-4 und BMP-7 gesteuert wird [53].

Auch an der Bildung von Zähnen [54] und der Entwicklung des Auges [55, 56] ist BMP-4 beteiligt. In letzterer sorgt ein Gradient an BMP-4 für die Bildung der Linse. Während der Entwicklung des Auges ist die Bildung des Augenbläschens (*Vesicula optica*) ein wichtiger Schritt. Aus ihm geht später u. a. die Netzhaut hervor. Die Konzentration an BMP-4 im Augenbläschen ist hoch, während sie im umgebenden Mesenchym und Ektoderm gering ist. Dieser Gradient führt zur Ausbildung der Linse. Durch Experimente, die den Einfluss von BMP-4 einschränken, konnte gezeigt werden, dass BMP-4 für die Linsenbildung notwendig ist.

Im adulten Organismus liegt der Wirkungsschwerpunkt von BMP-4 auf der endochondralen Ossifikation (Verknöcherung) als Teil des Knochenmetabolismus. Gleichwohl hat es auch andere Funktionen, z. B. in Niere [40] und Hirn [57].

Die Bildung von Knochengewebe wird als Ossifikation bezeichnet, die Bildung eines individuellen Knochens nennt man Osteogenese. Die Ossifikation kann in drei Gruppen unterteilt werden: die Bildung aus Knorpelgewebe (chondrale Ossifikation), aus Bindegewebe (desmale Ossifikation) und die Anlagerung an bestehendes Knochengewebe (appositionelle Ossifikation).

Die chondrale Ossifikation wiederum lässt sich unterteilen in endo- und perichondral.

Die endochondrale Ossifikation beschreibt die Verknöcherung von innen. Hierbei wachsen Blutgefäße in das vorhandene Knorpelgewebe ein und Mesenchymzellen lagern sich an. Dadurch kommt es insgesamt zu einem Längenwachstum und der Ausbildung von Knochenmark. Bei der perichondralen Ossifikation handelt es sich um eine Verknöcherung von außen. Durch Absonderung von Osteoblasten von der Knorpelhaut und Wiederanlagerung wird eine Knochenmanschette gebildet. Die perichondrale Ossifikation dient also dem Dickenwachstum des Knochens.

BMP-4 ist insbesondere in die endochondrale Ossifikation involviert, indem es die Rekrutierung, Proliferation und Differenzierung der Vorläuferzellen steuert und so das Längenwachstum des Knochens befördert [58].

Auch reguliert BMP-4 die Verknüpfung von Nervenzellen im adulten Hirn [57]. BMP-4 korrigiert hier falsch verbundene Nervenzellen. Diese Eigenschaft macht, nach Meinung der Autoren, eine Anwendung auf neuronale Erkrankungen wie Epilepsie oder Autismus denkbar.

Durch Fehlfunktionen im Zusammenhang mit BMP-4 kann es zur Ausbildung von Krankheiten kommen. Am Genlocus von BMP-4 konnte kein Krankheitsmarker gefunden werden und die einzige bekannte, natürlich vorkommende BMP-Mutation ist die *Kurzohr-Maus*, in der BMP-5 inaktiviert ist [59]. Jedoch führt eine Überexpression von BMP-4 zur sehr seltenen, dominant vererbaren Krankheit *Fibrodysplasia Ossificans Progressiva*, *FOP*. Hierbei handelt es sich um eine krankhafte, fortschreitende Verknöcherung des Binde- und Stützgewebes des menschlichen Körpers, da bei der Wundheilung Knochen- statt normalem Narbengewebe gebildet wird. Ferner kann eine Überexpression von BMP-4 in ein Adenokarzinom der Speiseröhre münden [60].

Demgegenüber konnte gezeigt werden, dass BMP-4 in Darmkrebszellen den irreversiblen Verlust der Teilungsfähigkeit hervorrufen kann [61], was ein Ansatz für die Krebsforschung sein könnte. Des Weiteren konnte im Modellversuch gezeigt werden, dass BMP-4 das Wachstum von menschlichen Hirntumoren verlangsamen kann [62]. Darüber hinaus ließen sich die osteoinduktiven Effekte von BMP-4 im Bereich des Tissue Engineering durch Beschichtung von Trans- oder Implantaten nutzen [63].

Die Vielzahl an Wirkorten und -arten von BMP-4 (s. Tabelle 1) macht deutlich, dass die Erforschung dieses Proteins in vielen Bereichen der Medizin, weit über skelettale Erkrankungen hinaus, ein großes Potential birgt.

Die rekombinante Herstellung von BMP-4 gestaltet sich deutlich schwieriger als bei anderen BMPs, weswegen über die Funktionsweise dieses Proteins vergleichsweise wenig bekannt ist.

Rekombinante Herstellung von BMP-4

Expressionssysteme unterscheiden sich bezüglich ihrer Eignung zur rekombinanten Herstellung von Proteinen. BMP-4 ist ein eukaryotisches Protein. Für seine Bioaktivität ist eine Dimerstruktur erforderlich, die originären posttranslationalen Glykosilierungen hingegen nicht [42].

Die Eigenschaften von BMP-4 lassen prinzipiell mehrere Expressionssysteme zu. Je nach Wahl des Systems müssen verschiedene Strategien verfolgt werden. Im Groben lassen sich drei Gruppen voneinander abgrenzen. Erstens ist die Produktion in Säugerzellen möglich, zweitens in prokaryotischen Systemen und drittens lassen sich weitere Systeme wie Pilze oder Insektenzellen subsumieren. Im Folgenden soll näher auf den aktuellen Stand der Systeme bzgl. BMP-4 eingegangen werden.

Säugerzellen

Die Produktion in Säugerzellen ermöglicht eine humanähnliche Proteinexpression. Somit können auch komplexere, unmittelbar bioaktive Proteine hergestellt werden. Dies umfasst auch posttranslationale Modifikationen, insbesondere Glykosilierungen.

Im konkreten Fall von BMPs sind diese für die Bioaktivität jedoch nicht zwingend notwendig. Hingegen erforderlich ist die disulfidverbrückte Dimerstruktur im Fall von BMP-4; diese wird bei Expression in Säugerzellen *in vivo* erzeugt. Die meisten Systeme sekretieren das Zielprotein ins Medium.

Nachteile sind die Proteinausbeute und die Wachstumsgeschwindigkeit. Die rekombinante Produktion von BMP-4 in mesenchymalen Stammzellen (C3H10T1/2) aus Mäusen erbrachte 100 ng pro mL und Tag [64]. Hinzukommt, dass die Produktionsbedingungen komplexer und aufwändiger – und somit teuer – sind, als mit anderen Systemen.

Die Expression von BMP-4 mittels verschiedenen Zelllinien wurde beschrieben. Es konnte die Darstellung von BMP-4 mit Hilfe von CHO-Zellen gezeigt werden [65]. Ferner wurde die Expression in murinen mesenchymalen Stammzellen [64] und einer murinen Myelom-Zelllinie (NSO) [15, 66] gezeigt. Auch embryonale Nieren-Zellen (HEK-293) werden zur Herstellung verwendet [15]. Kommerziell verfügbares BMP-4 wird überwiegend in Säugerzellen, z. B. HEK-293 [67], hergestellt. Daneben gibt es auch kommerzielles, bioaktives BMP-4-Dimer, das nicht mit Säugerzellen hergestellt wurde; z. B. aus *E. coli* [68].

Prokaryoten

Beim meistgenutzten prokaryotischen Expressionssystem handelt es sich um eine Variante des Darmbakteriums *Escherichia coli* (*E. coli*). Die Vorteile sind u. a. die einfachen und kostengünstigen Kultivierungsbedingungen und eine hohe Proteinausbeute. Nachteilig ist das Fehlen des eukaryotischen Apparats, so dass

komplexe Proteine nicht in ihrer ursprünglichen Form, also z.B. glykosiliert und disulfidverbrückt, generiert werden können.

Eine häufige Strategie der Expression in *E. coli* liegt in der Herstellung von *Inclusion Bodies* (IB). Bei Überexpression des Zielproteins wird dieses in Form von unlöslichen Einschlusskörperchen in der Zelle akkumuliert. Anschließend muss es wieder in Lösung gebracht und häufig weiterbehandelt werden, um bioaktiv zu werden. Daneben existieren auch Varianten zur Sekretion oder Produktion in löslicher Form des Proteins.

Für die Expression von BMP-4 in *E. coli* stellt die Erzeugung des bioaktiven Dimers eine zentrale Hürde dar. Das Cytoplasma des gewöhnlichen *E. coli* wird als reduzierend angesehen [69, 70]. Die Ausbildung der Disulfidbrücken für die beiden Cysteinknoten und die intermolekulare Disulfidbrücke für das Dimer werden daher in *E. coli* nicht geleistet.

Es existieren wenige Veröffentlichungen zur Produktion von BMP-4 in *E. coli*. Ihnen gemein ist die Produktion als unlösliche IB.

Einige Veröffentlichungen beziehen sich auf die Herstellung von BMP-4 unmittelbar aus IB. Klösch *et al.* beschreiben die Herstellung von BMP-4 (rrBMP-4; rekombinantes, aus Ratten stammendes BMP-4) durch Klonierung aus Ratten-Osteoblasten [71]. Dabei werden die IB in Harnstoff solubilisiert und anschließend Mono-, Di- und Polymer direkt per SEC (Größenausschlusschromatographie) getrennt. Bessa *et al.* [72] benutzen eine sehr ähnliche Methode. Jedoch wurden dort die Proteine mit einem His-Tag versehen und die Trennung erfolgte mit His-Tag-Affinitätschromatographie. Hierbei wird eine Ausbeute von 53,6 mg an Mono-, Di- und Polymer-Gemisch pro Liter Kultur angegeben. Allerdings wird in beiden Veröffentlichungen der Nachweis des bioaktiven Dimers mit dem sensitiven *Western-Blot* geführt. Die Ergebnisse dieser beiden Veröffentlichungen laufen der „generellen Meinung [zuwider], dass Proteine aus dem Cytosol von *E. coli* überwiegend reduziert vorliegen“ [71]. Dennoch wäre für dieses Experiment der Einfluss von Luftoxidation denkbar.

Andere Veröffentlichungen beschreiben die Herstellung von rekombinantem BMP-4 mittels Produktion als IB in *E. coli* und anschließender *Renaturierung*. Renaturierung bedeutet, dass das zuvor solubilisierte Monomer in einem speziellen Puffer in das bioaktive Dimer überführt wird. Hierbei bildet sich aus den ungefalteten Monomeren die bevorzugte, native Tertiärstruktur und die Disulfidbrücken bilden sich aus.

Kübler *et al.* [73] zeigten, dass die Dimerisierung mit einem Renaturierungspuffer, der u. a. CHAPS (ein Gallensäurederivat) und ein Gemisch aus reduziertem und oxidiertem Glutathion (einem Pseudotripeptid) enthält, möglich ist. Die Aufreinigung des Dimers erfolgte mit Ionenaustauschchromatographie. Diese Arbeit basiert wiederum auf einem Patentantrag von Cerletti *et al.* [74]. In diesem Patent wird eine

Methode zur Renaturierung von TGF- β -2 aufgezeigt. Es wird dort vermutet, dass diese Methode auch für ähnliche Proteine anwendbar sei.

Das Patent von Wolfman *et al.* [75] greift die Methode von Cerletti auf und macht mehrere interessante Beobachtungen. Zum einen stellen sie fest, dass die direkte Übertragung von Cerlettis Methode bei BMP-4 (und BMP-5 bis -7) aus „unbekannten Gründen“ zu „ungewünscht niedrigen Ausbeuten“ an korrekt gefaltetem, biologisch aktivem Protein führt.

Zum anderen stellen sie fest, dass einzelne Aminosäureaustausche im BMP-4 eine deutliche Steigerung der Dimerisierungsausbeuten zur Folge haben. Für das dem BMP-4 sehr nah verwandte BMP-2 konnte gezeigt werden, dass die Methode nach Cerletti mit „akzeptablen Mengen“ funktioniert. BMP-4 ist zu BMP-2 hochgradig homolog. Beginnend vom ersten Cystein (Aminosäure (AS) 14 in BMP-2 bzw. 16 in BMP-4) gibt es nur acht „korrelierende“ Aminosäurereste, die sich unterscheiden. Es sind die Reste 15, 39, 46, 73, 95, 96 und 105 des BMP-2 (s. Anhang 6.2).

Nun wurden die ersten 4 (aminoterminal) dieser korrelierenden AS aus BMP-4 gegen die entsprechenden aus BMP-2 ausgetauscht; das Molekül wird mit „BMP-2/BMP-4“ bezeichnet. Analog wurden für ein anderes Molekül die 4 hinteren (carboxyterminal) korrelierenden AS im BMP-4 gegen jene aus BMP-2 ausgetauscht. Dieses Molekül wird als „BMP-4/BMP-2“ bezeichnet.

Insgesamt werden folgende Ergebnisse für die Cerletti-Methode in Bezug auf BMP-4 festgehalten: Wildtyp BMP-4 wird „nicht gut“ renaturiert. Während BMP-4/BMP-2 mit guter Ausbeute renaturiert werden kann, wird bei BMP-2/BMP-4 keine Verbesserung gegenüber dem Wildtyp festgestellt. Offensichtlich hat *ergo* die „hintere Hälfte“ (bzw. die entsprechenden 4 AS) des BMP-4 einen Einfluss auf das (im Vergleich zu BMP-2) schlechtere Renaturierungsverhalten. Diese Beobachtung wird durch ein drittes Modifikat von BMP-4 untermauert. In diesem wird nur die AS Glutamat gegen die korrelierende AS Aspartat (Asp105) aus BMP-2 ausgetauscht. Dieser Austausch einer einzelnen und auch noch sehr ähnlichen Aminosäure führt zu einer „Renaturierung in guter Menge“ relativ zum Wildtyp-BMP-4.

Wolfman *et al.* zeigen in ihrem Patent weitere Methoden zur Renaturierung von BMPs auf. Dabei werden das Taurinderivat CHES bzw. in ein einem anderen Ansatz die Aminosäure Arginin eingesetzt.

Vicik *et al.* [76] zeigen in einem Patent, dass sich BMP-2 auch renaturieren lässt, wenn das Gallensäurederivat CHAPS (Cerletti) gegen das Taurinderivat CHES ausgetauscht wird. Auch sie hatten festgestellt, dass Cerlettis Methode für zahlreiche BMPs nur zur geringen Ausbeuten führt.

Daneben wurde auch über ein Fusionsproteinprotein aus BMP-4 und BMP-7 berichtet. Dieses zeigte gesteigerte Osteoinduktivität gegenüber dem BMP-4-Homodimer [77]. Für das zu BMP-4 strukturähnliche BMP-2 konnte die Herstellung in löslicher Form

gezeigt werden [78]. Hierbei wurde das BMP-2 in einem speziellen *E. coli*-Stamm (Rosetta-gami B(DE3)) hergestellt, der die Ausbildung von Disulfidbrücken ermöglicht. Ferner wurde das Protein Thioredoxin coexprimiert, was die Disulfidbrückenbildung ebenso unterstützt. Die Aufreinigung des BMP-2 erfolgt hierbei mit einer Heparin-Affinitätschromatographie.

Alternative Expressionssysteme

Die rekombinante Expression von BMP-4 wurde auch für die Hefe *Pichia pastoris* publiziert. Allerdings konnte dort die wunschgemäße Expression eines Dimers nicht demonstriert werden. Zur Aufreinigung des Monomers wurden Kationenaustausch-Sephrose und Heparin eingesetzt [79]. Des Weiteren konnte die Produktion von BMP-4 in infizierten Insektenzellen und dessen Bioaktivität auf eine Maus-Osteoblasten-Zelllinie gezeigt werden. Hier wurde anschließend ein Kationentauscher verwendet, um ein BMP-4/BMP-7-Heterodimer aufzureinigen [80]. Darüber hinaus wurde ein BMP-Rezeptor in einem Seidenwurm exprimiert und dessen Interaktion mit BMP-4 publiziert [81].

3.1.4 BMP-2

BMP-2 ist ein sekretorisches und hydrophobes Protein. Das Gen für BMP-2 liegt auf Chromosom 20 (20p12); es wird ebenfalls als Prä-Pro-Protein synthetisiert. Das reife Monomer besteht aus 114 Aminosäuren und besitzt *in vivo* eine Molekülmasse von 32 kDa. Im unglykosilierten Zustand beträgt die molare Masse des Monomers 12905 Da. Der theoretische isoelektrische Punkt liegt bei pH 8,21. Für die biologische Aktivität ist die Dimerstruktur erforderlich. Das Cystinknotenmotiv wird aus 6 Cysteinen gebildet. Die Cysteine 43, 47, 111 und 113 formen den Disulfidring, die von der Disulfidbrücke zwischen Cystein 14 und 79 durchstoßen wird. Über ein siebtes Cystein (Cys 78) wird die intermolekulare Disulfidbrücke gebildet.

Wird BMP-2 in Tieren exprimiert kommt es zu einer Glykosylierung, nach Meinung der Autoren [82], wahrscheinlich an der Aminosäure Asn56. Diese Aminosäure ist in allen BMPs konserviert. Es zeigte sich allerdings, dass in *E. coli* exprimiertes BMP-2 auch bioaktiv ist. Somit kann diese Modifikation für die Funktion nicht essentiell sein [82].

BMP-2 ist wie alle BMPs ein pleiotropes Protein. Es wird in vielerlei Geweben gefunden und übernimmt zahlreiche Aufgaben. Insbesondere ist es für Knochen- und Knorpel(neu-)bildung mitverantwortlich; in diesem Bereich hat es neben BMP-7 auch mit die höchste osteoinduktive Aktivität. Ein Heterodimer aus BMP-2 und BMP-7 hatte sogar eine noch höhere Bioaktivität [83].

Die rekombinante Herstellung von BMP-2 in verschiedenen Expressionssystemen wurde beschrieben. Für Säugerzell-Expressionen [84, 85] waren dabei niedrige

Ausbeuten und Probleme mit post-translationalen Modifikationen festzustellen. Ähnliche Probleme ergaben sich bei der Herstellung mit Virus-infizierten Insektenzellen [86]. Alternativ dazu konnte in Patenten und Veröffentlichungen gezeigt werden, dass eine Herstellung von bioaktivem BMP-2 durch Renaturierung aus Inclusion Bodies möglich ist [74, 76, 87].

Medizinische Anwendung

BMP-2 ist neben BMP-7 das einzige BMP, für welches eine Arzneimittelzulassung der FDA existiert [88]. Der Internationale Freiname (INN) von BMP-2 ist „Diboterminalfa“. Beim InFUSE®-System (Medtronic Sofamor Denek, Inc.) handelt es sich um rhBMP-2 auf einem absorbierbaren Kollagen-Schwamm als Trägermaterial. BMP-7 wurde der INN „Eptoterminalfa“ gegeben. OP-1® (Stryker Biotech) besteht aus rhBMP-7 und Rinderkollagen, das mit Kochsalzlösung zu einer Paste verarbeitet und appliziert wird.

Zur Anwendung kommen diese beiden Medikamente als Alternative zur autologen Transplantation (meist aus dem Beckenkamm). BMP-2 beispielsweise bei Wirbelkörperverblockung der Lendenwirbelsäule (so genannte Spinalfusion; hierfür zugelassen) oder heilerschwerten Frakturen (Nonunions); gleichwohl sind 85% der gesamten Einsätze off-label Anwendungen [89]. Auch in der Oralchirurgie finden diese Medikamente Anwendung [90].

4 Experimenteller Teil

4.1 Konzeptvorstellung

Knochenmorphogenetische Proteine (*Bone Morphogenetic Proteins, BMPs*) stellen ein interessantes Objekt für Forschung und medizinische Anwendung dar. Diese wurden ursprünglich unmittelbar aus Knochen isoliert, allerdings mit geringer Ausbeute (1-3 µg/kg) [1]. Die naheliegende Herstellung rekombinanter, humaner BMPs (*recombinant human BMP*) wurde auf verschiedene Weise demonstriert. So konnten verschiedene BMPs z.B. mit Hilfe von Säugerzell-Kulturen dargestellt werden [84, 85]. Gleichwohl stellen auch hier die geringen Ausbeuten (ng/mL-Bereich) ein Problem dar.

Demgegenüber zeigen mehrere Patente und -anträge [74-76] die Möglichkeit auf, biologisch aktive rhBMPs mit Hilfe des Darmbakteriums *Escherichia coli* zu gewinnen. Dazu müssen die BMPs zunächst in Form von unlöslichen Einschlusskörperchen (*Inclusion Bodies, IB*) im Bakterium produziert werden und anschließend *in vitro* in ihre natürliche, bioaktive Form überführt werden (*Refolding*), da *E. coli* insbesondere der biologische Apparat fehlt, um den notwendigen Cystin-Knoten auszubilden (s. Abschnitt 3.1).

In der vorliegenden Arbeit sollen die beiden Cytokine rhBMP-2 und rhBMP-4 (im Weiteren BMP-2 bzw. -4) rekombinant aus *E. coli* hergestellt und die Herstellungsverfahren miteinander verglichen werden. Für BMP-2 konnte der obige Ansatz bereits erfolgreich demonstriert werden [76, 87]. Dieser umfasste die Schritte Produktion als IB, Solubilisierung der IB, Refolding (synonym *Renaturierung*) und Aufreinigung des Proteins.

BMP-2 und BMP-4 sind einander sehr ähnlich: Die Kettenlänge des murenen Monomers beträgt 114 bzw. 116 Aminosäuren (AS). Beide Monomere weisen je 7 Cysteine auf, die im Homodimer den Cystin-Knoten ausbilden. Die Sequenzidentität der Monomere beträgt 80,2 % (93/116), weitere 12,9 % (15/116) sind ähnlich. Die restlichen AS (08/116) sind verschieden [expasy.ch/ ClustalW/ -> Uniprot.org]. Ferner verfügen beide über eine postulierte Heparin-Bindestelle [91]. Aufgrund dieser Ähnlichkeit scheint die Übertragung des Ansatzes von BMP-2 auf das verwandte BMP-4 vielversprechend.

Die Bereitstellung von bioaktivem, dimerem BMP-2 und BMP-4 (im Folgenden BMP-X) macht mehrere Arbeitsschritte notwendig; diese sind in Abbildung 4 illustriert. Die dabei aufgetretenen Beobachtungen sowie die etwaig entwickelten Lösungsansätze werden vorgestellt und diskutiert. Eine Beschreibung der Versuchsdurchführungen ist im Anhang (6.4) zu finden.

Im Block Produktion bzw. im Upstream muss zunächst ein geeigneter Expressionsstamm konstruiert werden; die Konstruktion wurde von einem Projektpartner übernommen. Mit Hilfe dessen kann dann, über Zwischenstufen, in einem 10-Liter-Bioreaktor genügend Ausgangsmaterial für die weiterführenden Experimente erzeugt werden. Die Kultivierung der Bakterien erfolgt dabei in einem Auto-Induktions-Medium (AIM oder DAB-Medium), das speziell für die hier verwendeten Vektoren mit *lac*-Operon (pET-Vektoren (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt)) entwickelt wurde.

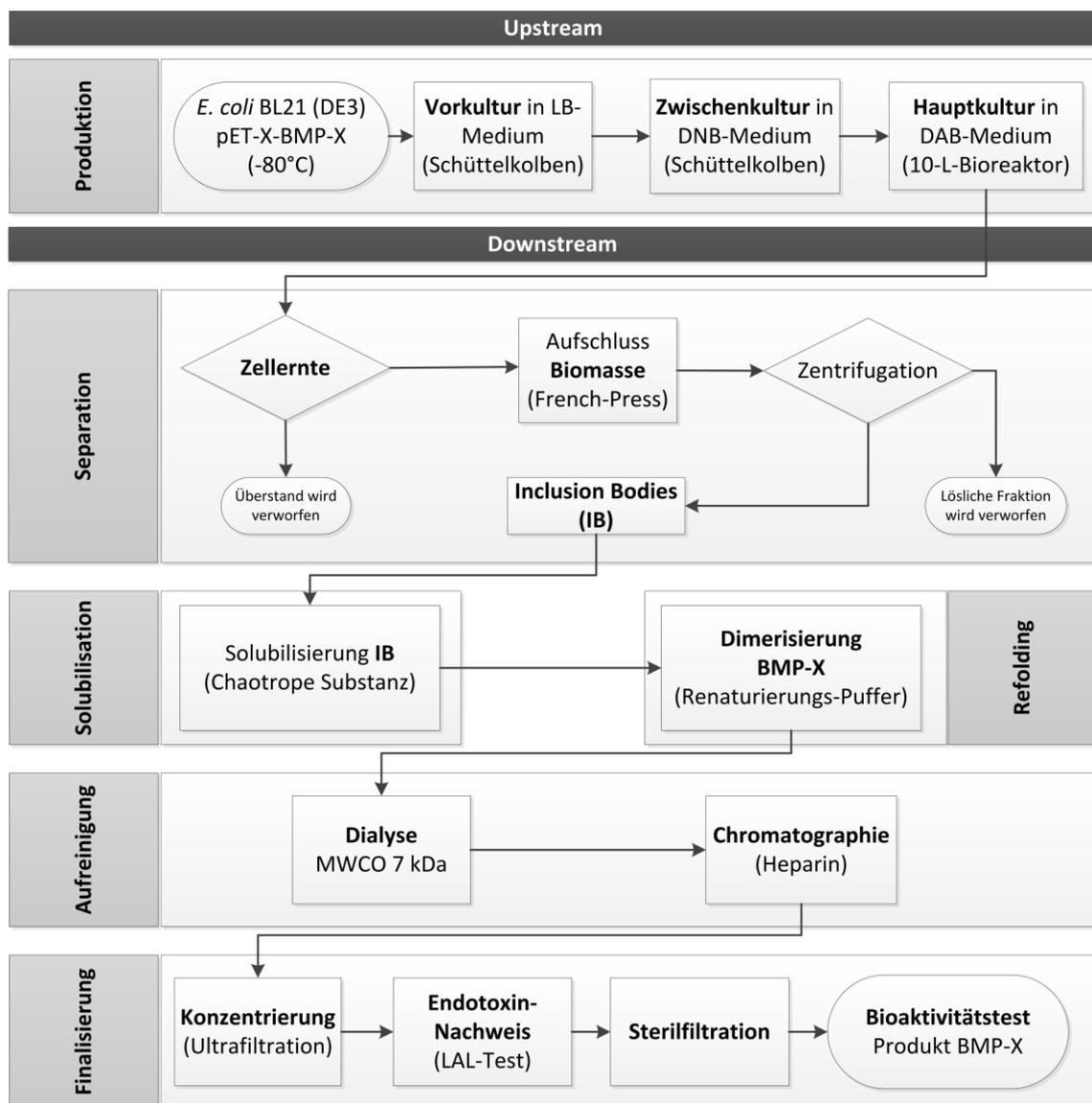


Abbildung 4: Flussdiagramm des Produktionsprozesses von BMP-2 und BMP-4 (= BMP-X)

Die so erhaltene Biomasse muss gerntet werden, dabei wird der Kulturüberstand verworfen. Hieran schließt sich der Aufschluss der Zellen an. Nach erneuter Zentrifugation und nachgelagerten Waschschrinen (in Abbildung 4 nicht gezeigt) werden die gewünschten, gereinigten *Inclusion Bodies* erhalten.

Im nächsten Schritt müssen die IB, die aus der unlöslichen Proteinfraction gewonnen wurden, wieder in Lösung gebracht werden. Für diese *Solubilisierung* kommen chaotrope Substanzen zum Einsatz.

Daran knüpft das *Refolding* an. Das Refolding hat das Ziel, die vorliegenden, in Lösung gebrachten Monomere des BMP-X *in vitro* in das entsprechende, bioaktive Homodimer zu überführen. Zentral ist dabei die Ausbildung einer intermolekularen Disulfidbrücke. Diese ist, neben den jeweils drei intramolekularen Disulfidbrücken nötig, welche den Cystinknoten auszubilden. Dieser Vorgang wird in der vorliegenden Arbeit auch als Dimerisierung bezeichnet; im Allgemeinen kann die Dimerisierung aber auch ohne Disulfidbrückenbildung erfolgen. Für die Homodimerbildung werden die gelösten Monomere in einem Refoldingpuffer (auch Renaturierungspuffer) verdünnt, der u. a. das oxidative Milieu bereitstellt, das für die Dimerisierung nötig ist.

Nachdem das Homodimer im Renaturierungspuffer gebildet wurde, schließt sich die *Aufreinigung* an. Dabei soll das Dimer von Monomer und anderen Proteinen getrennt werden. Hierfür konnte für BMP-2 der erfolgreiche Einsatz einer Heparinsäule zur Affinitätschromatographie demonstriert werden [87]. Aufgrund der postulierten Heparin-Bindestelle sollte diese Methode auch auf BMP-4 übertragbar sein.

Der abschließende Block *Finalisierung* hat die Testung der Bioaktivität des Proteins zum Ziel. Dafür wird das Cytokin mit mehreren Zwischenschritten wie Endotoxin-Test und Sterilfiltration vorbereitet.

4.2 Expressionssystem

Die genetische Information für das BMP-X wird mit Hilfe von Plasmiden in *E. coli* eingebracht. Diese Vektoren dienen zur Übertragung fremder Gene zwecks bakterieller Proteinexpression. Vektoren mit pET-System (*Plasmid Expression by T7-RNA-Polymerase*) werden hierfür häufig verwendet. Das Zielgen steht bei Verwendung des pET-Vektors unter Kontrolle des starken T7-Promotors, wodurch die einfache und schnelle Produktion des Proteins möglich wird [92]. Der ursprünglich aus dem Bakteriophagen T7 stammende Promotor besitzt eine hohe Transkriptionseffizienz, benötigt aber die phageneigene T7-RNA-Polymerase. Diese ist ins Genom des Wirtsstamms *E. coli* BL21(DE3) integriert und steht unter der Kontrolle des *lac*-Operators *lacO* [93].

Besondere Elemente eines pET-Vektors sind der T7 Promotor, der *lac*-Operator, eine Multiklonierungsstelle (MCS, *Multiple Cloning Site*), das *lacI*-Gen und ein Selektionsmarker (Antibiotikaresistenz-Gen). In Abwesenheit eines Induktors wie Lactose oder seinem Strukturanalogon Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) wird der *lac*-Operator reprimiert. Durch Zugabe jenes Induktors wird der Repressor vom *lac*-Operator abgelöst und somit die Expression induziert.

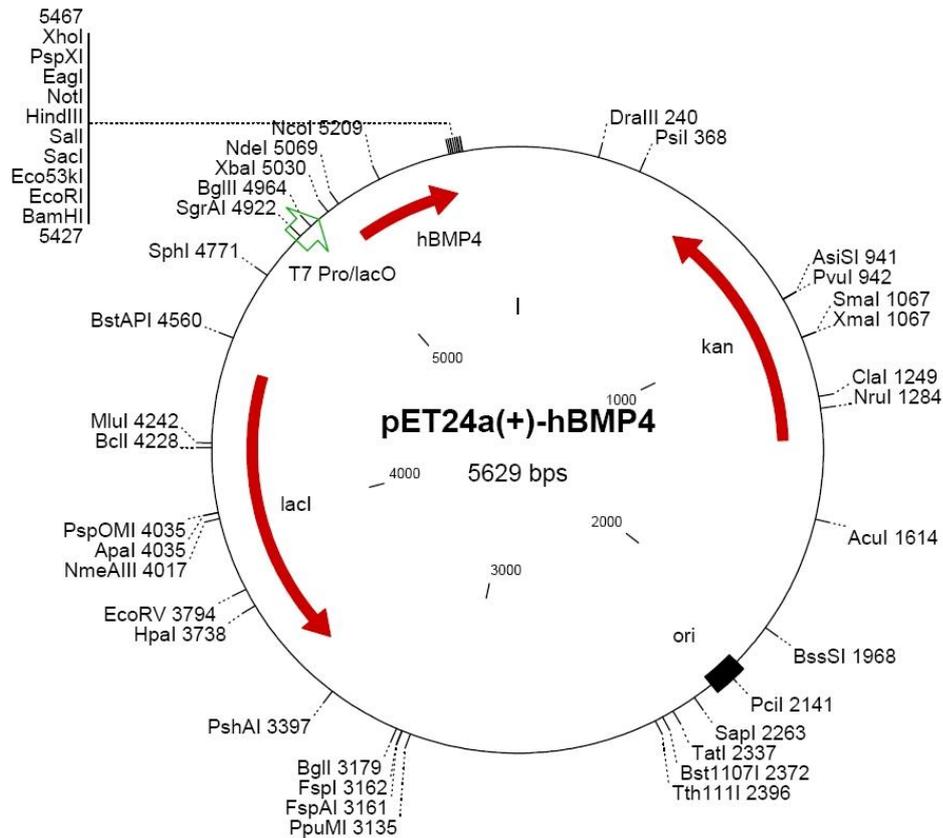


Abbildung 5: Exemplarische Vektorkarte eines verwendeten pET-Vektors (pET24a(+)-hBMP4).

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Vektortypen verwendet: pET-9 und pET-24. Die beiden Zielgene für BMP-2 und BMP-4 wurden jeweils in beide Vektoren eingebracht, so dass insgesamt 4 Konstrukte entstanden.

Die besagten wichtigen Elemente eines Vektors sind in Abbildung 5 konkret illustriert. Gezeigt ist ein pET-24-Vektor. Das Zielgen wurde in die MCS inkloniert (hBMP4). Dadurch steht es unter Kontrolle des T7-Promotors (T7 Pro/lacO). Ferner ist die Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin (kan) vorhanden. Hinzu kommt das *lacI*-Gen (*lacI*), das für den *LacI*-Repressor kodiert. Durch den *Lac*-Operator, der dem T7-Promotor nachgelagert ist, wird, in Kombination mit dem *LacI*-Repressor, eine basale Transkription minimiert (sog. Stringenz).

Der alternativ verwendete pET-9-Vektor unterscheidet sich vom pET-24-Vektor lediglich darin, dass dem T7-Promotor kein *Lac*-Operator nachgelagert ist. Das heißt, dort steht das Zielgen unmittelbar unter Kontrolle des T7-Promotors (T7 Pro). Durch den fehlenden *Lac*-Operator fehlt auch dessen *LacI*-Repressor (vgl. Abbildung 37). Der pET24-hBMP-X-Vektor wurde vorsorglich konstruiert für den Fall, dass das Produkt hBMP-X vor der Induktionsphase toxisch auf den Produktionsorganismus *E. coli* wirkt. Sollte es zu keinen Problemen kommen, wäre die Verwendung des pET-9-Stamms aufgrund dessen geringerer Stringenz für die anvisierte Kultivierung in

Autoinduktionsmedium vorzuziehen. Die weiteren Vektorkarten befinden sich im Anhang (6.5.4).

Vektor	Zielprotein	Details
pET9a-hBMP2	BMP-2	T7 Pro
pET24a(+)-hBMP2	BMP-2	T7 Pro/lacO
pET9a-hBMP4	BMP-4	T7 Pro
pET24a(+)-hBMP4	BMP-4	T7 Pro/lacO

4.3 Produktion von BMP-2 und BMP-4 als *IB* in *E. coli*

4.3.1 LB-Medium

BMP-2:

Zunächst galt es, zu überprüfen, ob die Transformation des Plasmids in den BL21 (DE3)-Stamm erfolgreich durchgeführt werden konnte. Hierzu wurde getestet, ob durch Induktion *via* Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) die Proteinexpression des Zielproteins BMP-2 bzw. BMP-4 ausgelöst wird.

Der plasmidtragende Stamm wurde im Schüttelkolben bei 37 °C in LB-Medium kultiviert. Bei Erreichen einer optischen Dichte (OD) von 0,6 erfolgte die Induktion der Genexpression durch Zugabe von IPTG.

Nach der Induktion erfolgte für die nächsten 5 Stunden eine stündliche Probenahme (Details zur Versuchsdurchführung finden sich im Anhang 6.4.15). Das *Protein of Interest* (POI) wird vom Bakterium im Zytoplasma gebildet ohne ausgeschleust zu werden, was einen Zellaufschluss nötig macht. Die Analytik der Proben wurde per Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) durchgeführt. Die Proben wurden zum einen als Ganzzellprotein (WCP, *Whole Cell Protein*) aufgetragen. Zum anderen erfolgte eine Auftragung unterteilt in unlösliche Fraktion (IP, *Insoluble Part*) und lösliche Fraktion (SP, *Soluble Part*), nachdem die beiden Fraktionen mittels Zentrifugation voneinander getrennt worden waren.

In Abbildung 6 sind Proben der Kultivierung in LB-Medium von pET-9-BMP-2 und pET-24-BMP-2 gezeigt. Es wurde jeweils eine Probe vor der IPTG-Induktion und stündlich bis 5 Stunden danach aufgetragen.

Unter Zuhilfenahme des Größenmakers wird deutlich, dass das Zielprotein mit einer erwarteten Größe von 12,9 kDa gebildet wird (Spur 2-6 bzw. 9-13). Ferner wurde der Nachweis der Identität des BMP-2 mittels MALDI-TOF-MS erbracht (Anhang 6.4.13). Allerdings zeigt der Vergleich von Spur 1 (pET-9 vor der Induktion) mit Spur 8 (pET-24 vor Induktion) bzw. den Spuren 9-13 in Abbildung 6, dass der

pET-24-BMP-2-Stamm bereits vor der Induktion BMP-2 exprimiert; es tritt also so genanntes *Leaking* auf. Es wäre zu erwarten gewesen, dass das Leaking beim pET-9-Stamm und nicht beim pET-24-Stamm auftritt. Womöglich ist es zu einer Verwechslung dieser beiden Stämme gekommen. Dennoch wird die Nomenklatur beibehalten.

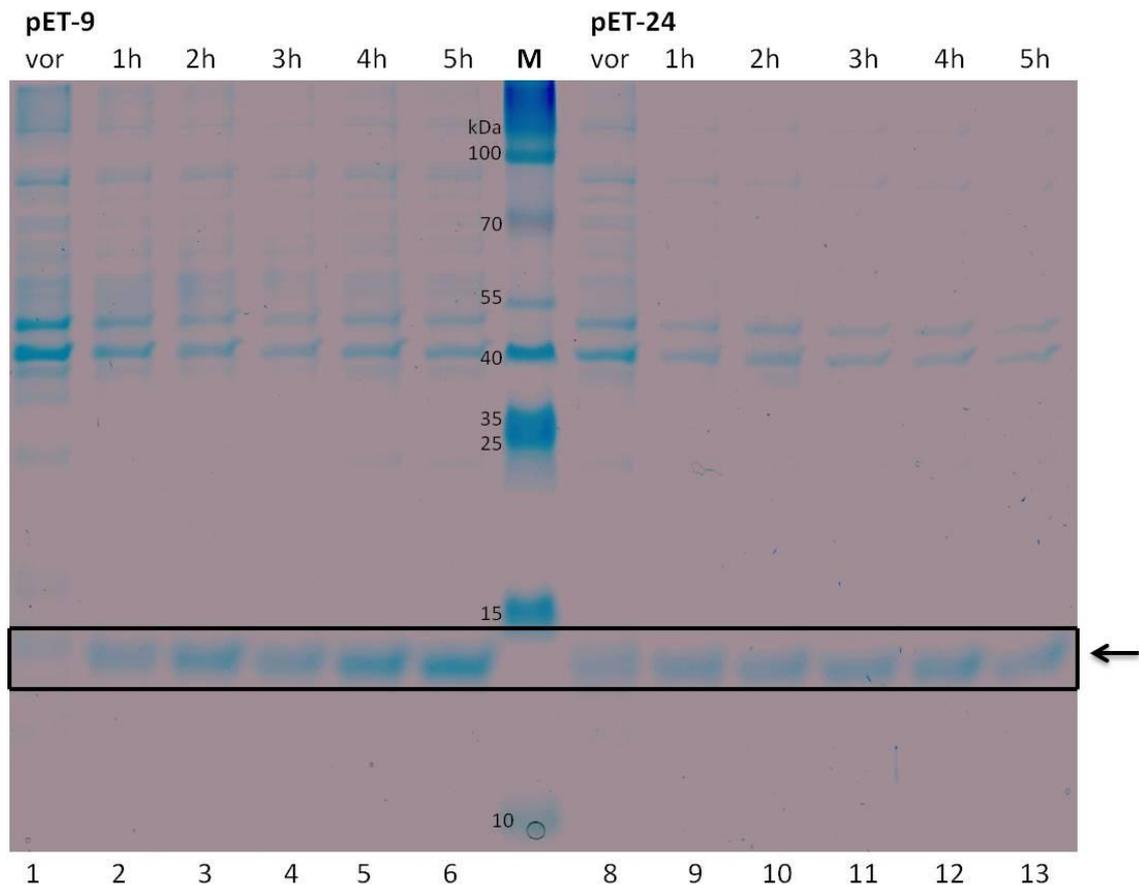


Abbildung 6: Überprüfung der BMP-2-Proteinsynthese, Ganzzellprotein (WCP). Der Pfeil markiert das BMP-2 Monomer.

Die Auftragung der unlöslichen Fraktion (IP), die im Wesentlichen durch Einschlusskörperchen repräsentiert wird, ist in Abbildung 7 gezeigt. Sie macht deutlich, dass die angestrebte Produktion des Proteins in Form von *Inclusion Bodies* erreicht wird. Auf Bahn 1-7 ist die IP des pET-9-Konstrukts aufgetragen, auf den Bahnen 8-13 die des pET-24-Stamms.

Der Vollständigkeit halber ist in Abbildung 8 die Auftragung der löslichen Fraktion (SP) der BMP-2 Produktion gezeigt. Wie sich eindeutig erkennen lässt, ist in der SP kein BMP-2 Monomer (auf der Höhe von 12,9 kDa) zu sehen. Dies in Verbindung mit Abbildung 6 und Abbildung 7 macht deutlich, dass BMP-2 wie geplant vollständig in Form unlöslicher *Inclusion Bodies* gebildet wurde. In Spur 3 von Abbildung 8 ist zur besseren Vergleichbarkeit die Ganzzellprobe (WCP) von pET-9-BMP-2 zwei Stunden

nach der Induktion mit IPTG aufgetragen; in ihr ist die Produktion des Zielproteins deutlich zu erkennen.

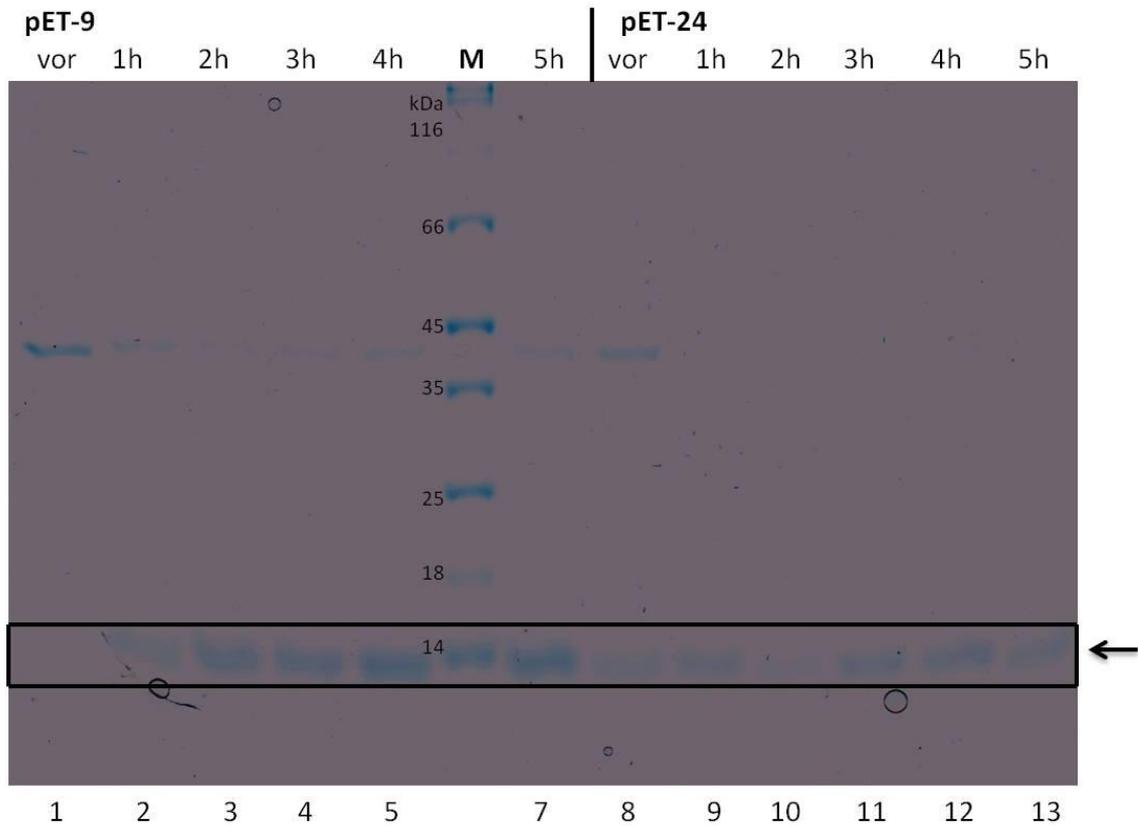


Abbildung 7: Überprüfung der BMP-2-Proteinsynthese, unlösliche Fraktion (IP)

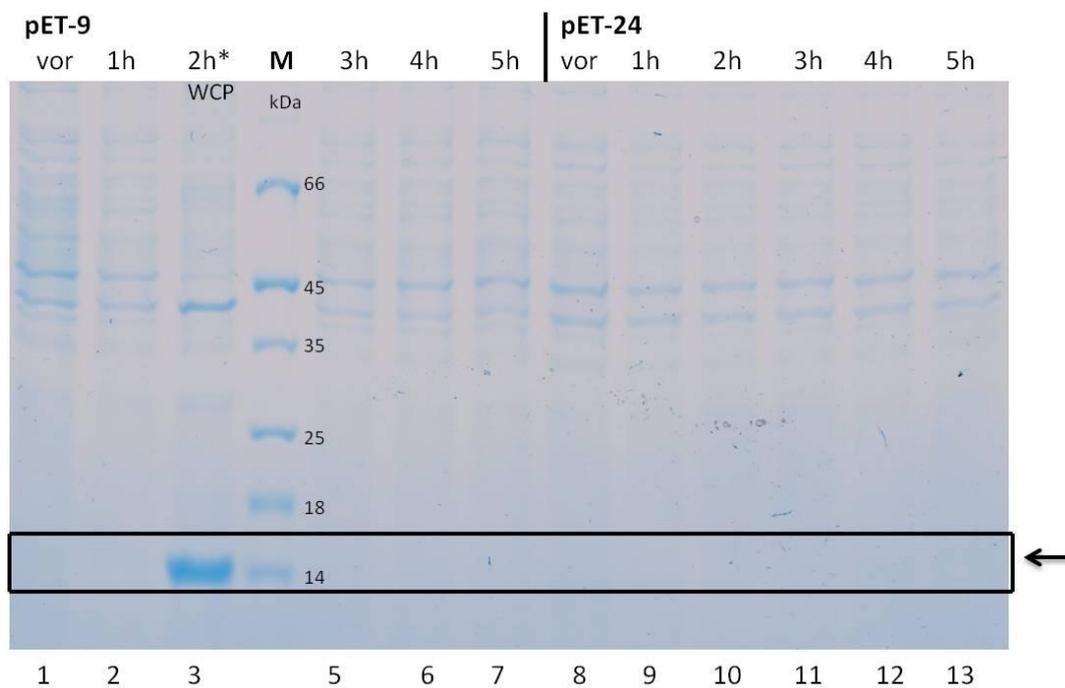


Abbildung 8: Überprüfung der BMP-2-Proteinsynthese, lösliche Fraktion (SP). In Spur 3 ist nicht die SP von t=2h, sondern zu Vergleichszwecken das entsprechende WCP aufgetragen.

BMP-4:

Auch für die Konstrukte pET-9-BMP-4 und pET-24-BMP-4 galt es zu überprüfen, ob diese das Zielprotein BMP-4 hervorbringen und ob es vorwiegend in unlöslicher Form exprimiert wird. Die beiden Stämme wurden analog zu BMP-2 kultiviert.

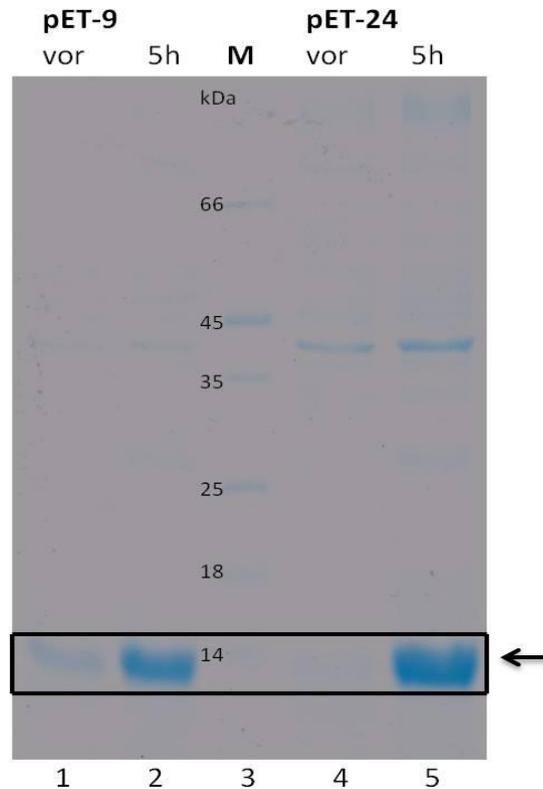


Abbildung 9: Überprüfung der BMP-4-Proteinsynthese, unlösliche Fraktion (IP).

In Spur 1 im Vergleich mit Spur 4 ist deutlich zu erkennen, dass pET-9 bereits vor der Induktion BMP-4 exprimiert.

In Abbildung 9 ist die Proteinsynthese von BMP-4 mittels beider Stämme gezeigt; abgebildet ist die unlösliche Fraktion (IP). Es ist deutlich zu erkennen, dass beide Stämme nach der Induktion *via* IPTG das Zielprotein BMP-4 exprimieren. Ferner wird durch die Betrachtung der beiden korrespondierenden Gele für WCP und SP (s. Anhang 6.3.1) deutlich, dass BMP-4, ebenso wie BMP-2, vollständig als IB gebildet wird. Interessant ist, dass der pET-9-Stamm deutlich bereits vor der Induktion BMP-4 produziert, während dies beim pET-24-Stamm nicht festzustellen ist. Beim pET-9-Stamm tritt somit *Leaking* auf. Diese Tatsache entspricht beim Vergleich der beiden verwendeten Vektoren der Erwartung und ist gleichzeitig genau entgegengesetzt der Beobachtung, die für die BMP-2-Stämme gemacht wurde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die erfolgreiche Produktion der beiden rekombinanten Proteine BMP-2 und BMP-4 die gelungene Konstruktion der insgesamt 4 produzierten *E. coli* –BL21(DE3)- Stämme demonstriert. Die beiden Cytokine bilden erwartungsgemäß innerhalb der unlöslichen Proteine jeweils das mengenmäßig weitest größte Einzelprotein und liegen vollständig als *Inclusion Bodies* vor.

4.3.2 Auto-Induktions-Medium (AI-Medium)

Nachdem in Kapitel 4.3.1 gezeigt werden konnte, dass die beiden Stämme die Zielproteine BMP-2 bzw. BMP-4 produzieren und der jeweils geeignetere Stamm (pET-9 bzw. pET-24) ausgewählt worden war, wurde getestet, ob ein so genanntes Auto-Induktions-Medium (AIM) [94] für die Produktion der Zytokine geeignet ist. Das AIM enthält als zentrale Bestandteile die drei verschiedenen Kohlenstoffquellen Glucose, Lactose und Glycerol. Da *E. coli* diese drei in der angegebenen Reihenfolge verstoffwechselt, lässt sich diese Mischung für Autoinduktion verwenden: Das Wachstum der Zellen erfolgt dabei zunächst unter Verbrauch von Glucose. Erst wenn diese nahezu aufgebraucht ist, beginnt das Bakterium die beiden anderen Quellen zu metabolisieren. Dadurch kommt es zur Induktion des unter dem T7-Promotor stehenden Gens für BMP-2 bzw. BMP-4.

Das AIM zeichnet sich durch Einfachheit und niedrige Kosten aus. Die Bestandteile sind definiert, aber gleichzeitig preiswert. Die Kultivierung kann als Batch-Prozess betrieben werden und bedarf keiner weiteren Prozessregelung. Auch müssen im Prozess keine Proben zur Bestimmung des Induktionszeitpunktes genommen werden. Ferner ist auch keine Zugabe von IPTG erforderlich. Dadurch wird das Kontaminationsrisiko minimiert und der Bedarf an begleitenden Arbeiten gering gehalten.

Abbildung 10 zeigt vergleichend die Analyse des IP der Kultivierung in AIM. Links in Spur 1 ist die Probe des pET-9-BMP-2 (im Folgenden BMP-2) vor der Induktion gezeigt. Gemeint ist damit die Probe, die aus der lactosefreien Zwischenkultur, dem so genannten DNB-Medium (Defined Noninducing Broth) genommen wurde. Daneben in Spur 2 ist die entsprechende Probe aus der lactosehaltigen Hauptkultur, dem sog. DAB-Medium (Defined Autoinduction Broth), aufgetragen. Die Expression des BMP-2 in DAB ist eindeutig zu erkennen und durch den Pfeil angezeigt. In den Spuren 4 und 5 sind die beiden Proben für den pET-24-BMP-4-Stamm (im Folgenden BMP-4) gezeigt. Auch hier erkennt man, dass die Probe aus DNB auf Bahn 4 noch keine Expression des BMP-4 zeigt, während auf Bahn 5 die Expression des Zielproteins mit einer Größe von 13,1 kDa in DAB-Medium klar sichtbar wird. Die Kultivierungsdauer betrug 16 h, weitere Details des Versuchs finden sich im Anhang 6.4.16.

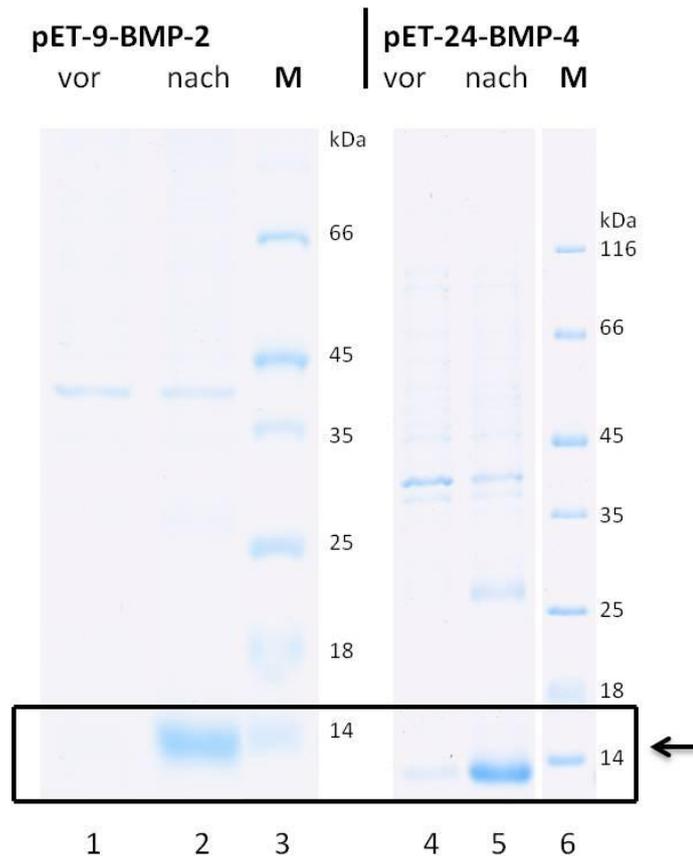


Abbildung 10: Überprüfung der BMP-Proteinsynthese in Auto-Induktions-Medium (AIM), unlösliche Fraktion (IP).

Es ist eindeutig zu erkennen, dass die Produktion beider Zielproteine im AIM gelingt.

4.3.3 AI-Medium 10-L-Bioreaktor

In der industriellen Biotechnologie finden vornehmlich Bioreaktoren Anwendung zur Herstellung rekombinanter Proteine. Dabei werden wichtige Prozessgrößen, wie beispielsweise die Temperatur, der pH-Wert oder die Sauerstoffzufuhr in Echtzeit (*online*) kontrolliert und eingestellt. Diese kontrollierten Kultivierungsbedingungen führen üblicherweise zu weit höheren Biomassekonzentrationen als sie im Schüttelkolben darstellbar sind; darüber hinaus werden so industriell relevante Ziele, namentlich gleichbleibende Produktqualität und hohe Produktausbeute, sichergestellt.

In Kapitel 4.3.2 konnte gezeigt werden, dass die Produktion des Monomers der beiden Proteine BMP-2 und BMP-4 erfolgreich mittels Auto-Induktions-Medium realisiert werden konnte. Für weiterführende Arbeiten wurden die Proteine in größeren Mengen benötigt. Daher wurde der in Abschnitt 4.3.2 beschriebene Prozess, der in 2-Liter-Schikane-Schüttelkolben durchgeführt worden war, für einen 10-Liter-Bioreaktor hochskaliert (sog. *Upscaling*). Ferner wurden dabei verschiedene Kultivierungsparameter erfasst, um den Prozess begleitend zu dokumentieren.

Der Prozess wurde dabei im Satzbetrieb (*Batch*) durchgeführt; d. h. die für das Wachstum benötigten Stoffe wurden vor der Inokulation einmalig zugegeben. Die einzelnen Komponenten des definierten AI-Mediums wurden analog zu den Schüttelkolbenversuchen entsprechend der Vorschrift [94] eingesetzt. Der pH-Wert wurde während der gesamten Kultivierung konstant auf $\text{pH} = 6,7$ gehalten. Der Bioreaktor wurde mit Druckluft begast, wobei die Rührerdrehzahl an $\leq 30\%$ der maximalen Sauerstoffsättigung des Mediums gekoppelt wurde. Die Temperatur der Kultivierung wurde konstant auf 37 °C geregelt. Des Weiteren wurden als Kultivierungsparameter *online* die Gehalte an Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid im Abgas gemessen. Hinzu kamen als *offline* bestimmte Größen die Optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge (OD_{600}) sowie die Bestimmung der Konzentration der drei im Medium befindlichen Kohlenstoffquellen Glucose, Lactose und Glycerol.

Letztere Bestimmung war insofern interessant, als dass der Verbrauch der einzelnen Komponenten bzw. die Konzentration derselben den Zeitpunkt der Induktion der Proteinexpression bestimmt [95].

E. coli metabolisiert die drei Substanzen Glucose, Lactose und Glycerol in dieser Abfolge; dadurch lässt sich diese Mischung für Autoinduktion verwenden: Die Zellen wachsen zunächst unter Verbrauch ihres Präferenzsubstrats Glucose. Erst wenn diese nahezu aufgebraucht ist, beginnt das Bakterium die beiden anderen Quellen zu metabolisieren. Dabei gibt es wiederum eine Präferenz der Lactose gegenüber dem Glycerol. Die Verstoffwechselung der Lactose führt schließlich zur gewünschten Induktion des unter dem *Lac*-Operator stehenden Gens für BMP-2 bzw. BMP-4. Die Produktbildung des Monomers wurde anhand einer SDS-PAGE-Analyse verfolgt. Eine detaillierte Beschreibung der Versuche findet sich im Anhang 6.4.17.

4.3.4 AI-Medium 10-L-Bioreaktor BMP-2

In Abbildung 11 und Abbildung 13 sind ausgewählte Daten der Reaktorkultivierungen der Cytokine BMP-2 bzw. BMP-4 dargestellt. Die Verläufe der beiden Reaktormessdatensätze der – bis auf das Zielprotein – gleichen Kultivierungsansätze sind qualitativ gut miteinander vergleichbar.

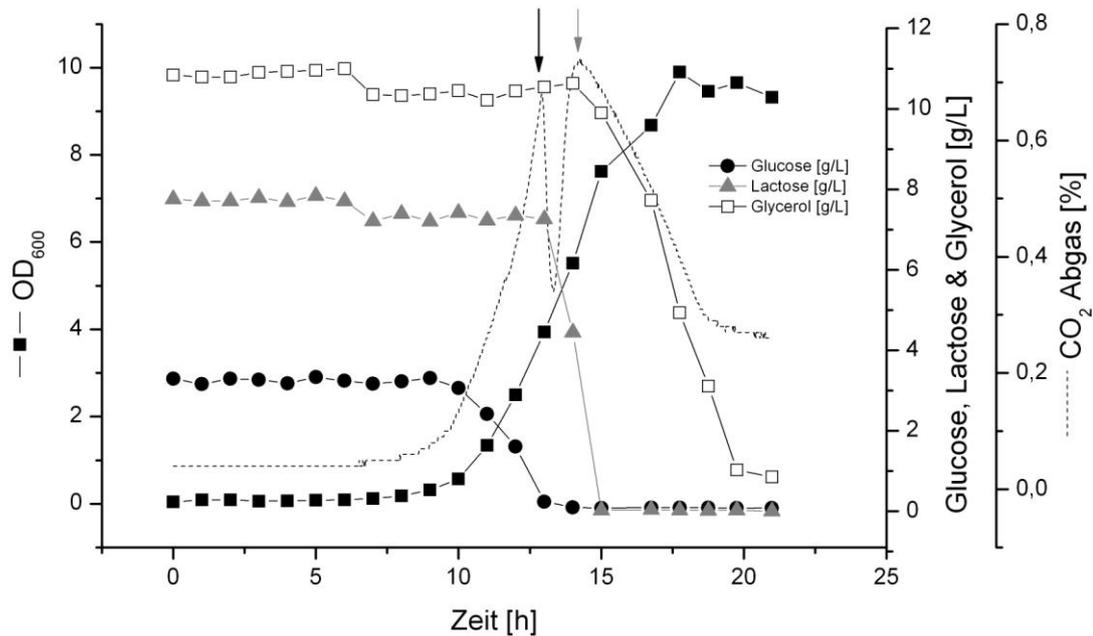


Abbildung 11: Analyse der 10-L-Auto-Induktions-Kultivierung von BMP-2

Dargestellt sind die zeitabhängigen Verläufe der OD, des CO_2 -Gehalts im Reaktorabgas sowie die Konzentrationen von Glucose, Lactose und Glycerol. Der schwarze Pfeil markiert den finalen Verbrauch von Glucose (und somit mittelbar den Induktionszeitpunkt), der graue Pfeil den finalen Verbrauch von Lactose.

Abbildung 11 zeigt die gemessenen Daten der Reaktorkultivierung von BMP-2. Hierbei sind die optische Dichte (OD) und weitere relevante Reaktormessdaten gegen die Kultivierungszeit aufgetragen.

Anhand des Verlaufs der OD lassen sich die klassischen Phasen des Bakterienwachstums erkennen. Bis etwa 8 h nach Animpfung (t_0) verharren die Bakterien in der Verzögerungs- oder *lag*-Phase. Danach treten sie für etwa 7 h in die exponentielle Phase ein, wonach sich nach kurzer Übergangsphase die stationäre Phase nach insgesamt etwa 18 h bei $\text{OD}_{600} = \sim 10$ einstellt. Nach 21 h wurde die Kultivierung beendet und die Biomasse geerntet.

Der Gehalt an Kohlenstoffdioxid (CO_2) im Abgas des Bioreaktors ist in der Abbildung als gestrichelte Linie dargestellt. Dieser *online* gemessene Parameter ist interessant, weil durch ihn in Echtzeit der Verbrauch der Kohlenstoffquellen und somit indirekt der Beginn der Proteinexpression abgeschätzt werden kann. Der Verlauf der CO_2 -Konzentration zeigt zwei Spitzen nach etwa 13 bzw. 14 h. Die erste Spitze, markiert durch einen schwarzen Pfeil, indiziert den finalen Verbrauch der Glucose; hiernach schließt sich die Metabolisierung der Lactose an, wodurch die Proteinexpression ausgelöst wird. Nachdem die Glucose nahezu vollständig verbraucht ist, kommt es zu einem Abfall der CO_2 -Abgaskonzentration, da der Stoffwechsel des

Bakteriums auf die neuen Substrate Lactose und Glycerol umgestellt werden muss. Die zweite Spitze bei 14 h ist durch einen grauen Pfeil markiert. Hier ist die Lactose aufgebraucht und nur noch Glycerol steht als Kohlenstoffquelle zur Verfügung.

Um den Datensatz zu vervollständigen, wurden auch die Konzentrationen von Glucose, Lactose und Glycerol im Verlauf der Kultivierung analysiert. Die Ergebnisse bestätigen die Aussagen, die auf Grund des CO₂-Verlaufs gemacht werden konnten. Die ersten 10 h bleibt die Glucosekonzentration auf dem Niveau der Ausgangskonzentration von etwa 3 g/L. Danach fällt sie binnen der nächsten 4 h auf einen Wert von 0,24 g/L, gefolgt von noch deutlich geringeren Konzentrationen, die den finalen Verbrauch der Glucose verdeutlichen. Der Verlauf der Lactosekonzentration macht deren nachgelagerte Metabolisierung deutlich. Hier bleibt die Konzentration bis zum Zeitpunkt t_{13} nahezu unverändert bei etwa 7 g/L, bevor die Lactose innerhalb der nächsten 2 h fast gänzlich aufgebraucht ist. Das Glycerol wiederum wird erst nach den beiden Zuckern verstoffwechselt. Dessen Ausgangskonzentration von etwa 11 g/L wird für die ersten 14 h der Kultivierung gefunden, bevor die Konzentration durch Verbrauch binnen 5 h auf etwa 1 g/L absinkt. Diese Bevorzugung in der Reihenfolge des Abbaus der drei verschiedenen Kohlenstoffquellen wurde ebenfalls in anderen Arbeiten gefunden [95].

Die Ernte des Reaktors ergab eine Feuchtmasse (wet cell weight, WCW) von 80 g, was einer Feuchtzellmassekonzentration von 9 g/L entspricht.

Produktbildung BMP-2-Monomer

Abbildung 12 zeigt den zeitlichen Verlauf der BMP-2-Monomerbildung während der Reaktorkultivierung im Autoinduktionsmedium anhand der SDS-PAGE der normierten Ganzzellproteinproben (WCP). Durch den Vergleich der Probe zum Zeitpunkt 13 h (d. h. vor der Autoinduktion; Spur 1) ist deutlich zu erkennen, dass der Beginn der Produktion des rekombinanten Monomers (13 kDa, angezeigt durch Pfeil) etwa eine Stunde später, also bei 14 h (Spur 2), liegt. Eine weitere Stunde später hat sich die Menge an produziertem Protein noch einmal deutlich erhöht.

Der Beginn der Proteinproduktion lässt sich mit dem Verlauf der entsprechenden Wachstumskurve korrelieren; etwa 2 Stunden nach der Induktion vollzieht sich hier der Übergang von der exponentiellen in die Übergangsphase. Auch danach (Spuren 4-8) bleibt die Bandenintensität des Zielproteins auf einem nahezu konstant hohen Niveau. Es findet also kein Produktabbau z. B. während der stationären Phase statt. Dadurch kann der optimale Erntezeitpunkt sehr einfach mittels Überwachung der optischen Dichte bzw. des Verlaufs der CO₂-Abgas-Konzentration abgeschätzt werden.

Ferner sind in diesem Gel, allerdings nur sehr schwach, die prominentesten Banden der *E. coli* Wirtszellproteine im Bereich um etwa 40 kDa zu sehen, die auch schon in den Vorversuchen zur Proteinexpression beobachtet werden konnten.

Genauso wie in den Vorversuchen stellt auch bei der Reaktorkultivierung die Monomerbande das mit Abstand größte Einzelprotein am Gesamtzellprotein dar. Das Zielprotein wird wie beabsichtigt vollständig als *IB* gebildet und findet sich in der unlöslichen Fraktion des Zellysats (s. Abbildung 12 und Abbildung 27).

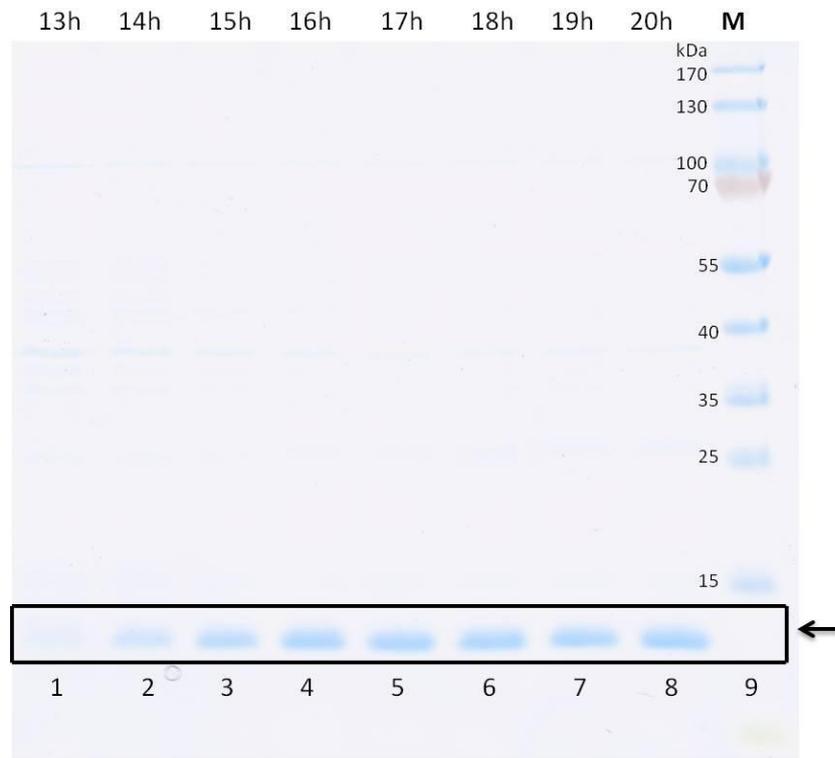


Abbildung 12: Zeitlicher Verlauf der BMP-2 Expression als SDS-PAGE des normierten Ganzzellproteins (WCP).

Es wurden jeweils Proben vor der Autoinduktion (Spur 1) bzw. je eine Stunde danach (Spur 2-8) bis t_{20} aufgetragen. Die OD-Normierung der Proben erfolgte analog zu den Vorversuchen im Schüttelkolben in LB- bzw. Autoinduktions-Medium (DAB). Die Analyse wurde mittels SDS-PAGE (15% iges Gel; *Colloidal Coomassie Blue*-Färbung) durchgeführt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit der Methode der Autoinduktions-Kultivierung erfolgreich und einfach BMP-2-Monomer hergestellt werden konnte.

4.3.5 AI-Medium 10-L-Bioreaktor BMP-4

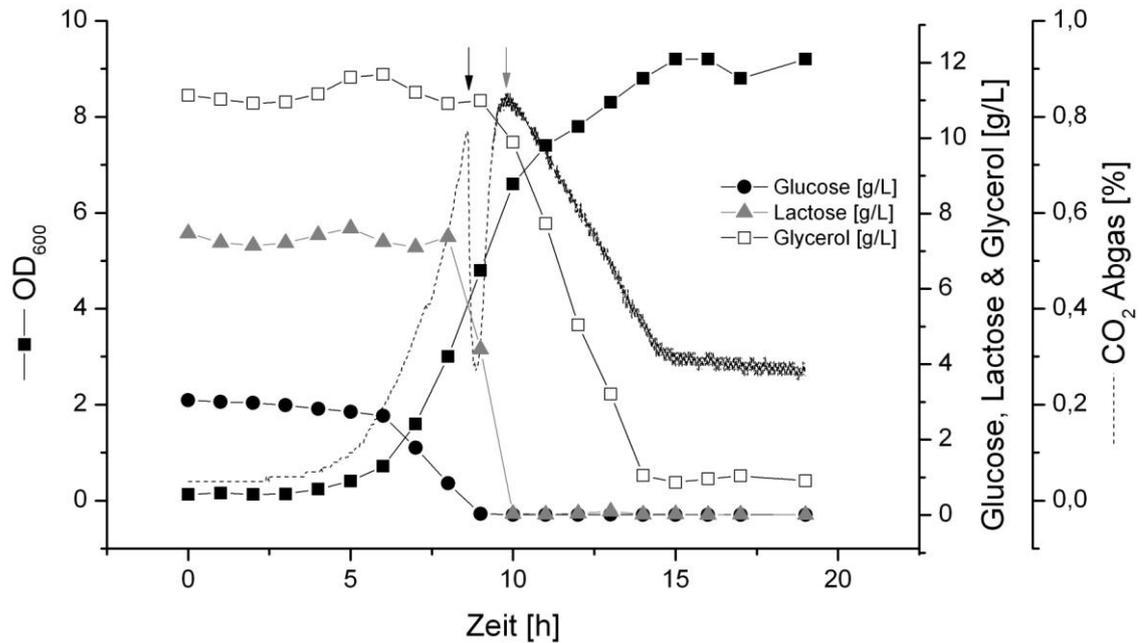


Abbildung 13: Analyse der 10-L-Auto-Induktions-Kultivierung von BMP-4

In der Abbildung sind die Verläufe der Optischen Dichte, des CO₂-Gehalts im Reaktorabgas und die Konzentrationen der drei Kohlenstoffquellen im AI-Medium (Glucose, Lactose und Glycerol) gezeigt. Der schwarze Pfeil zeigt den abschließenden Verbrauch von Glucose (und somit mittelbar den Induktionszeitpunkt), der graue Pfeil den finalen Verbrauch von Lactose an.

Abbildung 13 illustriert die aufgenommenen Daten der BMP-4-Bioreaktorkultivierung. Die optische Dichte (OD₆₀₀) und andere Messdaten wurden hierbei gegen die Kultivierungsdauer aufgetragen.

Auch der Verlauf der OD₆₀₀ während der Kultivierung von BMP-4 entspricht der Erwartung. Die ersten 6 h nach der Inokulation des Bioreaktors ist kein nennenswerter Zuwachs der OD zu verzeichnen (*lag-phase*). Hiernach erfolgt der Eintritt in die exponentielle Phase für etwa 4 h. Es schließt sich bis t_{13} die Übergangsphase an, bevor für die nächsten 6 h bis zur Ernte der Biomasse die stationäre Phase mit einer finalen OD = ~ 9 erreicht wird.

Die Konzentration an CO₂ im Bioreaktor-Abgas ist in Abbildung 13 als gestrichelte Linie gezeigt. Dieser Verlauf ist zur indirekten Abschätzung des Beginns der Proteinexpression sehr nützlich. Der Verlauf der CO₂-Konzentration zeigt ebenfalls zwei Spitzen nach etwa 8,5 bzw. 10 h. Die erste Spitze, durch einen schwarzen Pfeil markiert, zeigt an, dass die Glucose nahezu vollständig verbraucht ist. Es erfolgt anschließend die Verstoffwechslung der Lactose, durch die die Proteinexpression ausgelöst wird. Nachdem die Glucose nahezu vollständig verbraucht ist, kommt es zu

einem Abfall der CO₂-Abgaskonzentration, da sich der Stoffwechsel des Bakteriums auf die neuen Substrate Lactose und Glycerol umstellt. Die zweite Spitze bei t₁₀ (gekennzeichnet durch einen grauen Pfeil) indiziert den finalen Verbrauch der Lactose; somit ist nur noch Glycerol als Kohlenstoffquelle verfügbar.

Für die Kultivierung von BMP-4 wurden ebenfalls die Konzentrationen von Glucose, Lactose und Glycerol während des Prozesses bestimmt. Auch hier bestätigen die Ergebnisse den Verlauf der CO₂-Konzentration. Die ersten 6 h nimmt die Glucosekonzentration von anfänglich 3 g/L nur unwesentlich ab. Danach fällt sie binnen der nächsten 3 h auf einen Wert von 0,04 g/L, was den vollständigen Verbrauch der Glucose verdeutlicht. Die Lactose, die als nächste Kohlenstoffquelle katabolisiert wird, bleibt bis zum Zeitpunkt t₈ fast unverändert bei etwa 7 g/L, bevor sie innerhalb der nächsten 2 h nahezu gänzlich aufgebraucht wird.

Die Metabolisierung des Glycerols beginnt, wenn die Lactose zur Neige geht; hier also 9 h nach Inokulation. Dessen Ausgangskonzentration von etwa 11 g/L wird für die ersten 9 h der Kultivierung gefunden, bevor die Konzentration durch Verbrauch binnen 5 h auf etwa 1,05 g/L absinkt. Auch hier zeigt sich die erwähnte Präferenz in der Verstoffwechselung [95].

Die Ernte des Reaktors ergab eine Feuchtmasse (WCW) von 81 g und somit eine Feuchtzellmassekonzentration von 9 g/L.

Produktbildung BMP-4-Monomer

In Abbildung 14 ist der Verlauf der BMP-4-Monomerbildung während der Bioreaktorkultivierung mittels einer SDS-PAGE der Ganzzellproteinproben (WCP) gezeigt. Der Vergleich der Probe zum Zeitpunkt t₈ (Spur 2, vor der Autoinduktion) mit insbesondere der späteren Proben t₉ (Spur 3) und den weiteren Proben t₁₁-t₁₉ (Spur 4-8) macht deutlich, dass der Beginn der Autoinduktion bzw. der Proteinproduktion zwischen t₈ und t₉ liegt. In Spur 2 ist die Bande des BMP-4-Monomers (13 kDa, indiziert durch Pfeil) noch nicht zu sehen. Eine Stunde später bei t₉ (Spur 3) ist die entsprechende Bande bereits zu erkennen. Im weiteren Verlauf nimmt die Intensität der Monomerbande weiter zu und erreicht ein konstant hohes Niveau.

Der Beginn der Proteinproduktion von BMP-4 lässt sich, ganz analog zum BMP-2, mit dem Verlauf der entsprechenden Wachstumskurve korrelieren. 1 Stunde nach der Autoinduktion gehen die Zellen von der exponentiellen in die stationäre Phase über. Ebenso kann auch für das BMP-4 keine Degradation festgestellt werden; die Intensität der Bande bleibt nach Erreichen des Maximums (11h) auf ähnlichem Niveau (Spur 4-8). Ferner können die für den Lactose-Verbrauch gemachten Aussagen gut mit den Gelbildern in Einklang gebracht werden. Zum Zeitpunkt t₈ ist die Lactosekonzentration noch auf ihrem Ausgangsniveau (7 g/L) und im Gel ist keine Expression des Zielproteins feststellbar. Eine Stunde später ist die Lactosekonzentration auf 4,4 g/L gesunken und

die aufgenommene Lactose spiegelt sich in der Monomerbande in Spur 3 wieder. Für alle weiteren Zeitpunkte wurde die Lactose als verbraucht bestimmt und die autoinduzierte Proteinexpression resultiert in der 13 kDa großen Monomerbande.

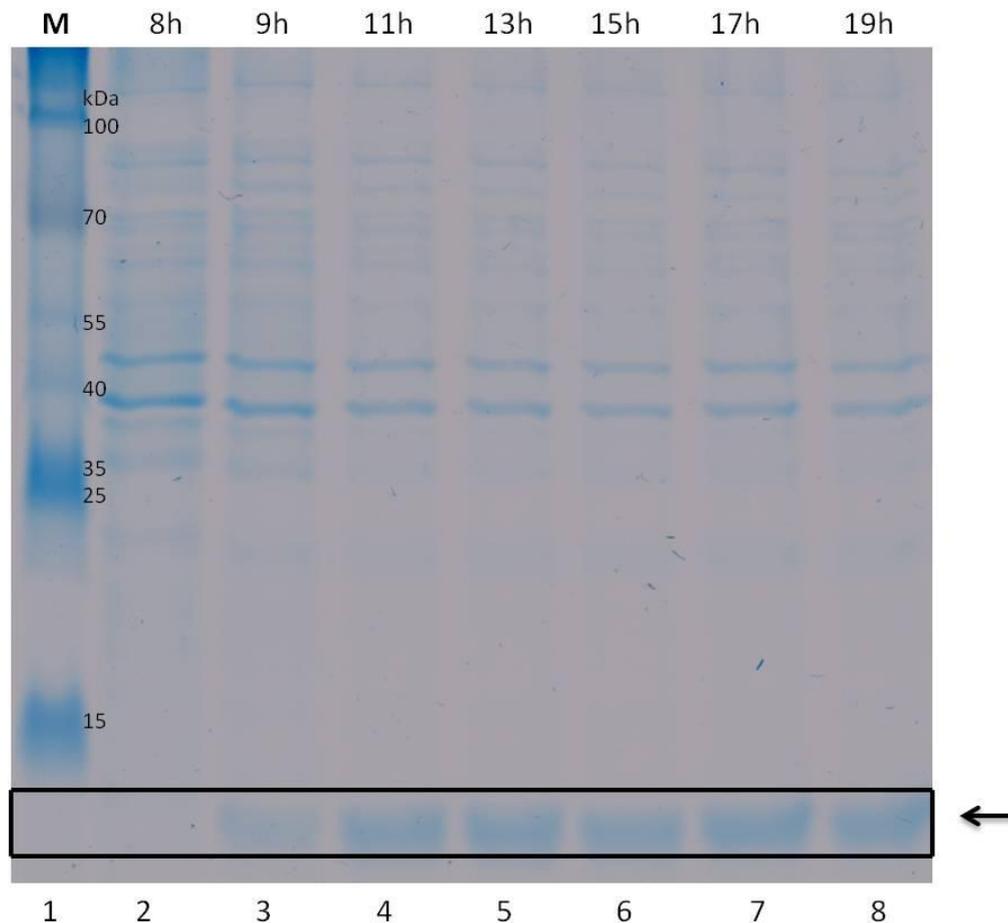


Abbildung 14: Zeitlicher Verlauf der BMP-4 Expression (normiertes WCP)

Es wurden jeweils Proben vor der Autoinduktion (Spur 2) und 1 Stunde danach (Spur 3) bzw. alle 2 h (bis t_{19} ; Spur 4-8) aufgetragen. Die OD-Normierung der Proben erfolgte analog zu den Vorversuchen im Schüttelkolben in LB- bzw. Autoinduktions-Medium (DAB). Die Analyse wurde mittels SDS-PAGE (15% iges Gel; *Colloidal Coomassie Blue*-Färbung) durchgeführt.

Für die Herstellung von BMP-4-Monomer konnte somit ebenfalls gezeigt werden, dass die Autoinduktions-Kultivierung als einfache Methode erfolgreich eingesetzt werden kann.

Fazit des Kapitels

Das *Upscaling* der Schüttelkolben-Kultivierung auf den 10-L-Bioreaktor konnte erfolgreich demonstriert werden.

Das Ziel, die beiden Zielproteine als *IB* herzustellen, wurde erreicht. BMP-2 bzw. BMP-4 stellen wie beabsichtigt das mengenmäßig größte Einzelprotein am

Gesamtzellprotein dar; in den *IB* finden sich nur wenige andere Proteine (Abbildung 10). Somit konnte eine Methode etabliert werden, mit der auf einfachem und reproduzierbarem Wege die Produktion der Cytokine in ausreichend großen Mengen durchgeführt werden konnte.

Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass die Kultivierungen der beiden Proteine qualitativ sehr gut miteinander vergleichbar sind. Auch sind die Ausbeuten mit 9,17 g/L Feuchtzellmasse für BMP-2 bzw. 9,05 g/L WCW für BMP-4 ähnlich. Zwar ist die finale OD_{600} mit etwa 10, und damit die finale Biomasse, im Vergleich zu anderen *E. coli*-Stämmen im gleichen AI-Medium [94] deutlich geringer. Allerdings ist dieser Parameter auch stammabhängig und insgesamt ist die Biomasseausbeute gegenüber klassischem LB-Medium bis zu viermal größer (Daten nicht gezeigt).

Der Einsatz des AI-Mediums zum Zweck der einfachen und günstigen Produktion der monomeren Cytokine BMP-2 und BMP-4 erbrachte gute Resultate.

4.4 Prozessierung BMP-2 und BMP-4

Nachdem in Kapitel 4.3 gezeigt wurde, dass das BMP-X in *E. coli* als Einschlusskörperchen produziert werden kann, schloss sich die weitere Prozessierung der *IB* an (Vgl. Abbildung 4). Zunächst wurde dazu die Biomasse aus dem Reaktor mittels Zentrifugation konzentriert und die Zellen mechanisch unter hohem Druck aufgeschlossen. Die aufgeschlossene Masse wurde erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und die so erhaltene unlösliche Fraktion weiter verarbeitet. Diese wurde mehrfach gewaschen um Zelltrümmer und insbesondere Membranproteine zu entfernen [96].

Die resultierenden unlöslichen Inclusion Bodies mussten als nächstes in Lösung gebracht werden. Hierzu verwendet man üblicherweise chaotrope Salze oder Harnstoff in hochmolaren Konzentrationen. Für BMP-2 konnten bereits gute Ergebnisse mit Guanidinhydrochlorid erzielt werden [87], weswegen es für beide Cytokine Verwendung fand.

Nach der Solubilisierung der Inclusion Bodies erfolgte eine Analyse der Prozessierung mittels SDS-PAGE. Die Reinheit der Einschlusskörperchen wurde densitometrisch bestimmt. Für BMP-2 betrug sie 82 % und für BMP-4 ergab sich eine Reinheit von 79 %. Somit liegen die beiden Reinheitswerte in einem ähnlichen Bereich, wie er für BMP-2 mit 85 % bereits beschrieben worden war[87]; dazu sei jedoch angemerkt, dass es sich dabei um ein anderes Konstrukt mit einem andersartigen (thermoinduzierbaren) Promotor handelt.

Details zur Prozessierung und Analyse finden sich im Anhang 6.4.5.

4.5 Renaturierung des BMP-X Monomers

Die Renaturierung von Proteinen aus *Inclusion Bodies* stellt, neben anderen, eine Möglichkeit zur Gewinnung von bioaktiven Proteinen dar [75]. Der hohe Aufwand, den der Gesamtprozess der Renaturierung erfordert, wird gerechtfertigt durch den einfachen, robusten und kostengünstigen Zugang zum Ausgangsmaterial mittels bakterieller Kultivierung.

In den vorangehenden Kapiteln 4.3 und 4.4 wurde gezeigt, wie sich gereinigte *IB* zur Renaturierung der beiden Cytokine BMP-2 und BMP-4 herstellen und solubilisieren lassen. Im nächsten Teilschritt muss nun aus dem in Lösung gebrachten Monomer das Homodimer erzeugt werden (so genannte Renaturierung; in dieser Arbeit wird auch synonym *Dimerisierung* verwendet); erst in dieser Form kann das Protein seine Bioaktivität entfalten.

Zum Zweck der Dimerisierung beider Proteine werden diese separat aus der Solubilisierungslösung in einem Renaturierungspuffer verdünnt. Die Einstellung der geeigneten Konzentration an Monomer ist wichtig, um Nebenreaktionen zur Dimerisierung wie Agglomeration und Multimerbildung zu minimieren. Konzentrationen im Bereich bis 100 µg/mL haben sich hierbei als nützlich erwiesen [87]. Der Renaturierungspuffer selbst enthält eine Reihe von Agenzien, die zur Ausbildung der natürlichen, räumlichen Struktur des Proteins dienen und insbesondere die Ausbildung des Cystinknotens und der zentralen intermolekularen Disulfidbrücke ermöglichen sollen.

Die in dieser Arbeit verwendeten Renaturierungspuffer enthalten ein definiertes Gemisch aus oxidiertem und reduziertem Glutathion. Dieses ubiquitär in Zellen vorhandene Pseudotripeptid zählt dort zu den wichtigsten natürlichen Antioxidantien. *In vitro* wird durch diese beiden Substanzen ein Redox-Puffer erzeugt, mit dessen Hilfe die zuvor reduzierten Cysteine durch Bildung der drei intramolekularen und der intermolekularen Disulfidbrücke den Cystinknoten formen.

Ferner enthält der Renaturierungspuffer nicht-denaturierende, zwitterionische Aggregationssuppressoren [97], die den Dimerisierungsgrad deutlich verbessern. Konkret kommen hier CHES (*N*-Cyclohexyl-2-aminoethansulfonsäure) bzw. CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat) zum Einsatz.

Auch wird Natriumchlorid im Puffer eingesetzt um eine definierte Ionenstärke zu erzeugen. Zwar konnte, für vereinzelte Beispiele wie BMP-2 gezeigt werden, dass Natriumchlorid nicht immer zwingend erforderlich ist. Jedoch machen andere Arbeiten zur Renaturierung von Cystinknoten-Proteinen deutlich, dass die Anwesenheit von Natriumchlorid dort unentbehrlich ist [98].

Im Folgenden wird auf die konkreten Renaturierungsexperimente eingegangen.

4.5.1 CHES

Zunächst wurde ein Renaturierungspuffer verwendet, dessen Zusammensetzung auf dem Patent von Vicik [76] basiert, welches sich auch BMP-2 bezieht. Als zentralen Bestandteil enthält dieser Puffer das Taurinderivat CHES (*N*-Cyclohexyl-2-aminoethansulfonsäure); der Puffer wird im Folgenden als CHES-Puffer bezeichnet. Tabelle 2 zeigt die Zusammensetzung des Puffers.

Tabelle 2: Zusammensetzung des CHES-Renaturierungs-Puffers

Konzentration	Substanz
750 mM	CHES (<i>N</i> -Cyclohexyl-2-aminoethansulfonsäure)
50 mM	TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan), pH 8,5
1 M	NaCl (Natriumchlorid)
5 mM	EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)
2 mM	Reduziertes Glutathion
1 mM	Oxidiertes Glutathion

Die, wie in Kapitel 4.4 beschriebenen, gereinigten IB wurden zur Dimerisierung verwendet. Zunächst wurden die IB in Guanidinhydrochlorid, einem chaotropen Salz, solubilisiert. Danach wurde das Solubilisat zentrifugiert und die Konzentration der in Lösung gebrachten IB mittels der Proteinquantifizierungsmethode nach Bradford (Anhang 6.4.4) bestimmt und die IB dann mit dem Renaturierungspuffer auf eine Konzentration von 50 µg/mL verdünnt. In Vorversuchen konnte eine Puffertemperatur von 10 °C als optimale Dimerisierungstemperatur ermittelt werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Der pH-Wert beider Renaturierungspuffer wurde auf 8,5 eingestellt; durch leicht alkalisches Milieu ist die Bildung von Disulfidbrücken erleichtert, da die Bildung von Thiolanionen gefördert wird [99]. Die Dimerisierung erfolgte somit bei definierten Bedingungen; Details zur Versuchsdurchführung s. Anhang 6.4.8.

4.5.2 CHAPS

Es wurde anfangs versucht, den von Vicik für die Dimerisierung von BMP-2 benutzten CHES-Renaturierungspuffer zu verwenden, um auch Homodimere des BMP-4 zu erzeugen. Interessanterweise konnte die Bildung des zu BMP-2 engverwandten und sehr ähnlichen BMP-4-Homodimers unter Verwendung des CHES-Puffers nicht beobachtet werden (s. Abbildung 15).

Auch zahlreiche Modifikationen des CHES-Puffers, wie beispielsweise die Variation des Glutathionverhältnisses oder der –konzentration, die Änderung des pH-Wertes oder die sorgfältige Entgasung gegen oxidative Einflüsse (Ergebnisse nicht gezeigt) brachten

keine Dimer-Bande hervor. Aufgrund dieser Ergebnisse musste für die Dimerisierung von BMP-4 ein anderer Renaturierungspuffer verwendet werden.

Die Patente von Cerletti [74] bzw. Wolfman und McCoy [75], auf denen auch der CHES-Puffer von Vicik basiert, postulieren einen Puffer, in dem verschiedene Cystinknoten-Proteine dimerisiert werden sollten.

Als Aggregationshemmer wird hier statt des CHES das Gallensäurederivat CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat) verwendet. Es wird nicht nur die Substanz, sondern auch deren Massekonzentration geändert. Alle anderen Bestandteile sind identisch. Auch die Versuchsbedingungen wurden vollständig gleich belassen. Andere Arbeiten zeigen auch die Verwendung des CHAPS-Puffers [98]. In diesen wird CHAPS als „Dimerisations-Verstärker“ (*dimerization enhancer*) bezeichnet, dessen Ursachen für die Autoren unbekannt sind. Tabelle 3 die Zusammensetzung des CHAPS-Renaturierungspuffers.

Tabelle 3: Zusammensetzung des CHAPS-Renaturierungs-Puffers

Konzentration	Substanz
33 mM	CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat)
50 mM	TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan), pH 8,5
1 M	NaCl (Natriumchlorid)
5 mM	EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)
2 mM	Reduziertes Glutathion
1 mM	Oxidiertes Glutathion

4.5.3 Vergleich der Renaturierung mit CHES und CHAPS

Abbildung 15 zeigt das Ergebnis der verschiedenen Renaturierungsansätze im Vergleich. Aufgetragen wurde jeweils eine Probe zu den Zeitpunkten $t = 0$ h und $t = 96$ h. Die Renaturierungsdauer von 4 Tagen hatte sich für BMP-2 als zweckdienlich erwiesen [100]. Für strukturverwandte Proteine wie beispielsweise das GDF-5 finden sich auch Renaturierungszeiten von einer Woche [101]. Die linke Gelhälfte zeigt den Vergleich von BMP-2 zu BMP-4, beide in CHES-Puffer renaturiert. In der rechten Gelhälfte werden die Renaturierungsansätze der beiden Proteine in CHAPS-Puffer einander gegenüber gestellt.

Abgebildet sind hier, im Vergleich zu vorherigen Darstellungen mit Monomerbanden, nur die Dimerbanden. Zu Gunsten der bestmöglichen Auftrennung von Dimerbanden und Wirtszellproteinen (insbesondere Bahn 9) wurde die gesamte Trennstrecke des Gels genutzt. Es wurde hier also auf die analytische, gleichzeitige Darstellung von Mono-

und Dimerbanden bewusst verzichtet. Die kleineren Monomerbanden sind daher hier nicht zu sehen.

Der Vergleich von Bahn 3 (B3) mit Bahn 2 in Abbildung 15 (also BMP-2 in CHES-Puffer renaturiert, vergleichen zu den Zeitpunkten t_0 und t_{96}) macht durch die starke Bande bei etwa 26 kDa deutlich, dass die Renaturierung von BMP-2 mit dem CHES-Puffer wie erwartet Homodimere des BMP-2 hervorgebracht hat. Der Nachweis der Identität konnte mittels MALDI-TOF-MS erbracht werden (siehe Anhang 6.4.13). Demgegenüber zeigt der Vergleich von B5 mit B4, dass dort keine wesentliche Veränderung des Bandenmusters eingetreten ist. Es konnte also mit Hilfe des CHES-Renaturierungspuffers kein BMP-4-Homodimer erzeugt werden.

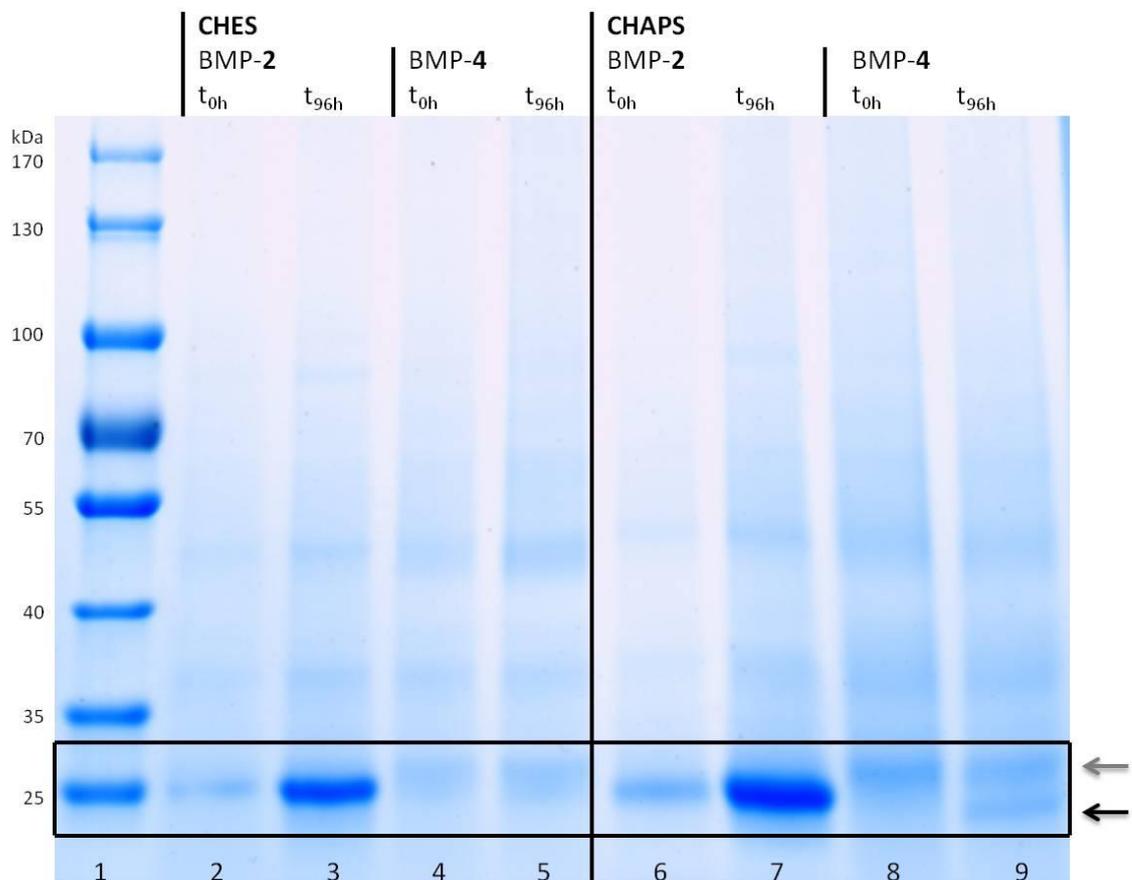


Abbildung 15: Vergleich der Renaturierungen von BMP-2 und BMP-4 mit CHES bzw. CHAPS. Gradienten-Gel (Übersichts-Gel I).

Der Vergleich zeigt, dass mit CHAPS-Puffer für BMP-2 und BMP-4 (schwarzer Pfeil) Homodimere entstehen. Bei Verwendung von CHES-Puffer entsteht nur für BMP-2 das Homodimer.

Für die Renaturierung von BMP-2 mittels CHAPS-Puffer zeigt sich, dass auch hier erfolgreich BMP-2-Dimer gebildet werden konnte; die Zunahme der 26 kDa großen Bande auf Bahn 7 im Vergleich zu Bahn 6 macht das deutlich. Es fällt ferner auf, dass die Dimerbande auf Bahn 7 viel stärker ist, als die entsprechende Bande auf Bahn 3.

Da die Ausgangskonzentration beider Ansätze 50 µg/mL betrug, lässt sich sagen, dass die Ausbeute bzw. der Dimerisierungsgrad von BMP-2 mit CHAPS-Puffer höher ist als mit CHES-Puffer. Eine detailliertere, relative Quantifizierung wird in Kapitel 4.5.5 beschrieben.

Der Vergleich für die Renaturierung von BMP-4 in CHAPS-Puffer (Bahn 9 mit Bahn 8) macht deutlich, dass sich eine Bande im Bereich von etwa 26 kDa gebildet hat. Es ist deutlich zu erkennen, dass eine Bande (von Wirtszellproteinen (HCP)) in diesem Bereich existiert, deren Intensität nicht zunimmt (grauer Pfeil). Unterhalb dieser Bande kommt jedoch auf Bahn 9 eine Bande hinzu, die auf Bahn 8 nicht existiert (schwarzer Pfeil).

Es konnte also mit Hilfe des CHAPS-Renaturierungspuffers BMP-4-Homodimer erzeugt werden. Der Nachweis der Identität des BMP-4 konnte mittels Analyse der entsprechenden Bande per MALDI-MS (Anhang 6.4.13) erbracht werden; gleichwohl wurde hierbei festgestellt, dass die Bande auch noch andere Proteine enthält.

Zusammenfassend lassen sich die vier Ansätze in eine relative Reihenfolge bzgl. des Dimerisierungsgrades bzw. der Ausbeute bringen:

$$\text{BMP-2}_{\text{CHAPS}} > \text{BMP-2}_{\text{CHES}} > \text{BMP-4}_{\text{CHAPS}} > \text{BMP-4}_{\text{CHES}} \geq 0$$

4.5.4 Einfluss der Ionenstärke

Die Renaturierungspuffer enthalten ein definiertes Gemisch von einzelnen Substanzen, von denen jede einen Einfluss auf das Dimerisierungsverhalten hat. Einer dieser Stoffe ist Natriumchlorid (NaCl). Allgemein kann über die Zugabe von Salzen die Ionenstärke der Lösung verändert werden. Die Ionenstärke kann einen Einfluss auf das Renaturierungsverhalten haben, da die Salze die Oberflächenaktivität des Proteins verändern können (so genanntes Ein- oder Aussalzen).

In weiterführenden Arbeiten von Vallejo [97] konnte gezeigt werden, dass Natriumchlorid bei der Renaturierung von BMP-2 mittels CHES-Puffer vollständig entbehrlich ist. Diese Erkenntnis war dort insbesondere für die sich anschließende Aufreinigung mit Heparin-Affinitäts-Chromatographie (HAC) wichtig. Bei dieser Form der Chromatographie wird auch die elektrostatische Wechselwirkung zwischen dem Zielmolekül und der negativ geladenen Oberfläche des Heparins ausgenutzt. Folglich hat die Ionenstärke der mobilen Phase einen Einfluss auf das Chromatographievermögen der Heparinsäule.

Die Entbehrlichkeit von NaCl im Renaturierungspuffer (am Beispiel von BMP-2) zeigt sich aber nicht für alle Cystinknotenproteine. So konnten Honda *et al.* [98] zeigen, dass für die rekombinante Herstellung des sog. Growth-Differentiation-Factor 5 (GDF 5) die Zugabe von NaCl zum Renaturierungspuffer unerlässlich ist. Die Autoren merken

ferner an, dass die Zugabe von sowohl CHAPS als auch NaCl extrem effektiv für die Renaturierung ist. Gleichzeitig stellen sie dennoch fest, dass die Mechanismen, welche hinter den Renaturierungsvorgängen stehen, „schwer fassbar“ (*elusive*) bleiben.

Aufgrund dieser konträren Informationen galt es zunächst zu prüfen, ob der CHAPS-Puffer für die Dimerisierung von BMP-4 zwingend NaCl enthalten muss.

Dazu wurden zwei Renaturierungsansätze von BMP-4 in CHAPS-Puffer mit 1 M NaCl bzw. 0 M NaCl hergestellt und nach 96 h Renaturierungsdauer miteinander verglichen. Die Renaturierung erfolgte bei 10°C.

Der Vergleich von Bahn 3 (B3) mit Bahn 2 in Abbildung 16 macht deutlich, dass bei Verwendung des modifizierten CHAPS-Puffers ohne Natriumchlorid innerhalb von 96 Stunden keine Dimerbande entsteht. Demgegenüber zeigt sich im Vergleich von B5 mit B4, dass bei Verwendung des Natriumchlorid enthaltenden CHAPS-Puffers auf B5 eine neue Bande (schwarzer Pfeil) bei etwa 25 kDa entstanden ist.

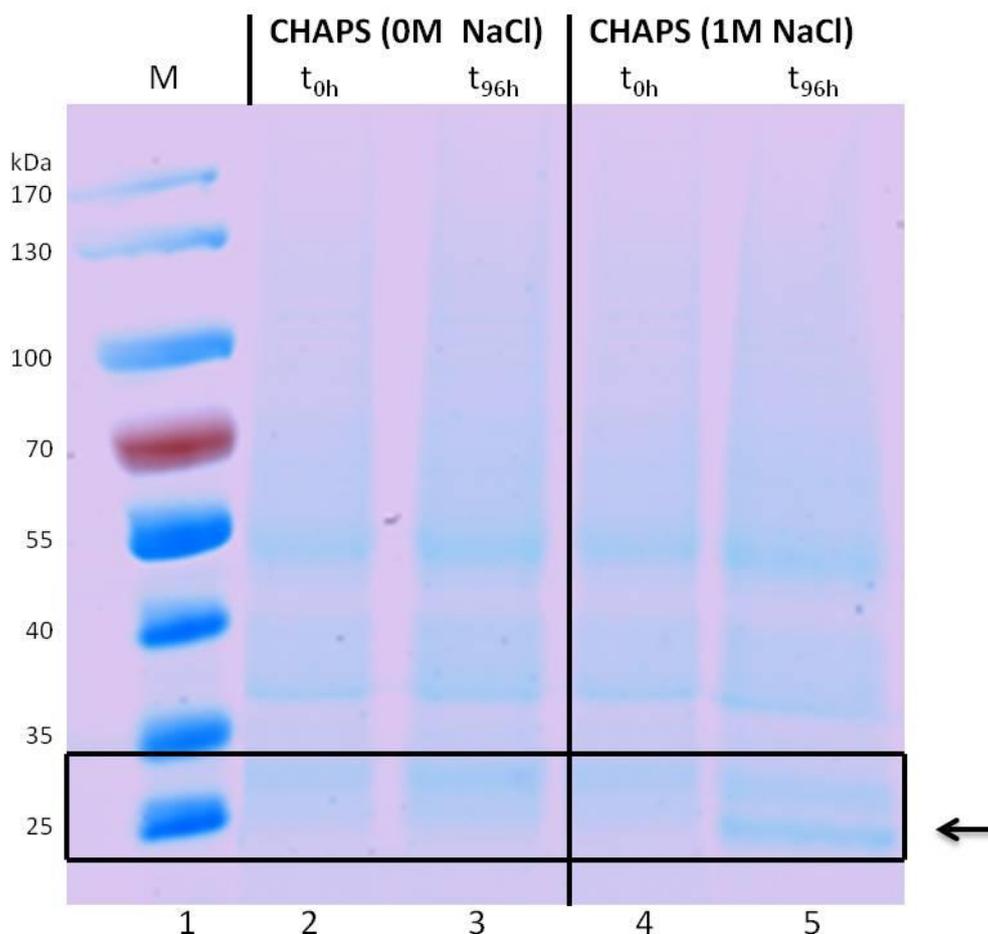


Abbildung 16: Einfluss der Ionenstärke auf die Renaturierung von BMP-4

Im Vergleich sieht man, dass der NaCl-freie CHAPS-Puffer kein Dimer erzeugt. Die Renaturierung wurde bei 10°C durchgeführt.

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass Natriumchlorid als Bestandteil des CHAPS-Puffers bei der Renaturierung von BMP-4, im Gegenteil zur Renaturierung von BMP-2 in CHES-Puffer, nicht vollständig weggelassen werden kann.

4.5.5 Vergleich der Kinetik von BMP-2 und BMP-4

In Kapitel 4.5.3 konnte gezeigt werden, dass die Darstellung von BMP-2- bzw. BMP-4-Dimeren unter Verwendung verschiedener Renaturierungspuffer möglich ist.

In weiterführenden Versuchen sollten anschließend Kinetiken der Dimerisierungen aufgenommen und miteinander verglichen werden. Dazu wurden Renaturierungsansätze der beiden Proteine in den beiden Puffern, CHES bzw. CHAPS, hergestellt. Von diesen 4 Ansätzen wurden im Abstand von 24 Stunden Proben genommen und diese mit Iodacetamid (IAA) behandelt (s. Anhang 6.4.8). Das IAA reagiert mit den freien Cysteinen. So wird eine Weiterreaktion mit den Disulfidbrücken (*Reshuffling*) unterdrückt. Insgesamt kann somit der Zustand der Cysteine zum Zeitpunkt der Probenahme fixiert werden. Daran schloss sich eine SDS-PAGE mit nachgelagerter quantitativer Analyse der Dimerisierung durch Densitometrie an.

Abbildung 17 zeigt exemplarisch eine PAGE der Kinetik. Aufgetragen sind in diesem Beispiel die 5 Renaturierungszeitpunkte von BMP-2 bzw. BMP-4 in CHAPS-Renaturierungspuffer. Die Analyse der Renaturierung wurde nach 96 h beendet, da in der Literatur [100] für diesen Zeitpunkt der Graph der Kinetik der Dimerisierung von BMP-2_{CHES} bereits deutlich abgeflacht ist.

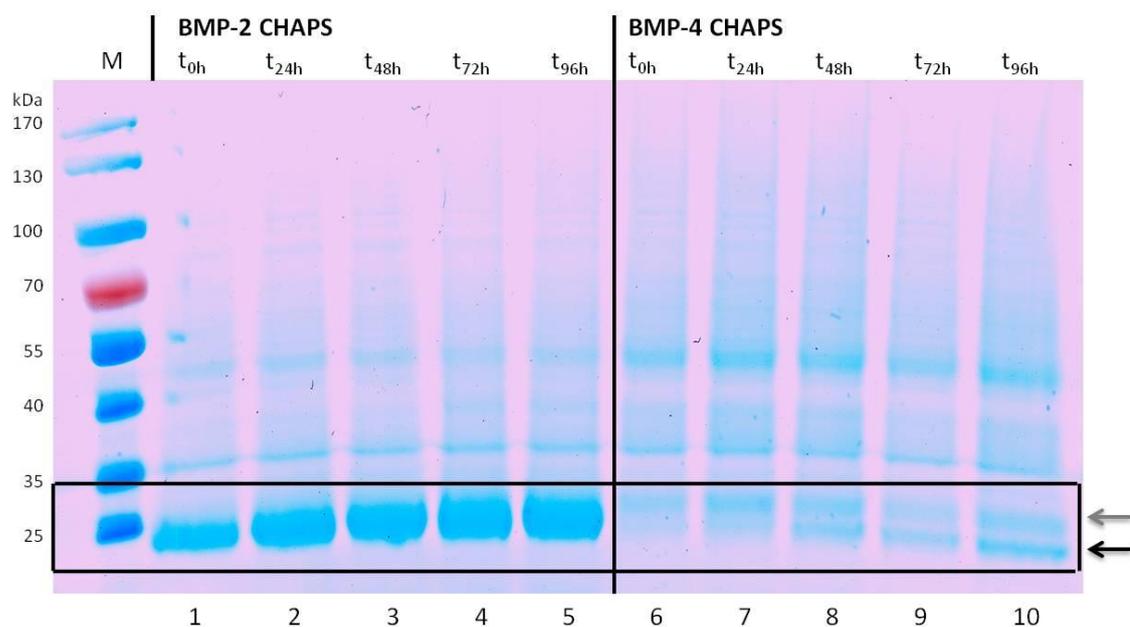


Abbildung 17: Exemplarische SDS-PAGE der CHAPS-Renaturierung (Detail-Gel CHAPS I).

In Abbildung 17 sind die Dimerbanden bei 26 kDa hervorgehoben. Auf den Bahnen 1 (B 1) bis B 5 sind die Proben von BMP-2 in CHAPS-Puffer zu den Zeitpunkten t_0 bis t_{96} aufgetragen. Auf den Bahnen 6-10 analog die Proben von BMP-4 in CHAPS-Puffer. Für BMP-2 auf den Bahnen 2-5 ist zu erkennen, dass im zeitlichen Verlauf die Dimerbande an Intensität zunimmt. (Bei der Bande auf B 1 handelt es sich nicht um ein Dimer, sondern ein Wirtszellprotein (vgl. hierzu auch Abbildung Abbildung 29)). Für die Bahnen 6-10 ist festzustellen, dass zu den ersten beiden Probezeitpunkten keine Dimerbande zu sehen ist, während der nächsten drei Probenzeitpunkte eine Dimerbande entsteht und deren Intensität im Verlauf zunimmt (Der schwarze Pfeil zeigt die Dimerbanden des BMP-4 an. Der graue Pfeil markiert ein Wirtszellprotein (vgl. Abbildung 15)).

Um die 4 Renaturierungsansätze auch quantitativ miteinander vergleichen zu können, wurden die Gele der Kinetiken densitometrisch ausgewertet. Die Auftragung derselben Proben sowohl auf Übersichts-Gelen (vgl. Abbildung 15 und Abbildung 28) als auch auf Detail-Gelen (vgl. Abbildung 17 und Abbildung 29 ff.) ermöglicht es, die 4 verschiedenen Ansätze miteinander zu vergleichen.

In Kapitel 4.5.3 wurde gezeigt, dass der höchste Dimerisierungsgrad unter Verwendung der Kombination BMP-2 und CHAPS erzielt wird. Um die verschiedenen Renaturierungsansätze miteinander vergleichen zu können, wurde daher die Intensität der entsprechenden Dimerbande bei t_{96h} als Bezugsgröße definiert und mit 100 Prozent gleichgesetzt. Die Einordnung aller anderen Dimerbanden erfolgte relativ hierzu gemäß ihrer Intensität. Insgesamt wurden für die Kinetiken jeweils zwei Renaturierungsansätze durchgeführt und verglichen.

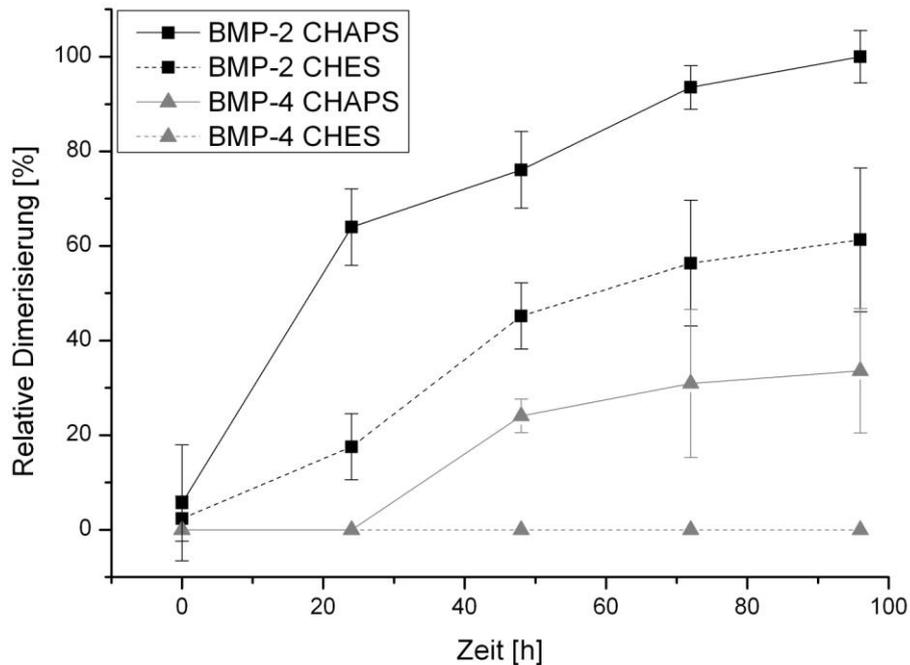


Abbildung 18: Relativer Vergleich der Renaturierungs-Kinetiken

Für den relativen Vergleich wurde die Intensität der Dimerbande von BMP-2_{CHAPS, t = 96h} als Bezugsgröße genommen und gleich 100 % definiert (vgl. Abbildung 15 und Abbildung 17). Die Einordnung aller anderen Dimerbanden erfolgte relativ hierzu gemäß ihrer Intensität. Insgesamt wurden für die Kinetiken jeweils zwei Renaturierungsansätze durchgeführt.

Abbildung 18 zeigt diesen relativen Vergleich der Renaturierungskinetiken. Die Dimerisierung von BMP-2_{CHAPS} erreicht bereits nach 24 h 64% ihres bzw. des globalen Maximums. Dieser Wert erhöht sich über die nächsten beiden Messpunkte auf 76 bzw. 94 % bevor er final 100 % erreicht.

Relativ dazu beträgt der Wert von BMP-2_{CHES} nach 24 h 18 % bevor er mit Zwischenstufen bei 45 und 56 % abschließend einen relativen Wert von 61 % erreicht.

Die Renaturierung von BMP-4_{CHAPS} liefert innerhalb der ersten 24 h keine Dimerbande. Nach 48 h ergibt die Analyse der Bande eine relative Dimerisierung von 24 %. Für die nächsten beiden Messpunkte ergeben sich Werte von 31 bzw. 34 %. Es sei an dieser Stelle nochmal darauf hingewiesen, dass die Analyse dieser Bande per MALDI-MS auch andere Proteine als BMP-4 ergab. Die tatsächlichen Werte sind also nochmals niedriger.

Für BMP-4_{CHES} konnte, wie bereits erwähnt, über die gesamte Dauer keine Dimerbildung festgestellt werden.

Um die 3 Kinetiken besser untereinander, als jeweils Ganzes, vergleichen zu können, wurden die Messwerte der 3 Messreihen zu ihrem jeweiligen Maximum in Bezug

gesetzt. Dies stellt eine Normierung dar; im Folgenden wird daher der Begriff „Normierte Dimerisierung“ verwendet.

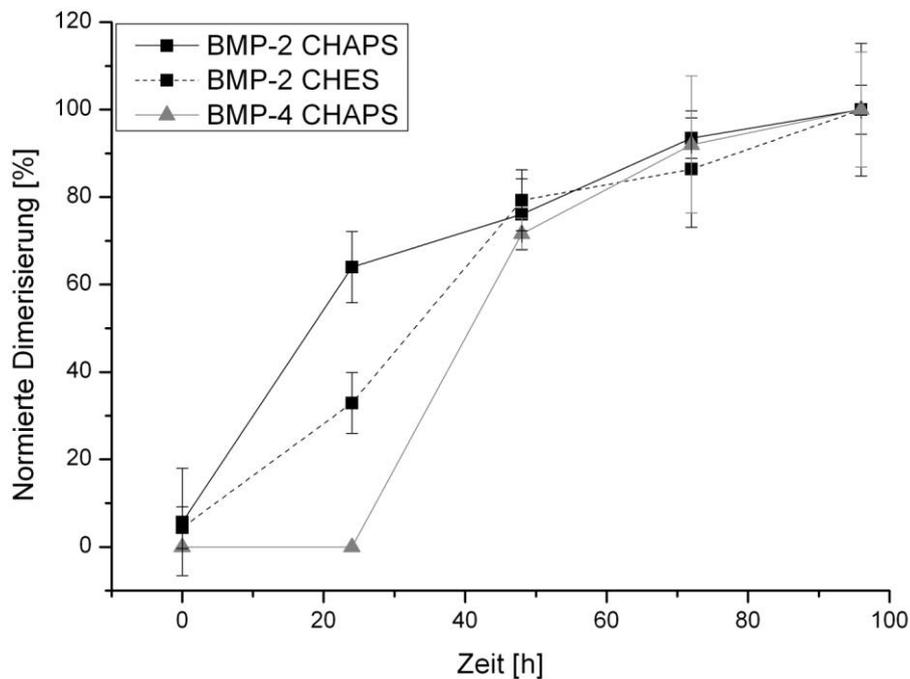


Abbildung 19: Normierte Dimerisierung-Kinetiken

Um die 3 Kinetiken besser untereinander, als jeweils Ganzes, vergleichen zu können, wurden die Messwerte der 3 Messreihen zu ihrem jeweiligen Maximum in Bezug gesetzt. Dies stellt eine Normierung dar; daher wird der Begriff „Normierte Dimerisierung“ verwendet.

Abbildung 19 zeigt die normierten Kinetiken. Es fällt auf, dass sich die 3 Kinetiken in ihrem Verlauf nach 48 h – im Rahmen der Genauigkeit der densitometrischen Analyse – nahezu gleichen, während sie sich in der ersten Hälfte deutlich unterscheiden. Für die Zeitpunkte $t_{48\text{h}}$ und $t_{72\text{h}}$ liegen die Werte der normierten Dimerisierung zwischen 72 und 79 % bzw. 86 und 94 %. Bei t_{24} hingegen wird für BMP-4_{CHAPS} nach 24 h keinerlei Dimerbande gefunden, während BMP-2_{CHES} eine normierte Renaturierung von 33 % erreicht. Für BMP-2_{CHAPS} ergeben sich obige 64 %.

Der Graph von BMP-4_{CHAPS} zeigt somit einen sigmoidalen Verlauf, der Graph von BMP-2_{CHAPS} hingegen zeigt den Verlauf einer Sättigungskurve; der Graph von BMP-2_{CHES} befindet sich dazwischen.

Tabelle 4: Normierte Dimerisierung von BMP-2_{CHES}

Normierte Dimerisierung [%]	t ₀	t ₂₄	t ₄₈	t ₇₂	t ₉₆
BMP-2 _{CHES} ; eigen	0	33	79	86	100
BMP-2 _{CHES} ; Literatur*	0	35	74	91	100

*= [100], eigene Berechnung

In Tabelle 4 ist die normierte Dimerisierung gegen Literaturwerte aufgetragen. Es ist gut zu erkennen, dass die ermittelten Werte den Literaturwerten sehr ähneln.

Die Daten von BMP-2_{CHES} konnten somit gut mit Literaturwerten zur Deckung gebracht werden; für die anderen Kinetiken konnten keine quantitativen Vergleichsdaten, sondern lediglich grobe Beschreibungen [75] gefunden werden.

Fazit des Kapitels

Die Renaturierung der beiden Cytokine BMP-2 und BMP-4 konnte erfolgreich gezeigt werden. Ausgehend von einem Renaturierungspuffer mit dem Aggregationshemmer CHES konnte demonstriert werden, dass dieser nur für BMP-2 geeignet ist. Für BMP-4 konnte durch Substitution mit dem Gallensäurederivat CHAPS BMP-4-Dimer dargestellt werden. Der Einsatz des letzteren führte auch zu höheren Ausbeuten an BMP-2-Dimer im Vergleich zum CHES-Renaturierungspuffer. Das Weglassen von NaCl im CHAPS-Renaturierungspuffer hatte zur Folge, dass kein BMP-4-Dimer gebildet wurde.

Durch geeignete Probenahme war es möglich, vergleichende Kinetiken für die vier verschiedenen Renaturierungsansätze aufzunehmen. Dabei konnte insgesamt festgestellt werden, dass sich die Kinetiken relativ nur in den ersten 24 h unterscheiden. Darüber hinaus konnten Teile der ermittelten Werte gut mit Literaturwerten zur Deckung gebracht werden.

4.6 Aufreinigung von BMP-X

Für die Abtrennung eines Zielmoleküls aus einem Herstellungsvorgang, der Aufreinigung, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Für Proteine ist die Flüssigchromatographie (FPLC, *fast protein liquid chromatography*) ein übliches Verfahren. Dabei kommen unterschiedliche Varianten zum Einsatz, die alle die Aufkonzentrierung des Zielmoleküls bezwecken. Beispiele dieser Varianten sind die Ionenaustausch-, die Größenausschluss oder auch die Affinitäts-Chromatographie. Bei Letzterer wird eine spezifische Wechselwirkung zwischen der stationären Phase und dem Zielmolekül ausgenutzt. Für BMP-2 konnte der produktive Einsatz von

Heparin-Affinitätschromatographie zu Aufreinigungszwecken bereits gezeigt werden [87].

4.6.1 BMP-2 Heparin-Chromatographie

In Kapitel 4.5.3 konnte gezeigt werden, dass sich aus dem in *E. coli* hergestellten BMP-2-Monomer sowohl mit Hilfe des CHES- als auch des CHAPS-Renaturierungspuffers BMP-2-Dimer erzeugen lässt. Um die biologische Aktivität dieses Cytokins testen zu können, muss es zunächst aufgereinigt werden. Ruppert *et al.* [91] konnten zeigen, dass Heparin als stationäre Phase einer Affinitätschromatographie effektiv für die Aufreinigung von BMP-2-Dimer genutzt werden kann. Für die Löslichkeit des Proteins während der Chromatographie sind hochmolare Konzentrationen (6 M) an Harnstoff erforderlich. Vicik *et al.* [76] konnten zeigen, dass CHES-Puffer (1 M NaCl) für die Dimerisierung von BMP-2 verwendet werden kann; Vallejo *et al.* [97] konnten in weiterführenden Experimenten demonstrieren, dass auch mit NaCl-freiem CHES-Puffer (0 M NaCl) Dimere erzeugt werden können.

Ferner konnten sie zeigen, dass die Leitfähigkeit der mobilen Phase während der Affinitätschromatographie $\leq 20\text{mS/cm}$ betragen muss, damit es zu einer optimalen Bindung von BMP-2-Dimer an Heparin kommt, da die Affinität auch auf der elektrostatischen Wechselwirkungen mit den Sulfateestern des Heparins basiert. Diese Leitfähigkeit für eine direkte Aufreinigung von BMP-2-Dimer wurde dort durch eine 1:1-Verdünnung von Renaturierungsansatz mit 8 M Harnstoff erreicht, wodurch die Dialyse zu Entfernung des NaCl entfallen konnte.

Aufgrund der Einfachheit der Prozedur wurde im Folgenden der Ansatz mit modifiziertem CHES-Puffer ohne NaCl verwendet, um BMP-2-Dimer für den anschließenden Bioaktivitätstest aufzureinigen.

Die NaCl-freie CHES-Renaturierungslösung wurde 1:1 mit 8 M Harnstoff verdünnt und unmittelbar mit einer Heparinsäule (HiTrap™ Heparin HP, 1 ml, GE, Uppsala, Schweden) aufgereinigt. Diese Aufreinigung ermöglicht die selektive Abtrennung des Dimers von Monomer und Wirtszellproteinen in nur einem chromatographischen Schritt. Dies wird über eine zweistufige Elution mit 300 bzw. 500 mM NaCl-Puffer bewerkstelligt. Da das Dimer im Vergleich zum Monomer deutlich stärker an das Heparin gebunden ist, sind viel höhere Salzkonzentrationen von Nöten, um es zu eluieren.

Die anfängliche Leitfähigkeit des CHES-Renaturierungspuffers betrug etwa 38 mS/cm. Durch die Verdünnung konnte die Leitfähigkeit auf etwa 25 mS/cm gesenkt werden, womit die Leitfähigkeit im anwendbaren Bereich für die Chromatographie lag [97]. Der Beladungspuffer enthielt 4 M Urea und wurde auf pH 8,0 eingestellt.

Die Elution der Proteine erfolgte in zwei Stufen mit Puffern unterschiedlicher Leitfähigkeit. Zunächst wurden das Monomer und einzelne Wirtszellproteine mittels eines 300 mM NaCl-Elutionspuffers von der Säule eluiert. Anschließend konnte das Dimer mit einer Erhöhung auf 500 mM NaCl selektiv von der Säule gelöst werden.

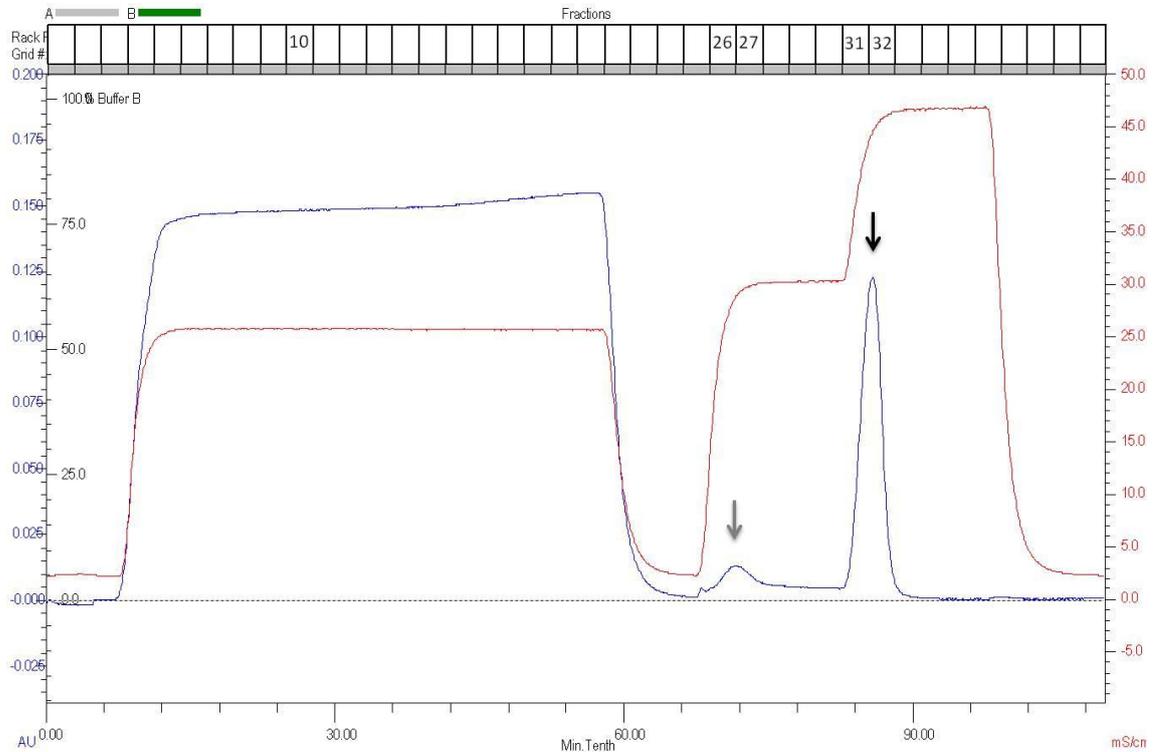


Abbildung 20: Chromatogramm der BMP-2 Aufreinigung mittels Heparinaffinitäts-Chromatographie.

Gezeigt sind die Verläufe der Leitfähigkeit [mS/cm] und der UV-Absorbtion bei 280 nm [AU]. Der graue Pfeil kennzeichnet den Elutionspeak des BMP-2-Monomers, der schwarze Pfeil den Elutionspeak des BMP-2-Dimers. Der Verlauf der Leitfähigkeit zeigt die Stufen-Elutionsstrategie an.

Abbildung 20 zeigt exemplarisch den Verlauf einer BMP-2-Heparin-Affinitätschromatographie. Nach der Beladungsphase, in der die Leitfähigkeit der verdünnten Renaturierungslösung von etwa 25 mS/cm zu erkennen ist, erfolgt die zweistufige Elution. Zunächst steigt die Leitfähigkeit auf etwa 30 mS/cm. Dies geht mit der Elution der Monomerfraktion einher (grauer Pfeil). Nach Erhöhung der Leitfähigkeit auf über 45 mS/cm eluiert auch die Dimerfraktion, was durch einen hohen, schmalen Peak im Chromatogramm zu erkennen ist (schwarzer Pfeil).

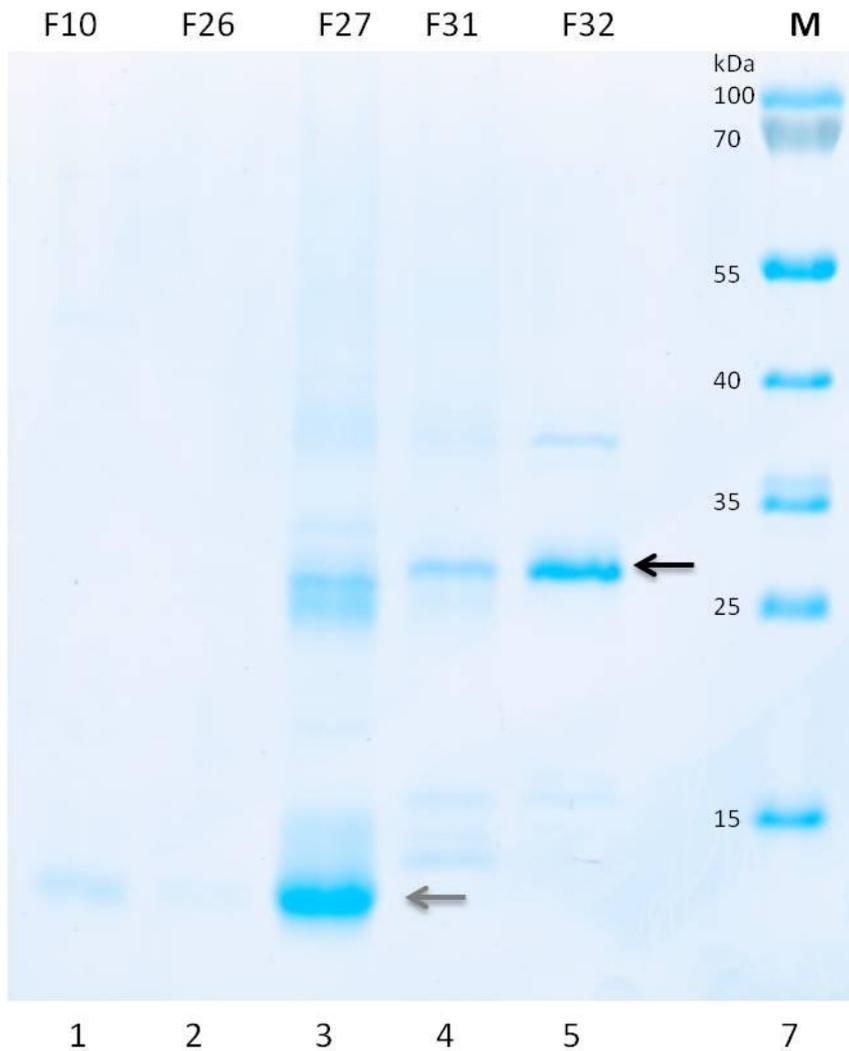


Abbildung 21: Ergebnis der BMP-2 Aufreinigung mittels Heparinaffinitätschromatographie.

Der CHES-Renaturierungsansatz wurde 1:1 mit 8 M Harstoff verdünnt und die Heparinsäule damit beladen. Anschließend erfolgte die zweistufige Elution mittels zweier, salzhaltiger Elutionspuffer (300 mM und 500 mM NaCl). Gezeigt sind eine Probe des Durchlaufs (Bahn 1) sowie der Monomerfraktion (Bahn 2 und 3; grauer Pfeil: Monomer) bzw. der Dimerfraktion (Bahn 4 und 5; schwarzer Pfeil: Dimer).

Die Analyse erfolgte durch eine SDS-PAGE (15 %-iges Gel, Kolloidale Coomassie Färbung). M=Protein-Marker Fermentas #26616; F=Fraktion; die Nummern beziehen sich auf jene des zugehörigen Chromatogramms aus Abbildung 20.

Abbildung 21 zeigt das Ergebnis der BMP-2-Chromatographie. Auf den Bahnen 2 und 3 sind die zugehörigen Fraktionen der Monomer-Elution dargestellt. Das Monomer mit einer Größe von 13 kDa wird durch den grauen Pfeil angezeigt. Die Dimer-Elution ist auf den Bahnen 4 und 5 aufgetragen. Das 26 kDa große Dimer ist gut zu erkennen und durch einen schwarzen Pfeil markiert.

Das genaue Versuchsprotokoll für die Aufreinigung ist im Anhang 6.4.9 beschrieben.

4.6.2 BMP-4 Heparin-Chromatographie

Aufgrund der großen Ähnlichkeit der beiden Cytokine BMP-2 und BMP-4 (s. Kapitel 4.1) und der Einfachheit der Aufreinigung von BMP-2-Dimer mittels Heparin-Chromatographie wurde versucht, diese Methode direkt auf die Aufreinigung von BMP-4-Dimer zu übertragen.

Allerdings konnte in den Kapiteln 4.5.3 und 4.5.4 gezeigt werden, dass weder die Renaturierung mittels CHES-Puffer noch mit CHAPS-Puffer ohne Zusatz von NaCl BMP-4-Dimer hervorbrachte.

In Folge dessen war es nötig, BMP-4 mit CHAPS-Puffer zu dimerisieren. Da die Chromatographie mit Heparin auch auf elektrostatischen Wechselwirkungen basiert, musste die Leitfähigkeit der CHAPS-NaCl-Renaturierungslösung mittels Dialyse herabgesetzt werden, um die Salzfracht des Puffers zu senken.

Die anfängliche Leitfähigkeit des CHAPS-Renaturierungspuffers betrug etwa 90 mS/cm. Per Dialyse gegen den Beladungspuffer konnte die Leitfähigkeit auf etwa 10 mS/cm gesenkt werden. Der Beladungspuffer enthielt 4 M Urea und wurde auf pH 8,0 eingestellt.

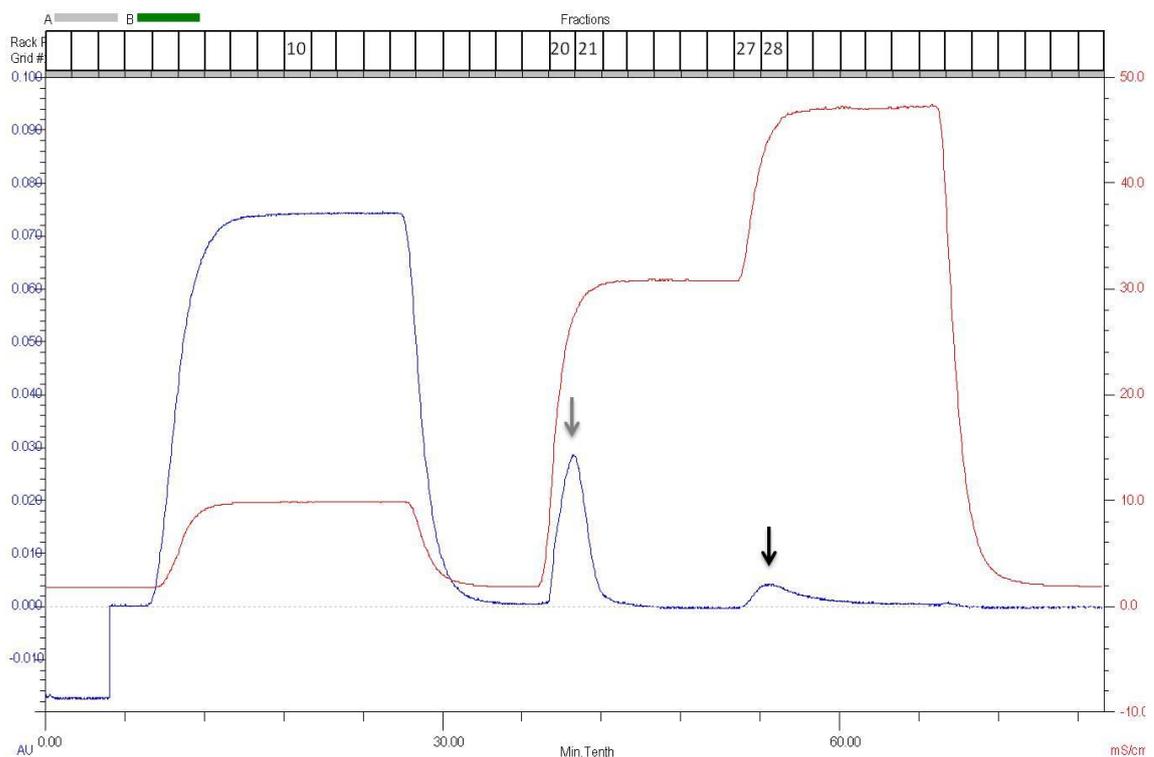


Abbildung 22: Chromatogramm der BMP-4 Aufreinigung mittels Heparinaffinitäts-Chromatographie.

Gezeigt sind die Verläufe der Leitfähigkeit [mS/cm] und der UV-Absorbtion bei 280 nm [AU]. Der graue Pfeil kennzeichnet den Elutionspeak des BMP-4-Monomers, der schwarze Pfeil den Elutionspeak eines Wirtszellproteins. Der Verlauf der Leitfähigkeit zeigt die Stufen-Elutionsstrategie an.

Die Elution der Proteine erfolgte, analog zu BMP-2 (4.6.1), mit einer zweistufigen Elutionsstrategie. Zunächst wurden das Monomer und einzelne Wirtszellproteine mittels eines 300 mM NaCl-Elutionspuffers von der Säule eluiert. Anschließend wurde versucht, ein etwaig an die Heparinsäule gebundenes, BMP-4-Dimer mit einer Erhöhung auf 500 mM NaCl selektiv von der Säule zu eluieren.

Abbildung 22 zeigt den Verlauf der BMP-4-Heparin-Affinitätschromatographie. Nach der Beladungsphase, in der die Leitfähigkeit der dialysierten Renaturierungslösung von etwa 10 mS/cm zu erkennen ist, erfolgt die zweistufige Elution. Zunächst steigt die Leitfähigkeit auf etwa 30 mS/cm. Dies führt zur Elution der Monomerfraktion in Form eines hohen, schmalen Peaks (grauer Pfeil). Nach Erhöhung der Leitfähigkeit auf über 45 mS/cm zeigt ein kleiner Peak die Elution einer weiteren Proteinfraction an (schwarzer Pfeil). Vorweggenommen sei an dieser Stelle, dass sich durch anschließende Untersuchungen herausstellte, dass es sich bei dem Protein nicht um BMP-4-Dimer, sondern um ein Wirtszellprotein, ein 30-S-ribosomales Bindeprotein, von *E. coli* handelt.

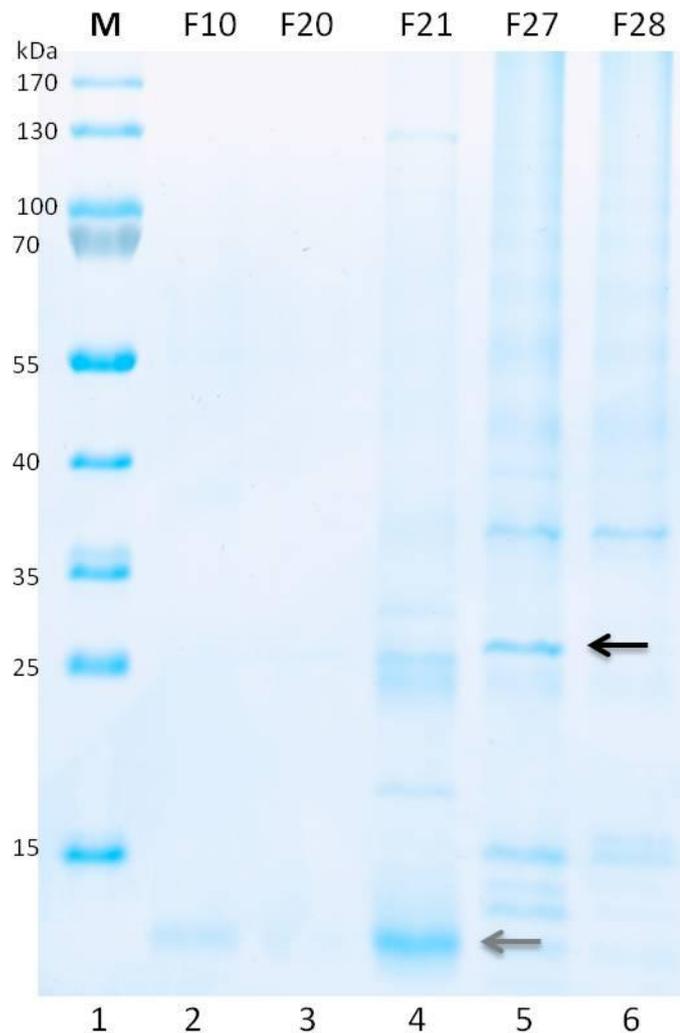


Abbildung 23: Ergebnis der BMP-4 Aufreinigung mittels Heparinaffinitätschromatographie.

Die Heparinsäule wurde mit der dialysierten CHAPS-Lösung beladen, anschließend erfolgte die zweistufige Elution mittels zweier, salzhaltiger Puffer (300 mM und 500 mM NaCl). Gezeigt sind eine Probe des Durchlaufs (Bahn 2) sowie der Monomerfraktion (Bahn 3 und 4; Monomer: grauer Pfeil) bzw. der zweiten Elutionsfraktion (Bahn 5 und 6; schwarzer Pfeil: 30-S-ribosomales Bindeprotein).

Die Analyse erfolgte durch eine SDS-PAGE (15 %-iges Gel, Kolloidale Coomassie Färbung). M=Protein-Marker Fermentas #26616; F=Fraktion; die Nummern beziehen sich auf jene des zugehörigen Chromatogramms aus Abbildung 22.

Abbildung 23 zeigt das Ergebnis der BMP-4-Chromatographie. Auf den Bahnen 3 und 4 sind die zugehörigen Fraktionen der Monomer-Elution dargestellt. Das Monomer mit einer Größe von 13 kDa wird durch den grauen Pfeil angezeigt.

Proben der Elution der 500 mM NaCl-Stufe (Fraktionen 27 und 28) sind auf den Bahnen 5 und 6 aufgetragen. Die mit einem schwarzen Pfeil markierte Bande bei 26 kDa wurde zwecks Identitätsbestimmung weiter untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass es nicht das vermutete BMP-4-Dimer ist; es handelt sich dabei um ein

30S-ribosomales Bindeprotein aus *E. coli*, also ein Protein aus der Gruppe der Wirtszellproteine. Die Feststellung der Identität erfolgte mit MALDI-MS (6.4.13). Das genaue Versuchsprotokoll für dieses Experiment ist im Anhang 6.4.9 beschrieben.

4.6.3 Fazit des Kapitels

Für BMP-2 konnte gezeigt werden, dass die selektive Aufreinigung des Dimers in einem einzigen chromatographischen Schritt möglich ist.

Unter Verwendung eines NaCl-freien CHES-Puffers war es dabei möglich, eine andernfalls notwendige Dialyse zu umgehen und somit eine direkte Aufreinigung des Dimers mittels Heparin-Affinitätschromatographie zu ermöglichen. Dadurch konnte das Cytokin in hoher Reinheit (91%; s. Kapitel 4.7) für anschließende Bioaktivitätstest bereitgestellt und der Herstellungsprozess für weiterführende Untersuchungen etabliert werden.

Ein weiteres Ziel war es zu klären, ob sich das Aufreinigungsprotokoll für BMP-2 direkt auf das renaturierte BMP-4-Dimer übertragen lässt. Als Ergebnis kann festgehalten werden, dass eine direkte Übertragung des Protokolls nicht zur gewünschten Aufreinigung des BMP-4-Dimers führt.

Die Elutionsstrategie mit zwei Stufen steigender Leitfähigkeit brachte zwei verschiedene Fraktionen hervor. Zum einen konnte das BMP-4-Monomer eluiert werden. Zum anderen wurde ein 30S-ribosomales Bindeprotein aus *E. coli* von der Säule gewaschen. Das durch vorangehende Analysen detektierte BMP-4-Dimer wurde in keiner Fraktion beobachtet.

Eine mögliche Erklärung hierfür könnte im isoelektrischen Punkt (pI) des BMP-4 begründet sein. Der pI von BMP-4 liegt bei 7,6. Im Gegensatz hierzu liegt der pI von BMP-2 bei 8,2. Da die Chromatographie bei pH 8,0 durchgeführt wurde, ist die Ladung des BMP-2 positiv und somit günstig für eine Bindung an Heparin. Demgegenüber ist BMP-4 bei pH 8,0 negativ geladen und diese negative Proteinladung kann zu Abstoßung mit den negativ geladenen Heparinsulfatesterne führen.

Allerdings werden diese Überlegungen dadurch entkräftet, dass das BMP-4-Monomer offensichtlich an das Heparin gebunden hat. Gleichwohl ließe sich diese Bindung durch reine Affinität begründen. Die Existenz einer solchen Heparin-Bindestelle im BMP-4 wird in der Literatur durch den Vergleich der basischen Aminosäuren in BMP-2 (die dort als Heparinbindestelle deklariert werden) und BMP-4 aufgezeigt [91].

Insgesamt könnte durch weitere Untersuchungen und z. B. der Modifikation des pH-Werts eine Möglichkeit gefunden werden, das erzeugte BMP-4-Dimer mittels Heparin-Affinitätschromatographie aufzureinigen. Auch wären prinzipiell weitere alternative Entwicklungen durch Einsatz von z. B. Ionenaustauschersäulen oder -membranen denkbar.

4.7 Biologische Testung

4.7.1 Qualitative und quantitative Analyse

In Kapitel 4.6.1 konnte gezeigt werden, wie sich das renaturierte BMP-2 mit Hilfe von Affinitätschromatographie aufreinigen lässt. An diese Aufreinigung schließt sich die Finalisierung des Zielproteins an (vgl. Abbildung 4). Der Block Finalisierung umfasst die Arbeitsschritte Aufkonzentrierung, die analytische Endotoxinbestimmung und die Sterilfiltration.

Das BMP-2 lag nach der Aufreinigung in 4-M-Harnstoff-Lösung vor. Für die finale Testung der Bioaktivität und eine mittelfristige Lagerung war die Umpufferung in 50 mM MES-Puffer (2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure) angezeigt [97]. Um den Pufferwechsel möglichst schonend zu gestalten, wurde das BMP-2 stufenweise dialysiert (siehe Anhang 6.4.10). Erst danach wurde das Protein mit Konzentratoren auf ≥ 500 mg/mL eingengt. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte dabei unter Anwendung des Lambert-Beerschen-Gesetzes mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von 37720 L/Mol/cm [87] (s. 6.4.11).

Zur weiteren Charakterisierung des BMP-2 wurde der Gehalt an Endotoxinen mittels LAL-Test zu einem Wert von 2,85 EU/mL bzw. 0,285 ng/mL bestimmt. Endotoxine sind Lipopolysaccharide, die unter anderem in der äußeren Zellmembran von *E. coli* vorkommen und bei Überschreitung bestimmter Konzentrationen toxisch auf eukaryotische Zellen wirken können. Allerdings sind diese Endotoxin-Grenzwerte mit 5-500 $\mu\text{g/mL}$ [102] um mehrere Größenordnungen höher als die für dieses BMP-2 festgestellten. Bezüglich dieses Parameters ist das hergestellte BMP-2 also für die Zellen des Bioaktivitätstests unbedenklich.

An die Endotoxinbestimmung schloss sich die Sterilfiltration mit 0,22 μm Filter an. Die finale Proteinkonzentration und Reinheit wurden bestimmt. Die densitometrische Bestimmung der Reinheit ergab einen Wert von 91 %. Damit liegt die Reinheit in einem vergleichbaren Bereich zu bekannten Präparationen (≥ 95 % [97]; Anhang 6.4.7).

4.7.2 C2C12-Zellen als Testsystem

Zur Beurteilung der biologischen Aktivität des in *E. coli* produzierten BMP-2 wurde das Cytokin mit Hilfe eines geeigneten biologischen Systems untersucht. Neben einer Reihe weiterer potentieller Zelltypen sind aufgrund der physiologischen Funktionen von BMP-2 *in vivo* C2C12-Zellen als Testsystem geeignet.

Bei C2C12-Zellen handelt es sich um eine myoblastische Zelllinie. Myoblasten sind spindelförmige Vorläuferzellen der Skelettmuskelfasern. C2C12-Zellen differenzieren schnell und produzieren charakteristische Muskelzellproteine, während sie Myotuben ausbilden. Diese kontraktile Myotuben entstehen durch einen, von fusogenen

Proteinen vermittelten Zellzusammenschluss; ein Myotubus ist die vielzellige Übergangsstufe zwischen Myoblasten und Muskelzellen [103].

Die Behandlung von C2C12-Zellen mit BMP-2 verändert das Differenzierungsmuster in Richtung einer osteoblastischen Zelle und induziert dabei u. a. die Expression von Alkalischen Phosphatasen. Die Aktivität dieses Enzyms kann sich somit für die Prüfung der biologischen Aktivität zu Nutze gemacht werden.

4.7.3 Alkaline Phosphatase Aktivitäts Assay / EC_{50} -Bestimmung

Die Testung der Bioaktivität des BMP-2 erfolgte mit einem Nachweis der Aktivität von Alkalischer Phosphatase (ALP). Als Maß für die biologische Aktivität wurde der EC_{50} -Wert des Zytokins bestimmt. Die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) ist die Konzentration, bei der die halbmaximale Wirkung auf ein adäquates Testsystem festgestellt wird. Der Test wurde von einem Projektpartner durchgeführt (6.4.12).

Das BMP-2 wurde verdünnt und in Konzentrationen im Bereich von 1 – 1000 ng/mL eingesetzt. Zum Vergleich wurde das WHO-Referenz-Reagenz NIBSC 93/574 verwendet. Hierbei handelt es sich um rhBMP-2 aus CHO-Zellen. Die C2C12-Zellen wurden 5 Tage mit dem Cytokin inkubiert und schließlich lysiert. Darauf erfolgte die Messung der ALP-Aktivität. Als Substrat fand hierbei *para*-Nitrophenylphosphat (p-NPP) Verwendung und die Analyse wurde photometrisch bei 405 nm durchgeführt. (siehe Anhang 6.4.12)

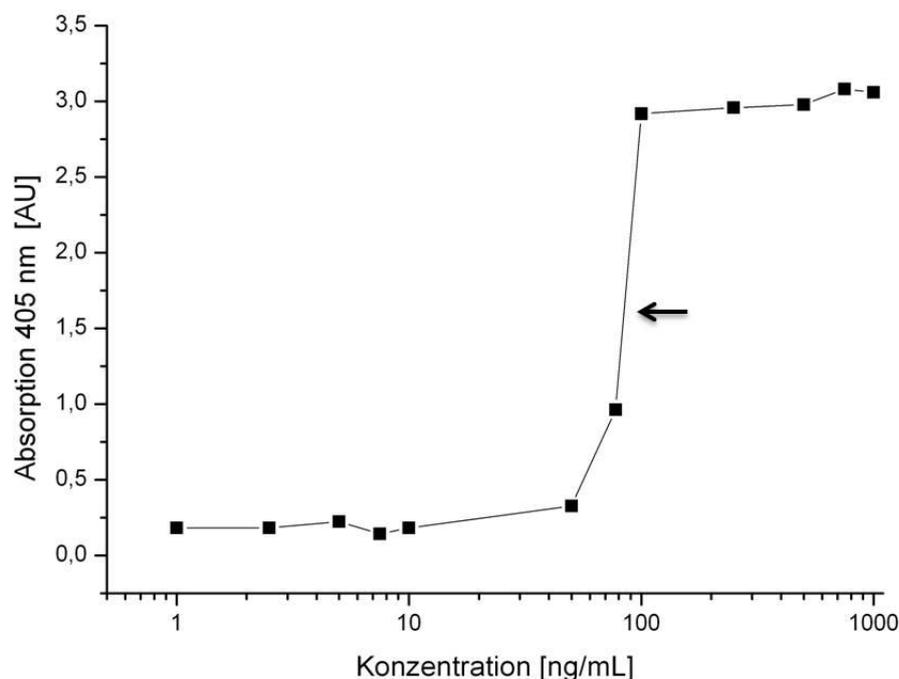


Abbildung 24: EC_{50} -Bestimmung von BMP-2.
Der EC_{50} -Wert ist durch einen Pfeil markiert.

Abbildung 24 zeigt für BMP-2 den typischen sigmoidalen Verlauf einer sog. Dosis-Wirkkurve. Der ermittelte EC_{50} -Wert [104] des in *E. coli* hergestellten und renaturierten BMP-2 beträgt 82 ng/mL. Damit liegt dieser Wert niedriger als der Wert der NIBSC-Referenz mit 105 ng/mL [105]. Somit besitzt das untersuchte BMP-2 eine höhere biologische Aktivität als die Referenz. Gleichwohl liegen die Messwerte in einem ähnlichen Bereich.

Der Nachweis der biologischen Aktivität des BMP-2 erbringt den finalen Beweis, dass das Cytokin als biologisch aktives Dimer dargestellt worden ist. Somit macht der Aktivitätstest nicht nur deutlich, dass der letzte Schritt der Kette erfolgreich gezeigt werden konnte, sondern insbesondere auch, dass der gesamte Prozess der Herstellung von rekombinantem, humanem BMP-2 aus *E. coli* erfolgreich demonstriert werden konnte.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Herstellung rekombinanter Proteine ist innerhalb der Biotechnologie ein bedeutender Bereich. Bei ihrer Produktion ist die Verwendung des Bakteriums *Escherichia coli* (*E. coli*) weit verbreitet. Die Vorteile dieses Produktionsorganismus liegen in der hohen Produktivität der Zellen und der Einfachheit der Kultivierungsbedingungen. Nachteilig daran ist, dass *E. coli* bei bestimmten Proteinen nicht in der Lage ist, die wirtfremden Proteine in ihrer biologisch aktiven Form zu erzeugen. Insbesondere fehlende Glykosilierungen aber auch nicht ausgebildete Disulfidbrücken oder weitere Modifikationen führen zu zunächst bioinaktiven Proteinen. Die Verwendung von alternativen Expressionssystemen hat meist u. a. niedrige Ausbeuten zum Nachteil. Mit *E. coli* können bei Überexpression große Mengen an Protein in hoher Reinheit in Form von unlöslichen *Inclusion Bodies* (IB) erhalten werden. Dennoch macht der Einsatz dieses bakteriellen Produzenten eine nachgelagerte Renaturierung der Proteine notwendig.

Die vorliegende Arbeit verfolgte zwei Ziele. Zum einen sollte die Produktion von bioaktivem BMP-2 aus IB realisiert werden. Zum anderen sollte untersucht werden, ob die existierende Methode zur Herstellung von BMP-2 auf das nahverwandte Cytokin BMP-4 übertragbar ist. Im Anschluss sollten die Verfahren miteinander verglichen werden.

Beide Cytokine aus der Familie der knochenmorphogenetischen Proteine (BMPs) spielen eine wichtige Rolle im Zuge der Osteo- und Chondrogenese und stellen somit einen wichtigen Gegenstand im Rahmen der medizinischen Forschung dar.

Das Ziel der Herstellung von bioaktivem BMP-2 wurde erreicht. Die gelungene Darstellung von dimerem BMP-4 aus *E. coli* konnten im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich demonstriert werden.

Die Kultivierung der beiden Zielproteine und eine Strategie für die Aufreinigung werden in dieser Arbeit gezeigt. Es wurden jeweils zwei verschiedene Konstrukte (pET-9- und pET-24-Vektor im *E. coli*-Stamm BL21(DE3)) eingesetzt und miteinander verglichen. Im Analysenmaßstab unter Verwendung von komplexem LB- und definiertem Autoinduktion-Medium wurde das Ziel der Produktion des Cytokins als biologisch inaktives Monomer in Form von unlöslichen *Inclusion Bodies* in hoher Reinheit (~80%; densitometrisch per SDS-PAGE) erreicht.

Danach konnte im Bioreaktor Material für die Renaturierung, also die Erzeugung des biologisch aktiven Homodimers, bereit gestellt werden. Die ausgewählten Konstrukte bildeten ausreichende Produktmengen. Zur Produktion wurde jeweils eine Bioreaktorkultivierung in einem zweckdienlichen, definierten Autoinduktions-Medium

im 10-L-Maßstab durchgeführt. Somit konnte eine Methode etabliert werden, mit der auf einfachem und reproduzierbarem Wege die Herstellung der Cytokine in ausreichend großen Mengen durchgeführt werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Methoden zur Erzeugung von Homodimeren beider Cytokine entwickelt, etabliert und verglichen. Ausgehend von einem für BMP-2 beschriebenen Renaturierungspuffer (mit Taurinderivat CHES) wurde ein modifizierter Renaturierungspuffer (mit Gallensäurederivat CHAPS) zur Darstellung von BMP-4-Dimer erarbeitet.

Mit dem CHAPS-Puffer konnte ein deutlich höherer Dimerisierungsgrad bzgl. BMP-2 gezeigt werden. Die anfängliche Annahme der Anwendbarkeit des CHES-Puffers für die Dimerisierung von BMP-4 hingegen konnte nicht bestätigt werden; auf diesem Weg konnte kein BMP-4-Dimer erzeugt werden. Die Renaturierung von BMP-4 mit dem CHAPS-Puffer erzeugte hingegen BMP-4-Dimer. Allerdings war die Ausbeute im Vergleich zu BMP-2 sehr viel geringer. Der Identitätsnachweis beider Cytokine wurde mittels MALDI-TOF-MS erbracht.

Die Kinetiken der Dimerisierungen unterschieden sich nur in der Anfangsphase (bis 24 h), danach zeigten sie einen sehr ähnlichen Verlauf. Für die Dimerbildung von BMP-4 konnte, entgegen dem nahverwandten BMP-2 in CHES-Puffer, die Notwendigkeit der Zugabe von Natriumchlorid zum CHAPS-Puffer (Renaturierungstemperatur 10 °C) gezeigt werden.

Eine Aufreinigung des BMP-2 konnte in Zuge dieser Arbeit im Labormaßstab etabliert werden. Hierbei kam eine Heparinaffinitätsäule an einer FPLC-Anlage zum Einsatz. Durch Anwendung des einstufigen Aufreinigungsprozesses konnte das Dimer erfolgreich und in hoher Reinheit (91%) von BMP-2 Monomer und Wirtszellproteinen getrennt werden. Somit stand das Cytokin zur Verfügung, um seine biologische Aktivität zu testen.

Aufgrund der hohen Homologie von BMP-4 zu BMP-2 und dem Postulat einer Heparinbindestelle [91] wurde versucht, die Aufreinigungsstrategie auch auf das BMP-4 Dimer zu übertragen. Dabei kam es zwar zu einer Bindung des Monomers an die Säule, jedoch konnte kein BMP-4 Dimer gebunden und eluiert werden.

Bei der Untersuchung der Übertragbarkeit der Methode auf BMP-4 wurden also folgende Beobachtungen gemacht. Erstens konnte unter Verwendung von CHES-Renaturierungspuffer kein BMP-4-Dimer nachgewiesen werden. Zweitens kann der Wechsel zu CHAPS-Puffer zwar BMP-4-Dimer hervorbringen, allerdings sind die Ausbeuten gering. Drittens ist die bequeme, einstufige Heparinsäulenchromatographie von BMP-2 nicht direkt auf das erhaltene BMP-4 übertragbar.

Grundsätzlich sollte jedoch die Möglichkeit bestehen, BMP-4 Dimer mittels Heparinaffinitätschromatographie aufzureinigen. Allerdings macht dieser Ansatz weitere Untersuchungen nötig: Zunächst müsste die Reinigungsstrategie so lange modifiziert werden, bis geeignete Bedingungen gefunden sind, bei denen das BMP-4 Dimer an die Heparinsäule bindet. Eine bedeutsame dieser Bedingungen ist die Leitfähigkeit der mobilen Phase. Sie muss sehr niedrig sein, da die Wechselwirkungen mit Heparin auch auf elektrostatischen Kräften beruhen. Dies wiederum zeigt Entwicklungsbedarf für den Renaturierungspuffer auf. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit einem natriumchloridfreien CHAPS-Renaturierungspuffer kein BMP-4 Dimer erzeugt werden kann. Eine möglichst niedrige Salzkonzentration, die dennoch BMP-4 Dimer erzeugt, wäre also wünschenswert. Des Weiteren könnte eine andere Pufferzusammensetzung einen grundlegend anderen Zugang zu BMP-4 Dimer ermöglichen; als Beispiel sei hier die Verwendung von Arginin genannt. Es konnte gezeigt werden, dass Arginin in den Renaturierungspuffern verschiedener Cystinknotenproteine (z. B. BMP-2) den Aggregationssuppressor CHES ersetzen kann [97].

Schließlich könnten auch andere Aufreinigungsarten zum Einsatz kommen. Beispielsweise ließe sich das BMP-Dimer prinzipiell, vor allem im kommerziellen Maßstab, auch mit reinen Ionentauschern aufreinigen. Dies ist insofern interessant, als dass eine Aufreinigung mit Heparin grundlegende Herausforderungen bei der Zulassung mit sich bringt. Da Heparin aus Schweinemastdarmzellen gewonnen wird, werden erhöhte Anforderungen bzgl. der Validierung gestellt. Insbesondere Virenlast und allergene Proteine spielen hierbei eine Rolle. Die Etablierung von Methoden auf Basis von Ionentauschersäulen oder Membranadsorbentien als *animal component free process* ist vor dem Hintergrund der industriellen Herstellung somit zu bedenken.

Die biologische Aktivität des aufgereinigten BMP-2 konnte deutlich demonstriert werden. Dabei wurden osteoinduktive Eigenschaften des BMP-2 auf die myoblastische Zelllinie C2C12 ausgenutzt. Im Rahmen der durchgeführten Aktivitätstests zeigte das in *E. coli* hergestellte BMP-2 mit 82 ng/mL sogar eine geringere mittlere effektive Konzentration (EC_{50}), und somit eine höhere Aktivität, als ein kommerzieller Standard aus CHO-Zellen mit einer EC_{50} von 105 ng/ml.

Es existieren mehrere Möglichkeiten, das dimere Cytokin BMP-4 rekombinant herzustellen. Der Bedarf an BMP-4 wird gegenwärtig größtenteils über die Herstellung in Säugerzellkulturen gedeckt.

Zwar existieren wenige Patent(-anträge) und Veröffentlichungen zur alternativen Herstellung dieses Proteins. Dennoch finden diese Verfahren aufgrund der geringen Ausbeuten keine praktische Anwendung. Daraus resultiert zugleich ein nur geringer Wissenstand bzgl. der Herstellung von BMP-4 insbesondere im produktionsrelevanten

Bakterium *E. coli*. Die beschriebenen Verfahren basieren auf einem *in vitro Refolding* des BMP-4 aus *Inclusion Bodies*.

Ziel dieser Arbeit war es u. a. zu prüfen, ob die Methode zur Herstellung von BMP-2 auf das strukturhomologe Schwesterprotein BMP-4 direkt übertragbar ist. Das negative Ergebnis kann als ein Beispiel dafür gelten, dass Strukturhomologie nicht notwendigerweise eine Garantie für die Übertragbarkeit von Prozessen ist. Viele Beispiele belegen, dass Proteine sich eher wie Individuen verhalten und für jedes Protein einzeln geprüft werden muss, ob und welche Einflussfaktoren für seine rekombinante Herstellung geeignet sind. Beispielsweise sind für die Darstellung von GDF-5 ganz andere Parameter entscheidend, als für das verwandte BMP-2 [98].

Neben den Substanzen, die für das *Refolding* ausschlaggebend sein können, kann auch die Refoldingstrategie einen Einfluss haben. Zum Beispiel ließe sich der Einfluss des *on-column-refolding* [73] für die Darstellung von rekombinanten Proteinen untersuchen. Es bleibt festzuhalten, dass die Produktion von *IB* einen nützlichen Zugang zur Gewinnung von rekombinanten Proteinen darstellt. Gleichwohl macht diese Methode oftmals eine anschließende, aufwändige Weiterbehandlung der Proteine erforderlich, um die erhaltenen Proteine in eine biologisch aktive Form zu überführen.

6 Anhang

6.1 Betreute Arbeiten

Bachelorarbeit Leonie Wittig, 2012

6.3 Zusätzliche experimentelle Daten

6.3.1 Weitere SDS-Gele

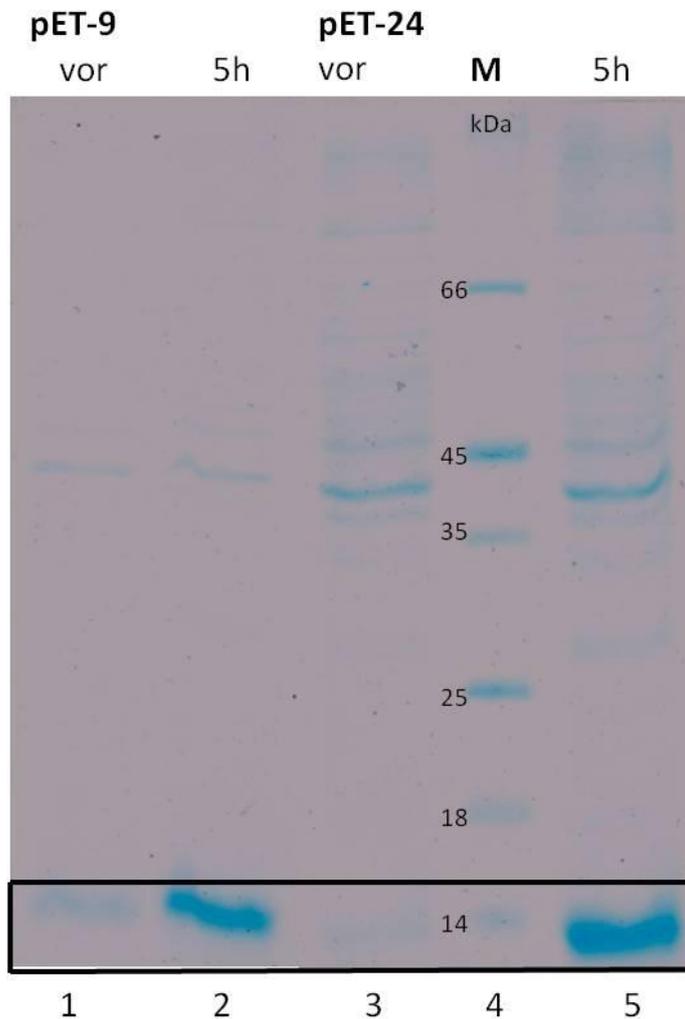


Abbildung 25: SDS-PAGE der BMP-4 Proteinsynthese, Ganzzellprotein (WCP)

Abbildung 25 zeigt die Überprüfung der BMP-4 Proteinsynthese. Aufgetragen sind Proben des Ganzzellproteins. Der Vergleich von Bahn 1 und 2 macht deutlich, dass mit dem, den pET-9-Vektor tragenden, Stamm BMP-4 durch Induktion mit IPTG gebildet werden konnte. Im Vergleich von Bahn 3 mit Bahn 5 lassen sich dieselben Ergebnisse für den pET-24-Vektor tragenden Stamm festhalten.

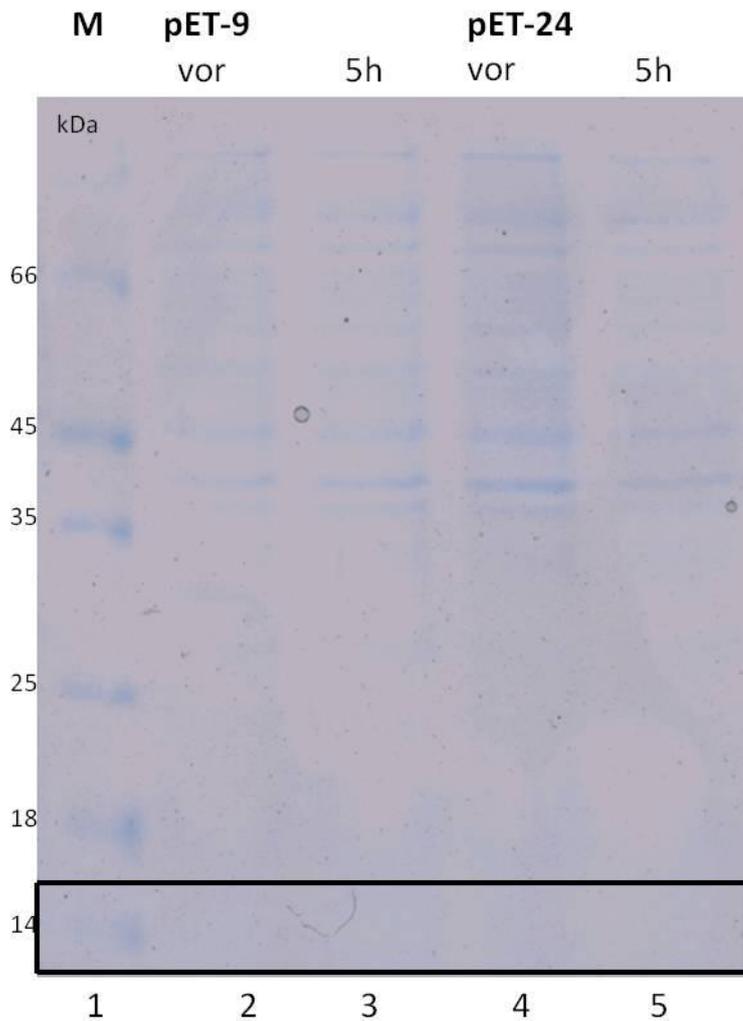


Abbildung 26: SDS-PAGE der BMP-4 Proteinsynthese, lösliche Fraktion (SP)

Abbildung 26 zeigt die Überprüfung der BMP-4 Proteinsynthese. Aufgetragen sind Proben der löslichen Fraktion. In keiner der 4 Proben auf den Bahnen 2-5 lässt sich eine Proteinbande auf Höhe des Monomers von etwa 13 kDa ausmachen. Zusammen mit den Gelen des Ganzzellproteins und der unlöslichen Fraktion lässt sich sagen, dass das BMP-4 Monomer mit beiden Stämmen vollständig in Einschlusskörperchen gebildet wurde.

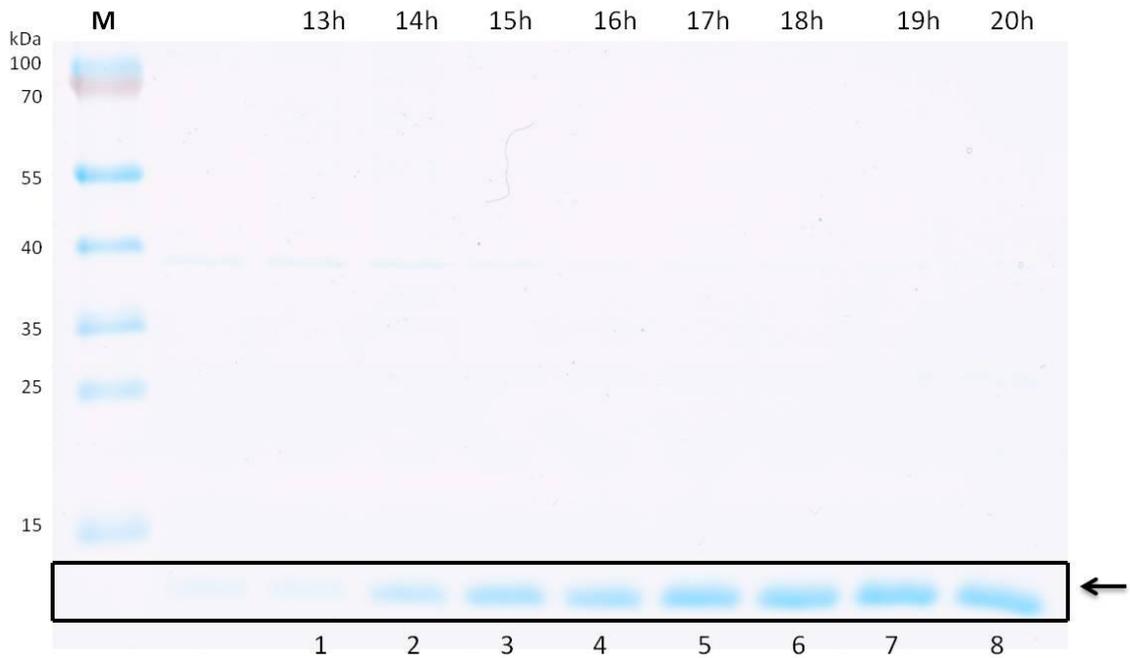


Abbildung 27: SDS-PAGE der normierten unlöslichen Fraktion (IP) der BMP-2 Expression

Abbildung 27 zeigt den zeitlichen Verlauf der BMP-2 Expression. Es wurden jeweils Proben vor der Autoinduktion (Spur 1) bzw. je eine Stunde danach (Spur 2-8) bis t_{20h} aufgetragen. Der Vergleich von Spur 1 mit Spur 2-8 zeigt, dass das BMP-2 exprimiert wird und die Expressionsmenge über die Zeit zunimmt.

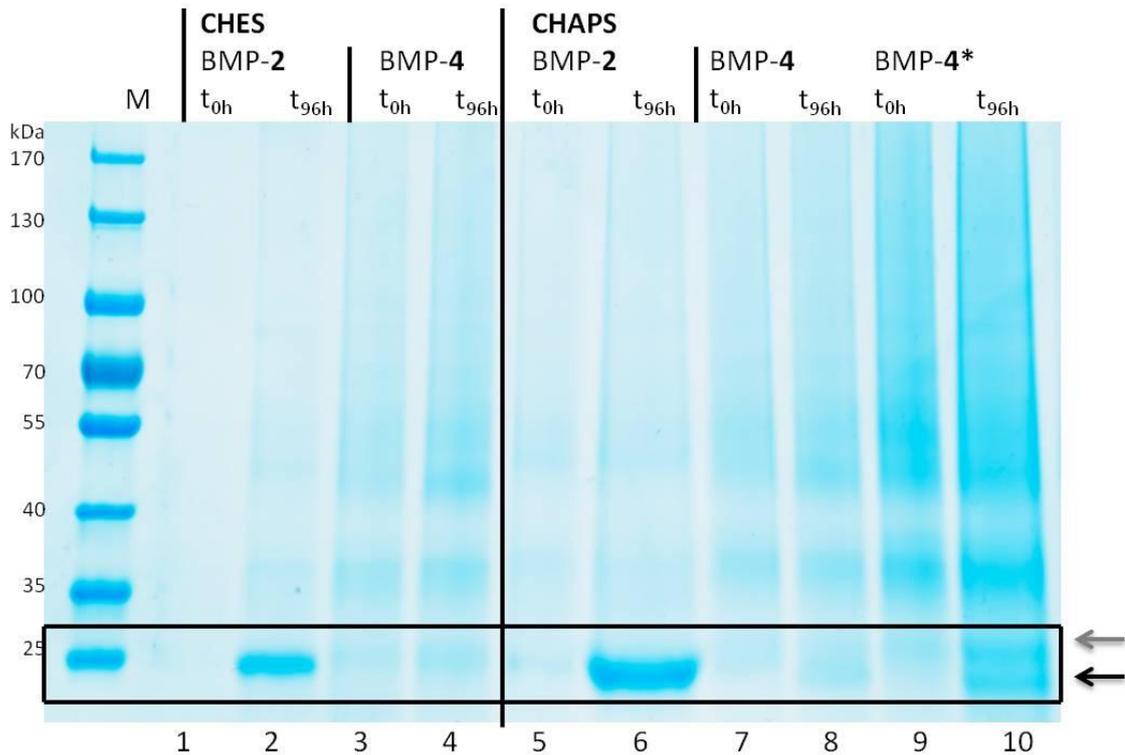


Abbildung 28: Vergleich der Renaturierungen mit CHES bzw. CHAPS (Übersichts-Gel II)
 Vergleich der Renaturierungen von BMP-2 und BMP-4 mit CHES bzw. CHAPS. Auf den Bahnen 9 und 10 sind zur besseren Sichtbarkeit dieselben Proben wie auf Bahn 7 und 8 aufgetragen, allerdings in doppelter Menge.

Abbildung 28 zeigt den Vergleich der Renaturierung der beiden Cytokine mit CHES bzw. CHAPS. Vergleich hierzu auch Abbildung 15. Analog zu Abbildung 15 ist auf den Bahnen 1 und 2 bzw. B3 und B4 die Renaturierung der beiden Proteine zum Zeitpunkt t₀ und t₉₆ mit CHES aufgetragen. Auf den Bahnen 5 bis 10 ist die Renaturierung mit CHAPS aufgetragen. Auf den Bahnen 10 und 11 sind zur besseren Sichtbarkeit dieselben Proben wie auf Bahn 8 und 9 aufgetragen, allerdings in doppelter Menge.

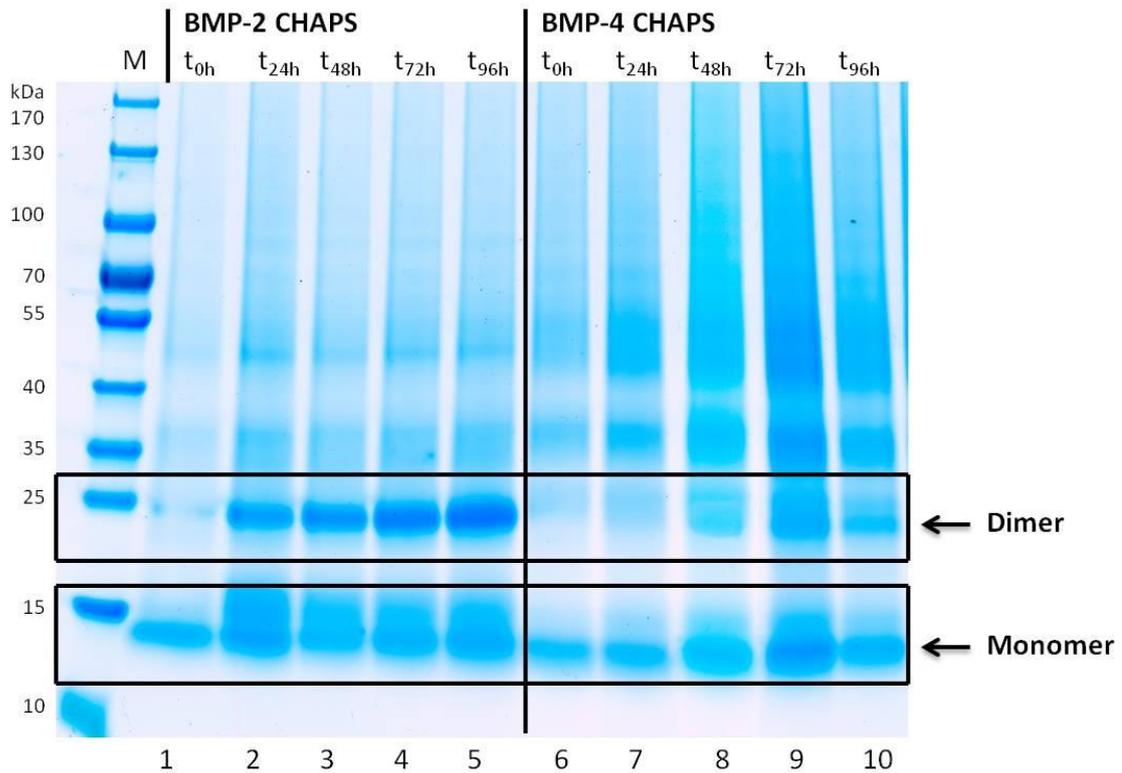


Abbildung 29: SDS-PAGE der CHAPS-Renaturierung (Detail-Gel CHAPS II)

Auf den Bahnen 1-5 sind die Proben von BMP-2, auf den Bahnen 6-10 die Proben von BMP-4, beide renaturiert in CHAPS-Puffer aufgetragen. Es konnten unter Verwendung des Puffers für beide Proteine Dimere erzeugt werden.

Abbildung 29 zeigt den Vergleich der Renaturierung der beiden Cytokine mit CHAPS-Puffer. Dazu wurden die Proben, die im Abstand von 24 h genommen wurden aufgetragen. Vergleich hierzu auch Abbildung 17. Auf den Bahnen 1-5 sind die Proben von BMP-2, auf den Bahnen 6-10 die Proben von BMP-4 aufgetragen. Auch hier ist zu erkennen, dass die Intensität der Dimerbande von BMP-2 mit der Zeit zunimmt, während bei t_0 (Bahn 1) keine Bande zu sehen ist. Für BMP-4 ist bei den ersten beiden Probezeitpunkten kein Dimer zu erkennen, für die drei folgenden hingegen wird eine Dimerbande sichtbar.

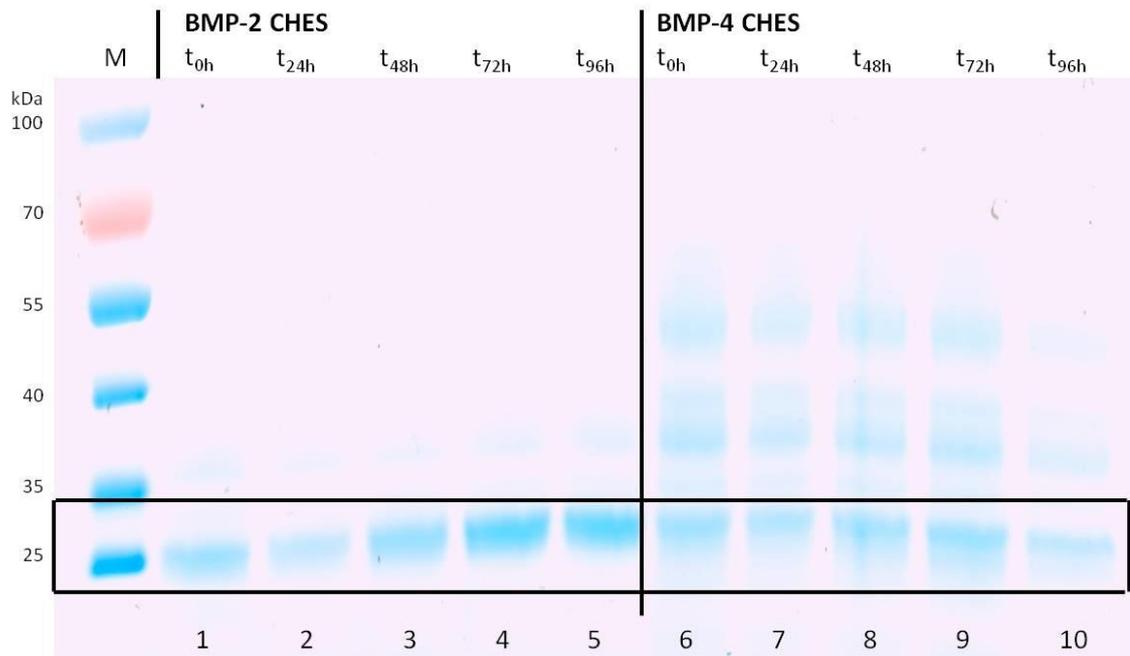


Abbildung 30: SDS-PAGE der CHES-Renaturierung (Detail-Gel CHES I)

Auf den Bahnen 1-5 sind die Proben von BMP-2, auf den Bahnen 6-10 die Proben von BMP-4, beide renaturiert in CHES-Puffer aufgetragen. Es konnten unter Verwendung des CHES-Puffers nur für BMP-2 Dimere erzeugt werden.

Abbildung 30 zeigt den Vergleich der Renaturierung der beiden Cytokine mit CHES-Puffer. Dazu wurden die Proben, die im Abstand von 24 h genommen wurden aufgetragen. Auf den Bahnen 1-5 sind die Proben von BMP-2, auf den Bahnen 6-10 die Proben von BMP-4 aufgetragen. Es ist zu erkennen, dass die Intensität der BMP-2-Dimerbande im Verlauf über die betrachteten Zeitpunkte zunimmt (Bahn 2-5), also Dimer gebildet wird. Für BMP-4 lässt sich festhalten, dass kein Dimer gebildet wird.

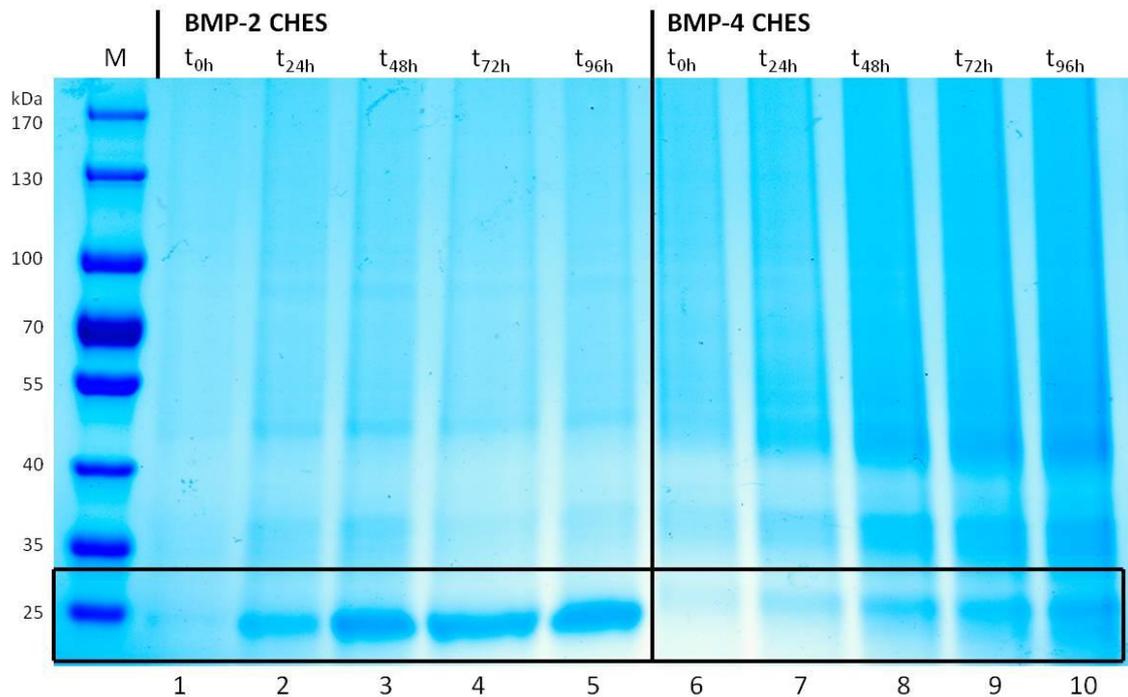


Abbildung 31: SDS-PAGE der CHES-Renaturierung (Detail-Gel CHES II)

Auf den Bahnen 1-5 sind die Proben von BMP-2, auf den Bahnen 6-10 die Proben von BMP-4, beide renaturiert in CHES-Puffer aufgetragen. Es konnten unter Verwendung des CHES-Puffers nur für BMP-2 Dimere erzeugt werden.

Abbildung 31 zeigt den Vergleich der Renaturierung der beiden Cytokine mit CHES-Puffer. Dazu wurden die Proben, die im Abstand von 24 h genommen wurden aufgetragen. Auf den Bahnen 1-5 sind die Proben von BMP-2, auf den Bahnen 6-10 die Proben von BMP-4 aufgetragen. Es ist zu erkennen, dass die Intensität der BMP-2-Dimerbande im Verlauf über die betrachteten Zeitpunkte zunimmt (Bahn 2-5), während auf Bahn 1 keinerlei Bande zu sehen ist. Es wurde also Dimer gebildet. Für BMP-4 lässt sich festhalten, dass kein Dimer gebildet wird.

6.4 Methoden

Im Weiteren sind die Methoden für die durchgeführten experimentellen Arbeiten zur Herstellung von BMP-2 und BMP-4 angegeben. Ein Verzeichnis der verwendeten Materialien und Geräte sowie noch nicht im Methodenteil aufgeführter Chemikalien ist im Anschluss (siehe Abschnitt 6.5.1 ff.) gegeben.

6.4.1 Allgemeine Techniken

Reinstwasser

Zur Herstellung aller Lösungen, für Waschschritte o.ä. wurde Reinstwasser aus einem *Arium 611 Reinstwassersystem* (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen) mit einer spezifischen Leitfähigkeit von 18,2 M x cm verwendet.

Sterilisation

Alle Kultivierungsgefäße (Bioreaktor, Schüttelkolben, etc.) Medien, 1,5 mL- und 2 mL-Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen o.ä. wurden für alle Arbeiten, die mit lebenden Organismen durchgeführt wurden, zuvor für 20 min bei 121 °C in einem Autoklaven sterilisiert. Nicht autoklavierbare Lösungen oder kleinere Volumina wurden durch Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm sterilisiert.

Antibiotikum (Kanamycin)

Kanamycin wurde in einer Stammlösung mit 50 mg/mL angesetzt, aliquotiert und bei einer Temperatur von -80 °C gelagert. Alle Volumenangaben für Kanamycin beziehen sich im Folgenden auf diese Lösung. Die Arbeitskonzentration in Flüssigmedien betrug 50 µg/mL.

Herstellung von Agarplatten

15 g Agar wurden mit LB-Medium (0,5 % (v/w) Hefeextrakt, 1 % Trypton, 0,5 % NaCl, auf pH = 7 mit 5 M NaOH eingestellt) auf 1000 mL aufgefüllt und sterilisiert. Der handwarmen Lösung wurden 1000 µL der Kanamycin-Stammlösung hinzugegeben und diese in Petrischalen (90 x 14 mm; VWR, Darmstadt) gegossen. Die Platten wurden nach Erkalten bei 4 °C gelagert.

Schüttelkolben

Für Vorkulturen (20 mL) wurden 100 mL-Kolben mit Drehverschluss (leicht geöffnet) und vier Schikanen verwendet; für Hauptkulturen (100 mL-200 mL) wurden 2000 mL-Kolben mit Aludeckel und vier Schikanen verwendet.

OD-Messung

Die Bestimmung der optischen Dichte (OD) einer Zellsuspension erfolgte durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Die Kulturproben wurden mit 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung (Saline) so verdünnt, dass Werte zwischen 0,05 und 0,8 gemessen wurden. Der Nullabgleich wurde gegen Saline durchgeführt.

Verdünnungen

Eine 1:2-Verdünnung entsprach einer Mischung von zwei Lösungen zu gleichen Teilen. Mit einer 1:10-Verdünnung ist die Mischung von einem Teil Lösung A zu neun Teilen Lösung B gemeint etc.

6.4.2 Zellaufschluss

Der Zellaufschluss erfolgte für aufzuschließende Volumina bis 2000 μL durch Ultraschall; ab 2000 μL wurde der Zellaufschluss mittels Hochdruck (*French Press*) bewerkstelligt. Auch eine chemische Lyse mit *BugBuster™ Protein Extraction Reagent* (Novagen) wurde zunächst für kleine Volumina durchgeführt. Allerdings erschwerte die notwendige Zugabe von Lysozym die Dimer-Analytik, weswegen im weiteren Verlauf nur noch die beiden obigen Verfahren zum Einsatz kamen.

Aufschlüsse für Volumina $<2000 \mu\text{L}$ mittels Ultraschall erfolgten unter Eiskühlung. Dabei wurden 3 Intervalle mit je 1 Minute Dauer (Pulsdauer 0,6 s und 100 W Leistung) und dazwischen einer Minute Pause gewählt. Für die Kontrolle aller Kultivierungen wurden die Proben zentrifugiert (17000 x g, 10 min, 4°C) und mit Waschpuffer (s. u.) gewaschen. Durch die Wiederaufnahme in einer definierten Menge Lysepuffer konnte eine Normierung der Proben im Bereich von $\text{OD}_{600} = 5$ bis 20 erreicht werden. Damit lag für alle Aufschlüsse stets eine konstante Anzahl an Zellen zugrunde, sodass die jeweiligen Proteinbanden aus der SDS-PAGE-Analyse direkt miteinander verglichen werden konnten.

Nach dem Aufschluss der Proben wurde von diesen zunächst ein Aliquot für das WCP genommen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand, der der löslichen

Fraktion (SP) des Zellysats entsprach abgenommen. Für die unlösliche Fraktion des Zellysats (IP) wurde der Rückstand erneut in der entsprechenden Menge Lysepuffer durch kräftiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert.

Lyse- und Waschpuffer (PBS-Puffer)

137 mmol/L NaCl
2,7 mmol/L KCl
10 mmol/L Na₂HPO₄·2 H₂O
2 mmol/L KH₂PO₄
pH auf 7,4 einstellen

Für den Aufschluss größerer Volumina (Zellernte des Bioreaktors) kam eine French Press zum Einsatz.

20 g gewaschenes Zellpellet wurden in 100 mL 50 mM PBS-Puffer resuspendiert. Die Resuspendierung gestaltete sich schwierig; der Einsatz von Vortex® und Ultraschall-Bad erleichterte die Resuspendierung. Es durften keine Zellklumpen mehr vorhanden sein, da diese sonst die Hochdruckdüse verstopften.

Die Suspension wird 7-fach durch den Microfluidizer gepresst. Der Kammerdruck wird dabei auf 9000 psi (~620 bar) eingestellt. Die aufgeschlossene Zellmasse wurde anschließend 45 min bei 5500 x g (4°C) zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wird entweder direkt weiter verarbeitet und zu Lagerzwecken bei -80°C weggefroren.

6.4.3 HPLC-Analytik

Die Konzentrationsbestimmung von Lactose und Glycerol erfolgte mittels Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC, *High-Performance LiquidChromatography*). Zur Erstellung der jeweiligen Kalibration wurden vor der Probenanalyse Standardreihen von Lactose und Glycerol angesetzt und vermessen. Es wurden folgende Bedingungen verwendet:

Chromatographie-Säule:	Aminex HPX-87h, 300 x 7,8 mm (BioRad)
Flussrate:	0,7 mL/min
Temperatur:	65 °C
Eluent:	5 mmol/L H ₂ SO ₄
Detektion:	Brechungsindex-Detektor
Analysenzeit:	25 min/Probe

(Die Konzentrationsbestimmung von Glucose erfolgte mit dem YSI 2300 STAT Plus TMglucose & lactate analyzer (YSI Life Sciences, USA)).

6.4.4 Bradford

Zur Bestimmung des Proteingehalts einer *IB*-Suspension wurde der Assay nach Bradford durchgeführt. In einer Mikrotiterplatte wurden je 10 μL einer Probe mit 300 μL Bradford-Reagenz (*Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit*, Pierce, Rockford, USA) versetzt und 30 s geschüttelt. Nach einer Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 570 nm gemessen. Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe von BSA verwendet und über die erstellte Kalibration von Proteinkonzentration und gemessener Absorption die Proteinkonzentration der Probe bestimmt.

6.4.5 Prozessierung

An den Zellaufschluss (s. 6.4.2) schloss sich die Prozessierung des IP an. Das (gefrorene) Zellpellet wurde in 50 mM Natrium-Phosphat-Puffer (pH 7) bei einer Feuchtmasse-Konzentration von 200 g/L gewaschen, d. h. resuspendiert und anschließend zentrifugiert (45 min; 5500 x g; 4°C).

Natrium-Phosphat-Puffer (1 M, pH 7)

57,7 mL 1 M Na_2HPO_4

42,3 mL 1 M NaH_2PO_4

Das erhaltene Pellet wurde in Triton-Wasch-Puffer bei einer Feuchtmasse-Konzentration von 25 mg/mL resuspendiert. Nach kraftvoller Resuspendierung mittels Vortex® und Kolbenhubpipette wurde die Suspension zentrifugiert (30min; 18500 x g; 4°C). Der Triton-Waschschritt wird einmal wiederholt.

Triton-Wasch-Puffer

20 mM Tris-HCl (pH 8,5)

0,5 mM EDTA

2 % (v/v) Triton X-100

Anschließend wurden die gewaschenen *Inclusion Bodies* solubilisiert. Dazu wurden sie in Solubilisierungs-Puffer bei einer Konzentration von 35 mg/mL aufgenommen. Die Suspension wurde über Nacht unter leichtem Rühren bei Raumtemperatur (ca. 20°C) inkubiert. Zur Abtrennung von Festpartikeln wird die Suspension anschließend zentrifugiert (45min; 18500 x g; 4°C).

Solubilisierungs-Puffer

6 M Guanidinium-Hydrochlorid
100 mM TRIS-HCl (pH 8,5)
100 mM DTT
1 mM EDTA

6.4.6 SDS-PAGE und Färbungen

Zwecks Analyse von Proteinproben wurden diese einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unterzogen. Die Proben der Kultivierungen wurden mit einer äquivalenten Menge Laemmli-Auftragspuffer versetzt. Für die Proben der Kinetik-Versuche beachte man die TCA-Fällung s. u. Für die Analytik von Dimerisierungsversuchen wurde auf den Reduktionsschritt (Zugabe von reduzierenden Agenzien (DTT (oder β -Mercaptoethanol)) und Denaturierung für 10 min bei 95 °C) verzichtet. Durch die Normierung der Proben (s. 6.4.2) auf einen einheitlichen OD₆₀₀-Wert konnten die Proben direkt auf dem Gel miteinander verglichen werden.

Laemmli-Auftragspuffer

80 % (v/v) SDS-Probenpuffer
10 % (v/v) Glycerin (55 % ig (v/v))
[10 % (v/v) 2-Mercaptoethanol]

SDS-Probenpuffer

20 mmol/L Tris-HCl
2 mmol/L EDTA
5 % SDS (w/v)
0,02 % Bromphenolblau
auffüllen auf 90 mL mit H₂O

SDS-Laufpuffer ("1x TGS")

25 mmol/L Tris-Base
192 mmol/L Glycin
0,1 % SDS (w/v)
pH auf 8,3 einstellen

Tabelle 5: Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele (Angaben für zwei Gele).

Substanz	Sammelgel (6% ig)	Trenngel (12% ig)
Polyacrylamid/Bisacrylamid-Mischung (37,5:1); 40 % ig	750 µL	3,0 mL
SDS (1 % ig)	300 µL	1,0 mL
Tris-HCl (1,5 mol/L), pH 8,8	-	2,8 mL
Tris-HCl (1,5 mol/L), pH 6,8	630 µL	-
H ₂ O	3,770 mL	3,2 mL
TEMED	10 µL	20 µL
APS (25% ig)	10 µL	20µL

Die Elektrophorese erfolgte zunächst für 30 min bei einer Spannung von 100 V und daran anschließend für 60-90 min bei 200 V. Die Färbung der Gele erfolgte zweckgebungen mittels Silberfärbung (Empfindlichkeit <1 ng Protein pro Bande) oder *Coomassie Blue*-Färbung (Empfindlichkeit 0,1-0,2 µg Protein pro Bande).

Für die Analyse der Dimerisierungs-Kinetiken wurden anstatt selbst hergestellter Gele kommerziell verfügbare Gradientengele benutzt (BioRad® Mini Protean TGX Precast 4-20%, 15 well, 15µL, #456-1096S, Hercules, CA, USA).

Silber-Färbung

Wenn die Proteinkonzentration der Proben erwartbar zu niedrig war, wurde die Silberfärbung auf Grund ihrer höheren Sensitivität als Detektionsmethode eingesetzt (z. B. beim Screening von Kinetik-Gelen).

Das Gel wurde nach der Elektrophorese mit H₂O gespült und dann für mindestens 30 min im Entfärber/Fixierer (80 mL Essigsäure, 400 mL Ethanol und 400 mL H₂O) gelegt. Nach doppeltem, kurzem Waschen mit Wasser wurde das Gel für 2,5 min in *Farmers Reducer* (1 Spatelspitze K₃[Fe(CN)₆] sowie 1 Spatelspitze Na₂S₂O₃ in 100 mL H₂O) gelegt. Anschließend wurde das Gel bis zur vollumfänglichen Entfärbung mit H₂O gewaschen (Wasserwechsel nach jeweils 5 min, üblicherweise zwei Mal nötig). Im folgenden Schritt wurde das Gel für 30 min in einer 0,1 % (w/v) igen AgNO₃-Lösung inkubiert und im Anschluss zweimal für je 30 s mit H₂O gewaschen. Der nächste Waschschritt erfolgte für 30 s mit einer 2,5 % (w/v) igen Na₂CO₃-Lösung. Zur Entwicklung der Proteinbanden wurde das Gel in 100 mL einer Lösung aus 300 µL Formaldehyd (36,5 % ig) in 2,5 % (w/v) iger Na₂CO₃-Lösung inkubiert. Zum Stoppen der Färbung wurde das Gel anschließend für mindestens 10 min in einer 5 %-(v/v)-igen Essigsäure geschwenkt. Danach erfolgte die Lagerung in Wasser. Alle Schritte erfolgten auf einem Schüttler zur gleichmäßigen Verteilung der Lösungen auf dem Gel.

Coomassie-Färbung

Das Gel wird nach Beendigung der elektrophoretischen Auftrennung 3 mal in H₂O gewaschen. Das Gel wird danach über Nacht (min. 2 h) in der Färbelösung inkubiert. Die Färbung erfolgte nach dem Protokoll des Blue Silver Stains nach Candiano *et al.*, 2004 (Candiano, G [...]. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, 25(9), 1327-1333.). Ein separater Fixierungsschritt ist nicht erforderlich, da die Fixierung in der Färbelösung stattfindet. Die Entfärbung wird mit H₂O durchgeführt. Das Wasser wird so lange ausgetauscht, bis der gewünschte Grad an Entfärbung eingetreten ist; sie ist auch über Nacht durchführbar. Zur Unterstützung der Entfärbung empfiehlt sich die Zugabe eines Zellstofftuchs. Danach erfolgte die Lagerung in Wasser. Alle Schritte erfolgten auf einem Schüttler zur gleichmäßigen Verteilung der Lösungen auf dem Gel.

TCA-Fällung

Aufgrund der geringen Proteinkonzentration mussten die Proben der Renaturierungsversuche mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt werden, damit sie einer Coomassie-Färbung für die Densitometrie unterzogen werden konnten.

2 mL des Renaturierungsansatzes werden in ein Reaktionsgefäß überführt. Etwaige Präzipitate werden mittels Zentrifugation (10 min, 17000 x g, 4°C) entfernt, der Überstand wird in neues Gefäß überführt. Alle weiteren Arbeiten erfolgen auf Eis. Die Proben werden mit 20 µL Natriumdeoxycholat versetzt (20g/L) und anschließend 10 min inkubiert. Danach werden 220 µL (100%ige TCA) hinzugegeben. Die Proben werden mind. 1 h auf Eis gefällt. Die gefällten Proben werden 20 min zentrifugiert. Eventuell eingefrorene Proben müssen vor der Zentrifugation aufgetaut werden. Der Überstand wird abdekantiert und der Resttropfen mit einem Tuch aufgenommen. Dabei ist zwingend darauf zu achten, dass das (meist weiße) Pellet im Reaktionsgefäß verbleibt. Zur TCA-Entfernung wird das Pellet einmal mit 1 mL 80 %igem, eiskaltem Aceton gewaschen (d. h. nur überschichtet). Dieser Waschansatz wird 15 min zentrifugiert, der Überstand wird ebenfalls dekantiert und mit einem Tuch getrocknet. Danach folgt die Trocknung des Pellets bei 37 °C für min. 15 min. Zurück bleibt ein kleines, weißliches, etwa stecknadelkopfgroßes Pellet. Nach der Trocknung wird das Pellet in 50 µL PBS-Puffer aufgenommen und zur Blockierung freier Thiole mit 10 µL frischer Iodacetamid-Lösung (IAA, 0,2 M bzw. 37 mg/mL) versetzt (alternativ können auch 10 µL Maleinimid-Lösung (0,2 M bzw. 19,4 mg/mL) verwendet werden). Die Proben werden dazu 30 min bei Raumtemperatur und in Dunkelheit inkubiert. Anschließend werden 40 µL Lämmli-Auftragspuffer hinzugegeben. Der pH-Wert saurer Proben werden durch schrittweise Zugabe von 1 µL 1 M NaOH justiert, bis die Farbe

der Probe von gelb nach blau umschlägt. Die Proben sind nun gebrauchsfertig für die SDS-PAGE.

6.4.7 Densitometrie

Die Analyse der Renaturierungskinetiken erfolgte über eine densitometrische Auswertung. Hierfür wurden die zu untersuchenden Proben auf das Polyacrylamid-Gel einer SDS-PAGE aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit *Coomassie Blue* gefärbt, eingescannt und über die freie Software *Image J* ausgewertet. Da die Proteinkonzentration in den Proben gleich war, konnten die von der Software bestimmten Intensitäten der zugehörigen Protein-Dimer-Banden auf dem Gel direkt miteinander verglichen werden.

6.4.8 Renaturierung

Die Proteinkonzentration der solubilisierten *Inclusion Bodies* wurde mittels Bradford-Methode bestimmt und die *Inclusion Bodies* wurden in verschiedenen Renaturierungspuffern auf eine Konzentration von 50 µg/mL verdünnt. Verglichen wurde das Renaturierungsverhalten beider Proteine (BMP-2 und BMP-4) in 2 verschiedenen Puffern, die als zentrales, unterschiedliches Agens den Aggregationshemmer CHES (*N*-Cyclohexyl-2-aminoethansulfonsäure) bzw. CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat) enthalten. Abbildung 32 zeigt die Strukturformel des CHES, Tabelle 6 gibt die Zusammensetzung des Puffers wieder.

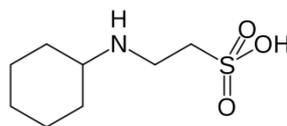


Abbildung 32: CHES (*N* Cyclohexyl 2 aminoethansulfonsäure)

Tabelle 6: Zusammensetzung des CHES-Renaturierungs-Puffers

Konzentration	Substanz
750 mM	CHES (<i>N</i> -Cyclohexyl-2-aminoethansulfonsäure)
50 mM	TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan), pH 8,5
1 M	NaCl (Natriumchlorid)
5 mM	EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)
2 mM	Reduziertes Glutathion
1 mM	Oxidiertes Glutathion

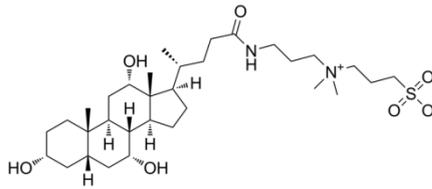


Abbildung 33: CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat)

Tabelle 7: Zusammensetzung des CHAPS-Renaturierungs-Puffers

Konzentration	Substanz
33 mM	CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat)
50 mM	TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan), pH 8,5
1 M	NaCl (Natriumchlorid)
5 mM	EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)
2 mM	Reduziertes Glutathion
1 mM	Oxidiertes Glutathion

Tabelle 7 zeigt die Zusammensetzung des CHAPS-Puffers an, in Abbildung 33 ist die Strukturformel von CHAPS dargestellt.

Die Renaturierung wurde bei 10 °C durchgeführt; der pH-Wert beider Puffer wurde auf 8,5 eingestellt. Vor der Verdünnung wurde der Puffer im Ultraschallbad 15 min lang entgast. Vom Renaturierungsansatz wurden unmittelbar nach Verdünnung und später im Abstand von jeweils 24 h Proben genommen. Diese Proben wurden einer TCA-Fällung (s. 6.4.6) unterzogen und mit Iodacetamid (IAA) (s. Abbildung 34) behandelt (10 % (v/v) einer 0,2 M Lösung), um den Zustand der Cysteine zu konservieren und so ein sog. Reshuffling zu unterbinden.

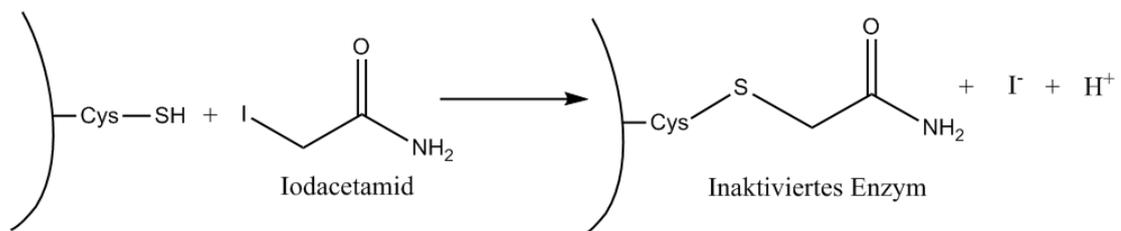


Abbildung 34: Hemmung der Proteinfaltung durch Zugabe von Iodacetamid.

Die Polypeptidkette ist als Bogen dargestellt. Quelle: [106]; mit Genehmigung der Walter de Gruyter GmbH.

6.4.9 Aufreinigung

Für die Isolierung von BMP-2 an der FPLC-Anlage wurde eine Heparin-Affinitätssäule (*HiTrap™ Heparin HP* 1 mL, GE Healthcare Bio-Sciences Corp, NJ, USA) verwendet. Als Probe wurde der Renaturierungsansatz in CHES-Puffer nach 96 h Dimerisierungsdauer benutzt. Dieser wurde unmittelbar vor der Chromatographie mit dem gleichen Volumen einer 8-M-Harnstofflösung verdünnt, sodass eine Lösung von BMP-2 in 4 M Harnstoff entstand. Die Leitfähigkeit konnte so von etwa 40 mS/cm auf etwa 25 mS/cm gesenkt werden. Anschließend wurde die Lösung filtriert (0,45 µm).

Eine Übersicht der verwendeten Puffer gibt Tabelle 8. Die Flussrate wurde während der gesamten Prozedur bei 1 mL/min gehalten.

Tabelle 8: Übersicht der Puffer für die Isolierung von BMP-X

Puffer	Zusammensetzung
Verdünnungspuffer	8 M Harnstoff 20 mM TRIS-HCl, pH 8,0
Equilibrierungs- und Waschpuffer	4 M Harnstoff 20 mM TRIS-HCl, pH 8,0
Elutionspuffer 1	4 M Harnstoff 20 mM TRIS-HCl, pH 8,0 300 mM NaCl
Elutionspuffer 2	4 M Harnstoff 20 mM TRIS-HCl, pH 8,0 300 mM NaCl

Nachdem das System bei Raumtemperatur mit 5 Säulenvolumen (column volumes, CV) equilibriert worden war, erfolgte die Beladung mit dem verdünnten CHES-Renaturierungsansatz. Hieran schloss sich eine Waschphase mit 5 CV an. Die Elution erfolgte in zwei Stufen. Zunächst wurde mit Elutionspuffer 1 die Leitfähigkeit der Lösung auf etwa 30 mS/cm angehoben und so das Monomer eluiert. Anschließend erfolgte die Elution des Dimers, indem mit Elutionspuffer 2 die Leitfähigkeit auf etwa 45 mS/cm angehoben wurde. Zur Regeneration der Säule wurde diese erneut mit Waschpuffer gespült. Zur Lagerung wurde die Säule mit 20% Ethanol gespült und bei 4 °C aufbewahrt. Final wurde das BMP-2 mittels Zentrifugal-Konzentratoren auf etwa 1 mg/mL eingengt (*Vivaspin* 20 mL, 10k MWCO, Sartorius, Göttingen) und abschließend durch einen 0,22 µm-Filter steril filtriert.

Der Versuch der Aufreinigung des BMP-4-Dimers wurde mit den gleichen Puffern durchgeführt und es kam dieselbe Methode zum Einsatz. Die eingesetzte Probe wurde jedoch abweichend nicht wie beim BMP-2 verdünnt, sondern der BMP-4-CHAPS-Puffer wurde vorher gegen den Equilibrierungspuffer dialysiert.

Alle Puffer wurden vor Verwendung gefiltert (0,45 µm) und per Ultraschall entgast.

6.4.10 Dialyse

Dialyse von BMP-2

Für die finale Testung der Bioaktivität und eine mittelfristige Lagerung war die Umpufferung in 50 mM MES-Puffer (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure) notwendig. Um den Pufferwechsel möglichst schonend zu gestalten, wurde das BMP-2 stufenweise dialysiert.

13 mL des Eluats (in Elutionspuffer 2 (4 M Harnstoff, 500 mM NaCl)) wurden in 7 cm (mit ddH₂O gewaschenen) Dialyseschlauch (*Visking Tubing, cut-off 6-8 kDa*, Medicell International, London, UK) überführt.

Die erste Dialysestufe erfolgte gegen MES-Puffer (50 mM MES, 2 M Harnstoff) für 4 h bei 4 °C. Für die zweite Stufe wurde der Harnstoffgehalt im Folgebuffer auf 0 M reduziert (50 mM MES, 0 M Harnstoff). Die zweite Stufe wurde ebenfalls für 4 h bei 4 °C durchgeführt. Die letzte Stufe wurde einmal wiederholt.

Dialyse von BMP-4

Das mit CHAPS-Puffer dimerisierte BMP-4 musste dialysiert werden, um die anfängliche Leitfähigkeit von etwa 90 mS/cm deutlich zu senken. Eine geringere Leitfähigkeit war für die Heparin-Chromatographie nötig.

17 mL des BMP-4 Renaturierungsansatzes in CHAPS-Puffer wurden in 13 cm (mit ddH₂O gewaschenen) Dialyseschlauch (*Visking Tubing, cut-off 6-8 kDa*, Medicell International, London, UK) überführt.

Die Dialyse erfolgte gegen den Beladungspuffer des Aufreinigungsprotokolls (4 M Harnstoff, 20 mM TRIS-HCl pH 8,0) für 10 h bei 4°C. Die Leitfähigkeit konnte somit auf etwa 10 mS/cm (22 °C) gesenkt werden.

6.4.11 Quantifizierung

Die Bestimmung der Konzentration des aufgereinigten BMP-2-Dimers erfolgte photometrisch mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes:

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

mit $\varepsilon = 37720 \frac{L}{\text{Mol} \cdot \text{cm}}$; $d = 1 \text{ cm}$

(Wetlaufer, D. B., 1962. Ultraviolet spectra of proteins and amino acids. Adv. Protein Chem. 17, 303-389)

Alternativ <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/proteincalc.html> (Stand: 02.09.2015) zur Berechnung des Extinktionskoeffizienten ϵ beliebiger Polypeptide. Der leicht abweichende Wert für das BMP-2-Dimer beträgt hier: $\epsilon = 37240 \frac{L}{Mol \cdot cm}$

6.4.12 Alkaline Phosphatase Aktivitäts Assay

Bestimmung des Endotoxingehalts

Für den Aktivitätstest war es nötig, zuvor die Konzentration an Endotoxinen zu bestimmen. Zur Detektion von Endotoxinen wurde die Probe mit Hilfe eines kommerziellen LAL-Tests gemäß Herstellerangaben untersucht (*Endosafe-PTSTM*, Charles River Laboratories, Bosten, MA, USA).

EC₅₀-Bestimmung/ ALP-Aktivitäts-Assay

Die Testung der Bioaktivität des hergestellten BMP-2 erfolgte mit einem Nachweis der Aktivität von Alkalischer Phosphatase (ALP). Die Analyse wurde bei der Fa. Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, BRD durchgeführt. Bestimmt wurde hierbei die mittlere effektive Konzentration (EC₅₀), bei der die halbmaximale Wirkung auf das Testsystem erreicht wird. Als Vergleich wurde das WHO-Referenz-Reagenz NIBSC 93/574 verwendet. Die Messung der ALP-Aktivität erfolgte photometrisch bei 405 nm; als Substrat diente *para*-Nitrophenylphosphat. Beide Cytokine wurden in verschiedenen Konzentrationen (1-1000 ng/mL) eingesetzt. Die Berechnung der EC₅₀-Werte erfolgte graphisch auf Basis der erhaltenen Daten.

6.4.13 MALDI-TOF-MS

Zur Identifikation bestimmter Proteine wurden ausgewählte Proteinbanden per Massenspektrometrie untersucht. Diese Untersuchungen wurden extern am Helmholtzzentrum für Infektionsforschung in Braunschweig durch Herrn Dr. Nimtz durchgeführt. Dabei wurde ein MALDI-TOF-Massenspektrometer eingesetzt; d. h. es kam als Ionisationsverfahren eine Matrix-unterstützte Laser-Desorptions/Ionisations-Einheit (MALDI) und als Detektor ein Flugzeit-Detektor (TOF) zum Einsatz.

Alle Proben wurden vor der Analyse mit dem Enzym Trypsin behandelt. Dieses spaltet spezifisch zwischen den Aminosäuren Lysin und Arginin.

BMP-2

Für die Monomer- und Dimerbande von BMP-2 wurden Peptide mit der Masse 1587,68 bzw. 1587,66 m/z gefunden. Per Datenbankabgleich konnten diese Messwerte dem

Peptid *NYQDMVVEGCGR* (AS 102-114 des maturen BMP-2 plus IAA-Reste an den Cysteinen) zugeordnet werden.

BMP-4

Für die Monomer- und Dimerbande von BMP-4 wurden Peptide mit der Masse 1601,65 bzw. 1601,70 m/z gefunden. Per Datenbankabgleich konnten diese Messwerte dem Peptid *NYQEMVVEGCGR* (AS 104-116 des maturen BMP-4 plus IAA-Reste an den Cysteinen) zugeordnet werden.

Wirtszellprotein

Für die Bande des Wirtszellproteins wurde ein Peptid mit der Masse 1960,09 m/z gefunden. Per Datenbankabgleich konnte dieser Messwert dem Peptid „30S ribosomal protein S4 [*E. coli* O157:H7 str. EDL933]“ zugeordnet werden.

6.4.14 Anlegen von Gefrierkulturen

Für die Herstellung einer Gefrierkultur der transformierten BL21(DE3)-Stämme wurde eine Einzelkolonie einer frischen Agarplatte (maximal 3 Tage alt) zur Animpfung einer Vorkultur aus 20 mL LB-Medium und 20 µL Kanamycin-Stammlösung verwendet. Nach der Inkubation über Nacht bei 37 °C und 130 rpm wurden 1 mL der Vorkultur zum Animpfen einer Hauptkultur aus 100 mL LB-Medium und 100 µL Kanamycin-Stammlösung verwendet. Die Bakterien wurden bei 37 °C und 150 rpm bis zum Erreichen einer OD zwischen 0,5 und 0,7 kultiviert. 10 mL der Kultursuspension wurden mit dem äquivalentem Volumen an 80 %igem, sterilisiertem Glycerin vermischt (kurzes Vortexen), aliquotiert (je 500 µL) und bei -80 °C gelagert.

6.4.15 Kultivierungen in LB-Medium

Zur Kultivierung der Stämme in LB-Medium wurde zunächst eine frische LB-Agarplatte (50 µg/mL Kanamycin) aus einer Gefrierkultur angeimpft. Durch Eintauchen einer sterilen Impföse in die Gefrierkultur wurden Bakterien auf die Agarplatte transferiert und dort durch einen Verdünnungsausstrich ausplattiert. Die Platte wurden ü. N. bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurde eine Vorkultur mit einer Einzelkolonie von der Agarplatte angeimpft. Die Platte wurde zur evtl. Wiederverwendung max. 4 Wochen bei 4 °C über Kopf und mit Folie verschlossen gelagert. Vor einer neuen Kultivierung wurde stets eine frische Agarplatte auf die beschriebene Weise zur Anzucht von Einzelkolonien verwendet.

Für eine Vorkultur wurden 50 mL LB-Medium (50 µg/mL Kanamycin) in einem autoklavierten 500-mL-Schikane-Schüttelkolben (SSK) inokuliert und über Nacht bei 30 °C und 130 rpm inkubiert.

Die Hauptkultur (200 mL Medium (50 µg/mL Kanamycin) in 2-L-SSK) wurde mit der entsprechend benötigten Menge an Vorkultur angeimpft, um eine Start-OD in der Hauptkultur von 0,1 zu erreichen. Die Kultivierung der Hauptkultur erfolgte bei 37 °C und 120 rpm. Die Induktion der Genexpression wurde durch die Zugabe von Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) bei einer OD von 0,6 erreicht. Für die pET-9-Stämme wurden 0,4 mM; für die pET-24-Stämme 1 mM IPTG verwendet. Für die Probennahme wurde Kultursuspension entnommen und die Bakterien durch Zentrifugation (5000 g, 10 min) vom Kulturüberstand getrennt. Die Bakterienpellets wurden entweder direkt aufgeschlossen oder bei -20 °C gelagert.

LB-Medium

10 g/L Typton
5 g/L Hefeextrakt
10 g/L Natriumchlorid

6.4.16 Kultivierungen im Auto-Induktions-Medium

Zur Testung der Tauglichkeit des Auto-Induktions-Mediums (AIM) wurden die verschiedenen Stämme im AIM kultiviert. Die Zusammensetzung und Herstellung der einzelnen Medienbestandteile orientierte sich an der Originalvorschrift [94]. Bei allen 3 verwendeten Medien wird Kanamycin (50 µg/mL) als Antibiotikum eingesetzt.

Zunächst wurde der Upstream bis zur LB-Vorkultur durchgeführt (s. 6.4.15). Dazu wurden 15 mL LB-Medium in einem 100-mL-SSK kultiviert, ohne IPTG zuzugeben. Die Kultur wurde ü. N. bei 30 °C und 120 rpm durchgeführt.

Am nächsten Tag wurde die Zwischenkultur (DNB, Defined Non-Inducing Broth) angeimpft. Dazu wurden 50 mL DNB-Medium im 500-mL-SSK mit 500 µL LB-Vorkultur angeimpft. Das DNB-Medium besteht zu 10 % (v/v) aus der „DNB-A-Gruppe“ und zu 90 % (v/v) aus der „DNB-B-Gruppe“. Die Zwischenkultur wird bei 37 °C und 120 rpm durchgeführt.

Nach Erreichen einer optischen Dichte (OD) von >1,0 wird die Hauptkultur (DAB, Defined Auto-Inducing Broth) mit der Zwischenkultur inokuliert. 200 mL DAB-Medium in 2-L-SSK werden derart angeimpft, dass eine Start-OD von 0,02 resultiert. Das DAB-Medium besteht zu 30 % (v/v) aus der „DAB-A-Gruppe“ und zu 70 % (v/v) aus der „DAB-B-Gruppe“. Die Hauptkultur wird bei 37 °C und 120 rpm durchgeführt.

Die beiden Gruppen (A und B) wurden separat angesetzt und autoklaviert. Direkt vor Benutzung der Medien wurden beide Gruppen vereinigt und anschließend unter der Sterilwerkbank die Antibiotikallösung und Spurenelemente hinzugegeben.

Für die Probennahme wurde Kultursuspension entnommen und die Bakterien durch Zentrifugation (5000 g, 10 min) vom Kulturüberstand getrennt. Die Bakterienpellets wurden entweder direkt aufgeschossen oder bei -20 °C gelagert.

6.4.17 Kultivierungen im Auto-Induktions-Medium im 10-L-Bioreaktor

Die Kultivierung erfolgte in einem 10-L-Bioreaktor (*Biostat C*, B. Braun Biotech Intern. GmbH, Melsungen) bei 37 °C in Auto-Induktions-Medium (AIM).

Für die Vor- (LB-Medium) und Zwischenkultur (DNB-Medium) wurden mehrere Schikane-Schüttelkolben (bis 2000 mL) wie in Abschnitt 6.4.16 beschrieben vorbereitet (30 °C, 120 rpm).

Nach Vorlage der beiden Teilgruppen (A- und B-Gruppe) des AIM und anschließendem Autoklavieren des Mediums erfolgte die Zugabe des Antibiotikums (Kanamycin 50µg/mL). Danach wurde der Bioreaktor mit der Zwischenkultur zu einer Start-OD von 0,02 angeimpft; das Arbeitsvolumen lag bei 10 Litern.

A-Gruppe

32,2 g Glucose-Monohydrat
110,6 g Glycerol
80 g Lactose-Monohydrat
12 g MgSO₄-Heptahydrat
5 ml "2000x Spurenelemente-Stammlösung"

ad 2000 mL plus 10 mL Kanamycin-Stammlösung post-autoklav

B-Gruppe

40 g (NH₄)₂HPO₄
133 g (KH₂)PO₄
17 g Citronensäure-Monohydrat
1 g Eisen-(III)-Citrat
400 mL NH₄OH (3 %ige (v/v) Lösung)
2 mL „5000x Na₂MoO₄·H₂O Stammlösung (2,1 mg/L)
2 mL Antischaummittel

Ad 8000 mL

Die Kultivierung wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Temperatur:	37 °C
pH-Wert:	6,7 (Regelung mit 1 mol/L NaOH)
Sauerstoffsättigung:	30 %; kaskadisch und über Rührerdrehzahl angepasst
Rührgeschwindigkeit:	kaskadisch über den gelösten Sauerstoff geregelt
Begasung (Druckluft):	10 L/min

Der Prozessverlauf wurde sowohl über das *Biostat*-System (Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffsättigung und Begasung; B. Braun Biotech Intern. GmbH, Melsungen) als auch das BlueSens-System (Abgas CO₂ und O₂; BlueSens gas sensor GmbH, Herten) *online* verfolgt. Die *offline*-bestimmten Größen waren der OD-Wert und die jeweiligen Glycerol- und Lactosekonzentrationen (Bestimmung über HPLC-Analyse, siehe Abschnitt 6.4.3) sowie die Glucosekonzentration (Bestimmung über YSI 2300 STAT Plus™ glucose & lactate analyzer (YSI Life Sciences, USA)). Die Produktbildung wurde durch eine SDS-PAGE-Analyse ebenfalls *offline* untersucht.

6.5 Materialien

6.5.1 Verwendete Chemikalien

Tabelle 9: Übersicht der verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller, Land
Aceton	AppliChem GmbH, Deutschland
Agar	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Ammoniumsulfat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co.KG
Ammoniumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co.KG
beta-Mercaptoethanol	Merck KGaA, Deutschland
Bromphenolblau	Merck KGaA, Deutschland
CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat)	AppliChem GmbH, Deutschland
CHES (<i>N</i> -Cyclohexyl-2-aminoethansulfonsäure)	AppliChem GmbH, Deutschland
Citronensäure	Merck KGaA, Deutschland
Coomassie Brilliant Blau G250	Merck KGaA, Deutschland
Dikaliumhydrogenphosphat-trihydrat	Merck KGaA, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat-dihydrat	Merck KGaA, Deutschland
Dithiotreitol	AppliChem GmbH, Deutschland
EDTA-Dinatriumsalz	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Eisen(III)citrat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Essigsäure	AppliChem GmbH, Deutschland
Ethanol	VWR International, LLC, Deutschland
Formaldehyd	AppliChem GmbH, Deutschland
Glucose Monohydrat	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Glutathion, oxidiert	AppliChem GmbH, Deutschland
Glutathion, reduziert	AppliChem GmbH, Deutschland
Glycerin	AppliChem GmbH, Deutschland
Glycin	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Guanidiniumhydrochlorid	AppliChem GmbH, Deutschland
Harnstoff	AppliChem GmbH, Deutschland
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH & Co.KG
Iodacetamid	Fluka (Sigma-Aldrich), USA

Kaliumchlorid	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Deutschland
Kaliumhexacyanoferrat(III)	Riedel de-Haen (Sigma-Aldrich), USA
Kanamycin	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Lactose	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Mangansulfat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Marker [PageRuler Protein Ladder (#26610, #26616)]	Fermentas GmbH, Deutschland
MES (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure)	AppliChem GmbH, Deutschland
Methanol	Carl Roth GmbH & Co.KG
Natriumcarbonat	Merck KGaA, Deutschland
Natriumchlorid	Merck KGaA, Deutschland
Natriumdeoxycholat	AppliChem GmbH, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Deutschland
Natriumhydroxid	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Natriummolybdat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Natriumphosphat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Natriumsulfid	Merck KGaA, Deutschland
Natriumthiosulfat	Riedel de-Haen (Sigma-Aldrich), USA
Phosphorsäure	Merck KGaA, Deutschland
Polyacrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Salzsäure (HCl, konzentriert)	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Schwefelsäure	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Silbernitrat	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Sodium Dodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Trichloressigsäure (TCA)	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Triton-X-100	Merck KGaA, Deutschland
Trypton	Fluka (Sigma-Aldrich), USA

6.5.2 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Alu-Bördelkappen, Ochs GmbH, Deutschland

Butylgummisepten, Ochs GmbH, Deutschland

Einmalhandschuhe, Latex, Semperguard, Semperit AG Holding, Wien

Einmalhandschuhe, Nitril, Ansell Protective Products, Aalst

Einmalspritzen, Omnifix, Braun, Deutschland

Einmalspritzen, Teruma Europe NV, Leuven

Halbmikroküvette, Sarstedt, Deutschland

Pipettenspitzen, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Reaktionsgefäße, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Sterilfiler, Minisart 0,25 µm, Sartorius Stedim Biotech, Deutschland

Zentrifugenröhrchen, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

6.5.3 Verwendete Geräte

Abgassensor BlueInOne, BlueSens gas sensor GmbH, Herten, Deutschland

Analysenwaage, Analytik AC 210S, Sartorius Stedim Biotech, Deutschland

Autoclav, Systec V-150, Systec GmbH, Deutschland

Bioreaktor, BIOSTAT C, Sartorius Stedim Biotech, Deutschland

FPLC-Anlage BioLogic AVR7-3, BioRad Laboratories Inc., München

Gelelektrophoreseapparatur, Mini ProteanSystem, Biorad

Glucosemessgerät, YSI 2700 Select Analyzer, YSI incorporated, USA

HPLC, Hitachi Chromaster (VWR), München

Kolbenhub-Pipetten Eppendorf RResearch Eppendorf AG, Deutschland

Kolbenhubpipetten Transferpette RS Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland

Kultur-Schrank Certomat BS-1 B. Braun Melsungen AG, Deutschland

Kultur-Schrank IKA RKS4000 ic control

Photometer UVIKON 922 Kontron Instruments, Schweiz

Photometer, Multiskan Spectrum, Thermolabs, USA

Reinstwasseranlage, Arium ProVF, Sartorius Stedim Biotech, Deutschland

Rüttelplatte, Infors AG, Schweiz

Scanner (für SDSPAGE) Scanjet 3500c Hewlett Packard Co., USA

Scanner (für SDSPAGE) Perfection V 750 Pro Seiko Epson Corp., Japan

Schüttler CH-4103 Infors HT, Schweiz

Ultraschallsonde, LABsonic, Sartorius Stedim Biotech, Deutschland

Vortex, Gemmy industrial corp., Taiwan

Zentrifuge mit Kühlaggregat, Megafuge, 1.0 RS, Heraeus, ThermoScientific, USA

kontinuierliche Zentrifuge, Contifuge stratos, Heraeus, ThermoScientific, USA

Zentrifuge FRESCO17, Heraeus, ThermoScientific, USA

Zentrifuge Eppendorf 5415C, Eppendorf AG, Deutschland

6.5.4 Verwendete Stämme und Vektorkarten

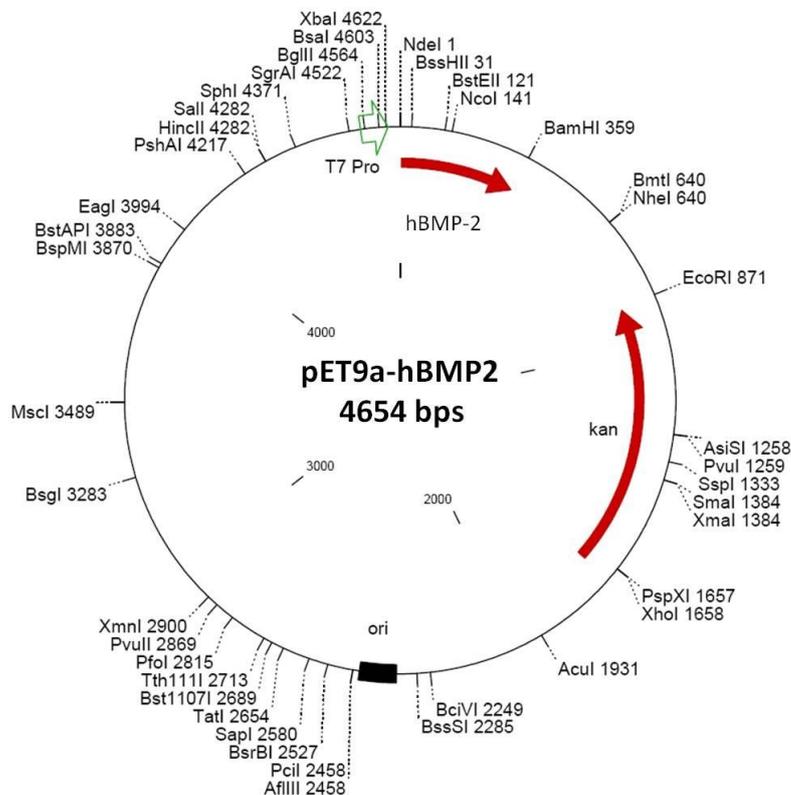


Abbildung 35: Vektorkarte pET9a-hBMP2

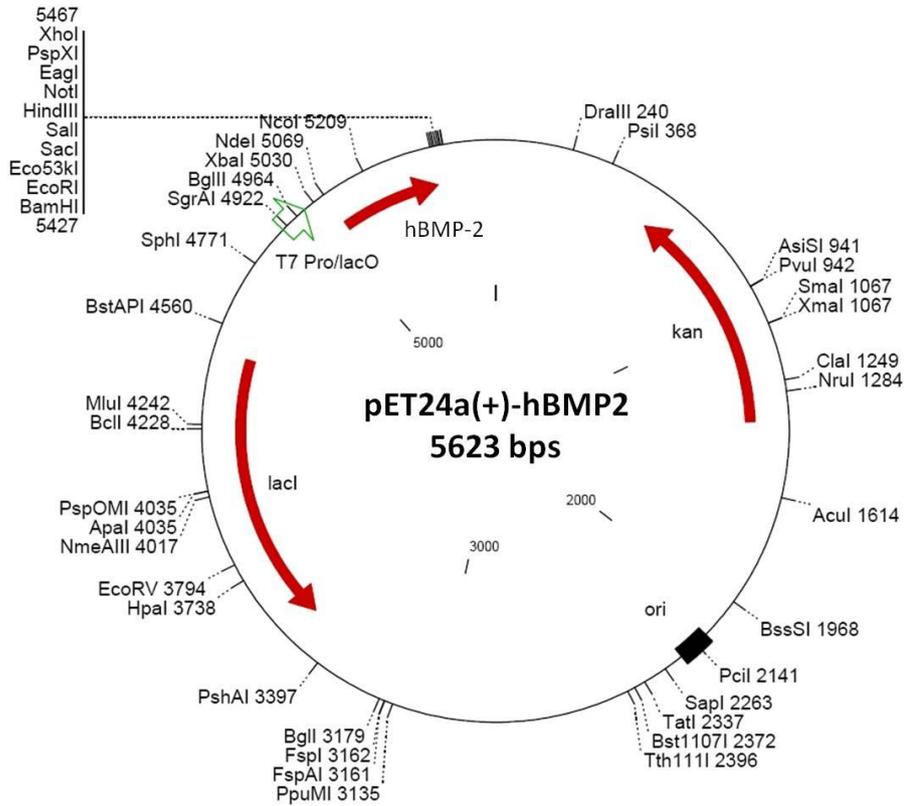


Abbildung 36: Vektorkarte pET24a(+)-hBMP2

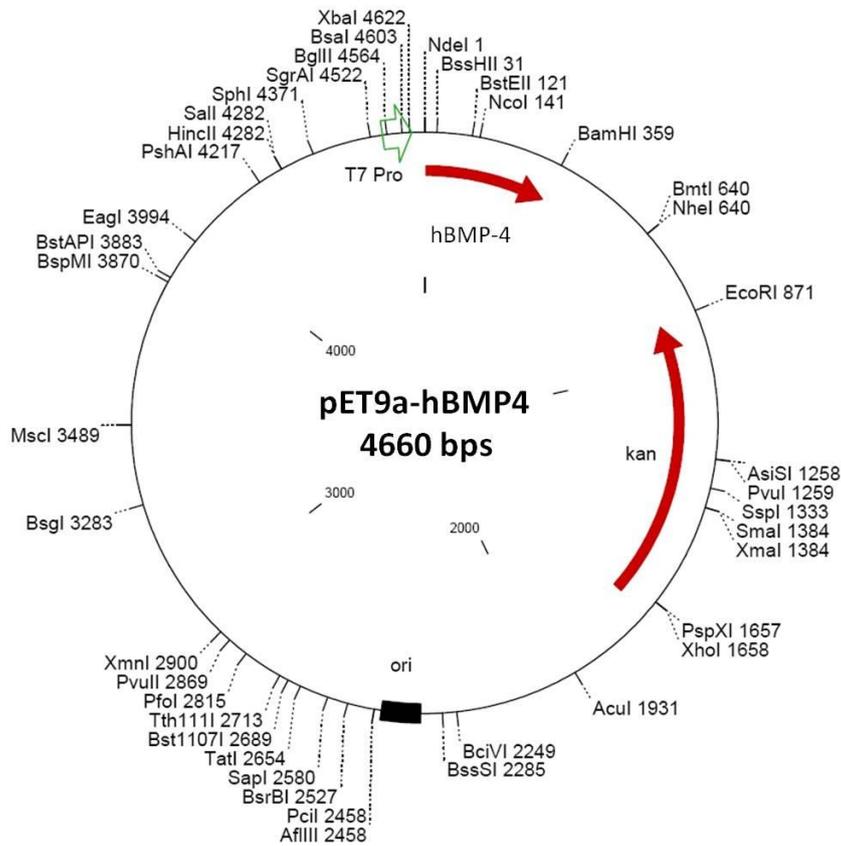


Abbildung 37: Vektorkarte pET9a-hBMP4

7 Literatur

1. Bessho, K., et al., *Comparison of recombinant and purified human bone morphogenetic protein*. Br J Oral Maxillofac Surg, 1999. **37**(1): p. 2-5.
2. Kirker-Head, C.A., *Potential applications and delivery strategies for bone morphogenetic proteins*. Adv Drug Deliv Rev, 2000. **43**(1): p. 65-92.
3. Loppnow, H., *Cytokines: classification, receptors, mechanisms of action*. Internist (Berl), 2001. **42**(1): p. 13-4, 17-27.
4. Lackie, J., *Cytokine*. A Dictionary of Biomedicine. Oxford University Press, 2010.
5. Klouche, M., *Zytokine-Ein zweischneidiges Schwert in der Pathogenese und der Therapie von Krebserkrankungen*. Bundesgesundheitsblatt, 2003. **46**(3): p. 203-10.
6. Yorio, T., *Ocular Therapeutics: Eye on New Discoveries*. Academic Press, 2007: p. 88-.
7. Dorland's Medical Dictionary, "growth factor", 2011. **32th** edition.
8. Even, J., M. Eskander, and J. Kang, *Bone morphogenetic protein in spine surgery: current and future uses*. J Am Acad Orthop Surg, 2012. **20**(9): p. 547-52.
9. Behringer, R.R., *The in vivo roles of mullerian-inhibiting substance*. Curr Top Dev Biol, 1994. **29**: p. 171-87.
10. Mueller, T.D. and J. Nickel, *Promiscuity and specificity in BMP receptor activation*. FEBS Lett, 2012. **586**(14): p. 1846-59.
11. Lin, S.J., et al., *The structural basis of TGF-beta, bone morphogenetic protein, and activin ligand binding*. Reproduction, 2006. **132**(2): p. 179-90.
12. Alvarez, E., C. Cahoreau, and Y. Combarnous, *Comparative structure analyses of cystine knot-containing molecules with eight aminoacyl ring including glycoprotein hormones (GPH) alpha and beta subunits and GPH-related A2 (GPA2) and B5 (GPB5) molecules*. Reprod Biol Endocrinol, 2009. **7**: p. 90.
13. Daly, N.L. and D.J. Craik, *Bioactive cystine knot proteins*. Curr Opin Chem Biol, 2011. **15**(3): p. 362-8.
14. Hinck, A.P., *Structural studies of the TGF-betas and their receptors - insights into evolution of the TGF-beta superfamily*. FEBS Lett, 2012. **586**(14): p. 1860-70.
15. Hoffmann, A., et al., *Perspectives in the biological function, the technical and therapeutic application of bone morphogenetic proteins*. Appl Microbiol Biotechnol, 2001. **57**(3): p. 294-308.
16. Kühnemund, V.A., *Isolierung und Charakterisierung der biologischen Aktivität von nativem BMP-3*, Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena, 2008.
17. Ducy, P. and G. Karsenty, *The family of bone morphogenetic proteins*. Kidney Int, 2000. **57**(6): p. 2207-14.
18. Carreira, A.C., et al., *Bone Morphogenetic Proteins: structure, biological function and therapeutic applications*. Arch Biochem Biophys, 2014. **561**: p. 64-73.
19. Reddi, A.H. and A. Reddi, *Bone morphogenetic proteins (BMPs): from morphogens to metabologens*. Cytokine Growth Factor Rev, 2009. **20**(5-6): p. 341-2.
20. Miyazono, K., S. Maeda, and T. Imamura, *BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk*. Cytokine Growth Factor Rev, 2005. **16**(3): p. 251-63.
21. Herpin, A., C. Lelong, and P. Favrel, *Transforming growth factor-beta-related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans*. Dev Comp Immunol, 2004. **28**(5): p. 461-85.
22. Urist, M.R., *Bone: Formation by autoinduction*. Science, 1965. **150**(3698): p. 893-899.
23. Urist, M.R. and B.S. Strates, *Bone morphogenetic protein*. Journal of Dental Research, 1971. **50**(6): p. 1392-1406.
24. Sampath, T.K. and A.H. Reddi, *Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(12): p. 7599-603.
25. Wozney, J.M., et al., *Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities*. Science, 1988. **242**(4885): p. 1528-34.
26. Sakou, T., *Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches*. Bone, 1998. **22**(6): p. 591-603.
27. Sieber, C., et al., *Recent advances in BMP receptor signaling*. Cytokine Growth Factor Rev, 2009. **20**(5-6): p. 343-55.

28. Storm, E.E., et al., *Limb alterations in brachypodism mice due to mutations in a new member of the TGF beta-superfamily*. Nature, 1994. **368**(6472): p. 639-43.
29. Rengachary, S.S., *Bone morphogenetic proteins: basic concepts*. Neurosurg Focus, 2002. **13**(6): p. e2.
30. Nakashima, M. and A.H. Reddi, *The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(9): p. 1025-32.
31. Wozney, J.M., *The bone morphogenetic protein family and osteogenesis*. Molecular Reproduction and Development, 1992. **32**(2): p. 160-167.
32. Cunningham, N.S., et al., *Growth/differentiation factor-10: a new member of the transforming growth factor-beta superfamily related to bone morphogenetic protein-3*. Growth Factors, 1995. **12**(2): p. 99-109.
33. Termaat, M.F., et al., *Bone morphogenetic proteins. Development and clinical efficacy in the treatment of fractures and bone defects*. J Bone Joint Surg Am, 2005. **87**(6): p. 1367-78.
34. Daluiski, A., et al., *Bone morphogenetic protein-3 is a negative regulator of bone density*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 84-8.
35. Chen, D., M. Zhao, and G.R. Mundy, *Bone morphogenetic proteins*. Growth Factors, 2004. **22**(4): p. 233-41.
36. Oida, S., et al., *Cloning and sequence of bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) from a human placental cDNA library*. DNA Seq, 1995. **5**(5): p. 273-5.
37. Leong, L.M. and P.M. Brickell, *Bone morphogenetic protein-4*. Int J Biochem Cell Biol, 1996. **28**(12): p. 1293-6.
38. Kim, M. and S. Choe, *BMPs and their clinical potentials*. BMB Rep, 2011. **44**(10): p. 619-34.
39. Bessa, P.C., M. Casal, and R.L. Reis, *Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from the laboratory to the clinic, part I (basic concepts)*. J Tissue Eng Regen Med, 2008. **2**(1): p. 1-13.
40. Bragdon, B., et al., *Bone morphogenetic proteins: A critical review*. Cellular Signalling, 2011. **23**(4): p. 609-620.
41. Buttstedt, A., *Wachstumsfaktoren der Cystin-Knoten-Familie und ihre Pro-Formen*. Biospektrum, 2011. **17** (2): p. 150-153.
42. Sun, J., et al., *BMP4 activation and secretion are negatively regulated by an intracellular gremlin-BMP4 interaction*. J Biol Chem, 2006. **281**(39): p. 29349-56.
43. Suzuki, A., et al., *Mesoderm induction by BMP-4 and -7 heterodimers*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997. **232**(1): p. 153-156.
44. Aono, A., et al., *Potent ectopic bone-inducing activity of bone morphogenetic protein- 4-7 heterodimer*. Biochem Biophys Research Comm, 1995. **210**(3): p. 670-677.
45. Neugebauer, J.M., et al., *The prodomain of BMP4 is necessary and sufficient to generate stable BMP4/7 heterodimers with enhanced bioactivity in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(18): p. E2307-E2316.
46. Liem, K.F., Jr., et al., *Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm*. Cell, 1995. **82**(6): p. 969-79.
47. Reissmann, E., et al., *Involvement of bone morphogenetic protein-4 and bone morphogenetic protein-7 in the differentiation of the adrenergic phenotype in developing sympathetic neurons*. Development, 1996. **122**(7): p. 2079-88.
48. Arteaga-Solis, E., et al., *Regulation of limb patterning by extracellular microfibrils*. J Cell Biol, 2001. **154**(2): p. 275-81.
49. Gropppe, J., et al., *Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin*. Nature, 2002. **420**(6916): p. 636-42.
50. Yamamoto, Y. and M. Oelgeschlager, *Regulation of bone morphogenetic proteins in early embryonic development*. Naturwissenschaften, 2004. **91**(11): p. 519-34.
51. Winnier, G., et al., *Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse*. Genes Dev, 1995. **9**(17): p. 2105-16.
52. Goldman, D.C., et al., *BMP4 regulates the hematopoietic stem cell niche*. Blood, 2009. **114**(20): p. 4393-401.
53. Selleck, M.A., et al., *Effects of Shh and Noggin on neural crest formation demonstrate that BMP is required in the neural tube but not ectoderm*. Development, 1998. **125**(24): p. 4919-30.
54. Kriangkrai, R., et al., *Dual odontogenic origins develop at the early stage of rat maxillary incisor development*. Anat Embryol (Berl), 2006. **211**(2): p. 101-8.
55. Furuta, Y. and B.L. Hogan, *BMP4 is essential for lens induction in the mouse embryo*. Genes Dev, 1998. **12**(23): p. 3764-75.

56. Faber, S.C., et al., *Bmp signaling is required for development of primary lens fiber cells*. Development, 2002. **129**(15): p. 3727-37.
57. Kalinovskiy, A., et al., *Development of axon-target specificity of ponto-cerebellar afferents*. PLoS Biol, 2011. **9**(2): p. e1001013.
58. Hecht, J., *Genexpressionsanalysen zum besseren Verständnis von Knochenheilung und -entwicklung*. Dissertation, Freie Universität Berlin, 2006.
59. Kingsley, D.M., *The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms*. Genes Dev, 1994. **8**(2): p. 133-46.
60. Milano, F., et al., *Bone morphogenetic protein 4 expressed in esophagitis induces a columnar phenotype in esophageal squamous cells*. Gastroenterology, 2007. **132**(7): p. 2412-21.
61. Lombardo, Y., et al., *Bone morphogenetic protein 4 induces differentiation of colorectal cancer stem cells and increases their response to chemotherapy in mice*. Gastroenterology, 2011. **140**(1): p. 297-309.
62. Duggal, R., et al., *Vaccinia virus expressing bone morphogenetic protein-4 in novel glioblastoma orthotopic models facilitates enhanced tumor regression and long-term survival*. J Transl Med, 2013. **11**: p. 155.
63. Bessa, P.C., M. Casal, and R.L. Reis, *Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery)*. J Tissue Eng Regen Med, 2008. **2**(2-3): p. 81-96.
64. Ahrens, M., et al., *Expression of human bone morphogenetic proteins-2 or -4 in murine mesenchymal progenitor C3H10T1/2 cells induces differentiation into distinct mesenchymal cell lineages*. DNA Cell Biol, 1993. **12**(10): p. 871-80.
65. Takaoka, K., et al., *Gene cloning and expression of a bone morphogenetic protein derived from a murine osteosarcoma*. Clin Orthop Relat Res, 1993(294): p. 344-52.
66. Clokie, C.M., et al., *Production of bone morphogenetic proteins (BMPs) in transgenic mammals*. US Patent App. 11/427,679, 2006.
67. Miltenybiotech, *HumanKine(TM) BMP-4*. miltenyi.com (Stand: 01.07.2015), 2015.
68. Peprotech, *Recombinant Human BMP-4 (E.coli derived)*. peprotech.com (Stand: 13.08.2015), 2015.
69. Derman, A.I., et al., *Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of Escherichia coli*. Science, 1993. **262**(5140): p. 1744-1747.
70. Herrmann, J., *Der mitochondriale Intermembranraum ist voller Überraschungen*. Biospektrum, 2013. **03.13**: p. 247-249.
71. Klösch, B., et al., *Expression and purification of biologically active rat bone morphogenetic protein-4 produced as inclusion bodies in recombinant Escherichia coli*. Biotechnology Letters, 2005. **27**(20): p. 1559-1564.
72. Bessa, P.C., et al., *Expression, purification and osteogenic bioactivity of recombinant human BMP-4, -9, -10, -11 and -14*. Protein Expression and Purification, 2009. **63**(2): p. 89-94.
73. Kübler, N.R., et al., *Biological activity of E. coli expressed BMP-4*. Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie : MKG, 1998. **2 Suppl 1**: p. S149-152.
74. Cerletti, N., et al., *European Patent 0433225A1*. 1991.
75. Wolfman, N., et al., *Refolding variant of bone morphogenetic protein-8*. US Patent 5756308, 1998.
76. Vicik, *Methods of refolding proteins by use of zwitterionic low molecular weight agents*. European Patent 1 021 528 B1, 2000.
77. Yuan, S., et al., *Recombinant BMP 4/7 fusion protein induces differentiation of bone marrow stem cells*. J Cell Biochem, 2011. **112**(10): p. 3054-60.
78. Ihm, H.J., et al., *Soluble expression and purification of synthetic human bone morphogenetic protein-2 in Escherichia coli*. BMB Rep, 2008. **41**(5): p. 404-7.
79. Huang, Y., et al., *Expression of codon optimized human bone morphogenetic protein 4 in Pichia pastoris*. Biotechnol Appl Biochem, 2014. **61**(2): p. 175-83.
80. Hazama, M., et al., *Efficient expression of a heterodimer of bone morphogenetic protein subunits using a baculovirus expression system*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **209**(3): p. 859-66.
81. Natsume, T., et al., *Interaction between soluble type I receptor for bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein-4*. J Biol Chem, 1997. **272**(17): p. 11535-40.
82. Scheufler, C., W. Sebald, and M. Hulsmeyer, *Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution*. J Mol Biol, 1999. **287**(1): p. 103-15.

83. Morimoto, T., et al., *The bone morphogenetic protein-2/7 heterodimer is a stronger inducer of bone regeneration than the individual homodimers in a rat spinal fusion model*. Spine Journal, 2015. **15**(6): p. 1379-1390.
84. Wang, E.A., et al., *Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(6): p. 2220-4.
85. Israel, D.I., et al., *Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity in vitro and in vivo*. Growth Factors, 1996. **13**(3-4): p. 291-300.
86. Maruoka, Y., et al., *Production of functional human bone morphogenetic protein-2 using a baculovirus/Sf-9 insect cell system*. Biochem Mol Biol Int, 1995. **35**(5): p. 957-63.
87. Vallejo, L.F., et al., *Renaturation and purification of bone morphogenetic protein-2 produced as inclusion bodies in high-cell-density cultures of recombinant Escherichia coli*. J Biotechnol, 2002. **94**(2): p. 185-94.
88. Ratko, T.A., et al., *Bone Morphogenetic Protein: The State of the Evidence of On-Label and Off-Label Use*. 2010, Rockville MD.
89. Ong, K.L., et al., *Off-label use of bone morphogenetic proteins in the United States using administrative data*. Spine (Phila Pa 1976), 2010. **35**(19): p. 1794-800.
90. Wikesjo, U.M., et al., *Bone morphogenetic proteins for periodontal and alveolar indications; biological observations - clinical implications*. Orthod Craniofac Res, 2009. **12**(3): p. 263-70.
91. Ruppert, R., E. Hoffmann, and W. Sebald, *Human bone morphogenetic protein 2 contains a heparin-binding site which modifies its biological activity*. European Journal of Biochemistry, 1996. **237**(1): p. 295-302.
92. Studier, F.W. and B.A. Moffatt, *Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes*. J Mol Biol, 1986. **189**(1): p. 113-30.
93. Novagen, *pET System Manual 11th Edition*. http://www.merck-chemicals.de/life-science-research/technical-bulletins/c_IMOb.s1OxkUAAAEj2xsYzMkq., 2006. Zugriff am 02.07.2015.
94. Li, Z., et al., *Simple defined autoinduction medium for high-level recombinant protein production using T7-based Escherichia coli expression systems*. Appl Microbiol Biotechnol, 2011. **91**(4): p. 1203-13.
95. Blommel, P.G., et al., *Enhanced bacterial protein expression during auto-induction obtained by alteration of lac repressor dosage and medium composition*. Biotechnol Prog, 2007. **23**(3): p. 585-98.
96. Muller, C. and U. Rinas, *Renaturation of heterodimeric platelet-derived growth factor from inclusion bodies of recombinant Escherichia coli using size-exclusion chromatography*. J Chromatogr A, 1999. **855**(1): p. 203-13.
97. Vallejo, L.F. and U. Rinas, *Optimized procedure for renaturation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 at high protein concentration*. Biotechnol Bioeng, 2004. **85**(6): p. 601-9.
98. Honda, J., et al., *Direct refolding of recombinant human growth differentiation factor 5 for large-scale production process*. J Biosci Bioeng, 2000. **89**(6): p. 582-589.
99. Dirksen, A., *Untersuchungen zur Denaturierung und Rückfaltung von Lysozym und β -Lactoglobulin*. Diplomica Verlag, 2012.
100. Vallejo, L.F. and U. Rinas, *Folding and dimerization kinetics of bone morphogenetic protein-2, a member of the transforming growth factor-beta family*. FEBS J, 2013. **280**(1): p. 83-92.
101. Honda, J., et al., *Direct refolding of recombinant human growth differentiation factor 5 for large-scale production process*. J Biosci Bioeng, 2000. **89**(6): p. 582-9.
102. Yoshinuma, N., et al., *The inhibitory effect of endotoxins on growth of human cell lines*. J Nihon Univ Sch Dent, 1994. **36**(2): p. 139-44.
103. Katagiri, T., et al., *Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage*. J Cell Biol, 1994. **127**(6 Pt 1): p. 1755-66.
104. Alexander, B., et al., *A simple and accurate mathematical method for calculation of the EC50*. J Pharmacol Toxicol Methods, 1999. **41**(2-3): p. 55-8.
105. NIBSC, *WHO Reference Reagent Bone Morphogenetic Protein-2 (Human rDNA derived) NIBSC code: 93/574 Instructions for use (Version 5.0, Dated 09/04/2013)*. NIBSC code: 93/574, 2013. Version 5.0, Dated 09/04/2013.
106. Michov, B., *Elektrophorese: Theorie und Praxis*. Berlin: De Gruyter, 1995.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Krätzig
Vorname	Matthias
Geburtsdatum	1. Oktober 1984
Geburtsort	Hannover
Nationalität	deutsch

Studium

05/2011-09/2015	Promotionsstudium am Institut für Technische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover (LUH)
10/2008-03/2011	Masterstudium „Life Science“ an der LUH, Abschluss: M. Sc.
10/2005-09/2008	Bachelorstudium Life Science“ an der LUH, Abschluss: B. Sc.

Schulbildung

10/2004-06/2005	Wehrdienst in Schwanewede und Munster
08/1997-06/2004	Geschwister-Scholl-Gymnasium, Garbsen; Abschluss: Abitur