

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Die nicht gesondert aufgeführten Chemikalien zum Ansetzen von Puffern, Medien und Reaktionslösungen wurden von Merck, Darmstadt; Sigma GmbH, Deisenhofen oder Roth GmbH, Karlsruhe in der Qualitätsstufe *pro analysis* bezogen.

3.1.2 Pufferlösungen

Die nicht gesondert aufgeführten Pufferlösungen wurden nach dem Handbuch *Molecular Cloning* (Sambrook, Russell, & Sambrook, 2001) hergestellt.

3.1.3 Enzyme

Alle nicht gesondert aufgeführten Enzyme (Restriktionsendonukleasen, Polymerasen, Ligasen, Kinasen, etc.) für Amplifizierungen, Klonierungen und Sequenzierung wurden von MBI Fermentas oder New England Biolabs bezogen.

3.1.4 Molekularbiologische Reaktionssysteme (Kits)

Tab. 2 Verwendete Kits

Bezeichnung	Hersteller
BigDye Terminator Sequencing Kit	Perkin Elmer
Gel out	A&ABiotechnology
PCR-Purification	Invisorb
Plasmid Midi	Macherey-Nagel
Plasmid Mini	A&ABiotechnology
QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
SYBR green PCR Master Mix	Applied Biosystems
Taqman Reverse Transcription Reagents	Applied Biosystems

3.1.5 Vektoren und Plasmide

Tab. 3 Verwendete Vektoren

Vektor	Hersteller	Literatur
pCDNA3.1	Invitrogen	
pSLAX-13		(B. A. Morgan & Fekete, 1996)
RCAS-A		(Hughes, Greenhouse, Petropoulos, & Sutrave, 1987)
RCAS-B		(Hughes et al., 1987)

3.1.6 Bakterienstämme

Tab. 4 Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Hersteller
E. coli TOP10	<i>F- mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) f80lacZDM15 DlacX74 deoR recA1 araD139 D(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG</i>	Invitrogen
E. coli XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZAM15 Tn10 (Tetr)]</i>	Stratagene

3.1.7 Oligonukleotid-Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden mithilfe der Software Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) entworfen und von MWG-Biotech AG synthetisiert.

Tab. 5 Mutagenese-Primer

Bezeichnung	Sequenz
chBmpr1b-I200K-f1	Pho-CTCTCCTGGTTCAAAGGACCAAAGCAAACAGATTCAGATG
chBmpr1b-I200K-r	CATCTGAATCTGTTTTGCTTTGGTCCTTTGAACCAGGAGAG
chBmpr1b-Q249R-f	GAAACAGAAATCTACCGTACTGTCCTGATGAGGCATGAAAATATTC
chBmpr1b-Q249R-r	GAATATTTTCATGCCTCATCAGGACAGTACGGTAGATTTCTGTTTC
chBmpr1b-R486W-f1	Pho-GCATCCCGGCTCACAGCCCTATGGGTCAAAAAAACTTGC
chBmpr1b-R486W-r	GCAAGTGTTTTTTGACCCATAGGGCTGTGAGCCGGGATGC
mBmpr1b-I200K-f	Pho-GCTGGTCCAAAGGACAAAAGCTAAGCAAATTCAGATGGTG
mBmpr1b-I200K-r	CACCATCTGAATTTGCTTAGCTTTTGTCTTTGGACCAGC
mBmpr1b-R486W-f	Pho-CAGGCTGACGGCCCTGTGGGTTAAGAAAACCCCTGCCAA
mBmpr1b-R486W-r	TTGGCAAGGGTTTTCTTAACCCACAGGGCCGTCAGCCTG
chGdf5-R438C-f	GGTCTGTGTGAGTTCCCCCTCTGCTCCCACCTGGAGCCCACC
chGdf5-R438C-r	GGTGGGCTCCAGGTGGGAGCAGAGGGGGAACCTCACACAGACC
chGdf5-R438L-f	GGTCTGTGTGAGTTCCCCCTCTATCCCACCTGGAGCCCACC
chGdf5-R438L-r	GGTGGGCTCCAGGTGGGATAGGAGGGGGAACCTCACACAGACC
chGdf5-L441P-f	GTTCCCCCTCCGATCCCACCCGAGCCCACCAATCACGCCG
chGdf5-L441P-r	CGGCGTGATTGGTGGGCTCCGGGTGGGATCGGAGGGGGAAC
chGdf5-N445T-f	CCCACCTGGAGCCCACCACTCACGCCGTTATCCAAAC
chGdf5-N445T-r	GTTTGGATAACGGCGTGAGTGGTGGGCTCCAGGTGGG

Tab. 6 Realtime-PCR-Primer

Bezeichnung	Sequenz
chGapdh-RT-437F	CCATGTTTGTGATGGGTGTCA
chGapdh-RT-511R	TGGTGACGATGCATTGC
chHprt-RT-119F	TCGACTACAATGAATACTTCAGAGATTTG
chHprt-RT-202R	GCTTTCATGCTTTGTACTTCTGCTT
ch β Actin-RT-129F	CAACAGAGAGAAGATGACACAGATCA
ch β Actin-RT-203R	ACAGCCTGGATGGCTACATACA
ch β Actin-+RT-166F	TTCAACACCCCAGCCATGTA
ch β Actin-+RT-235R	CAGTGGGTACGACCAGAGGCAT

Bezeichnung	Sequenz
chCol2-RT-103F	GAGGGCAACAGCAGGTTAC
chCol2-RT-172R	TGCCCCATTTGCCAGTGT
chCol10-RT-60F	CACTCTACTGCCTTGCATTGGA
chCol10-RT-145R	AACAGCAGCAGTAACGATATTTGTAAA
chIhh-RT-93F	GGCTTTGACTGGGTCTACTACGA
chIhh-RT-162R	CAGCCGAGTGCTCTGACTTG
chSox9-RT-94F	CAGTACCCGCATCTGCACAA
chSox9-RT-174R	ACGCTTCTCGCTCTCATTACAG

Tab. 7 Sequenzierungs-Primer

Bezeichnung	Sequenz
chBmpr1b-1364r	TTGGGGAATGAAGGACGTAG
chBmpr1b-1F	GAAGATGATTCTGGTGGAC
chBmpr1b-2F	GTATACTACTGGTGCTTATC
chBmpr1b-3F	GCGAAAAGGTAGCTGTCAAAG
chBmpr1b-3R	AGATACAGTTGGGTCCAAGAG
chBmpr1b-4F	CTGTTAGTGGCTTGTGCCAC
chBmpr1b-5F	GAAGAATACCAGCTCCCATATC
chGdf5-1054	AGTCCCTTTTCTTTGTCTCT
chGdf5-3'-BamHI	TGGATCCCTACCTGCAGCCACACGACT
chGdf5-429f	CTCCTTCAAACGAAGAAGA
chGdf5-5'-BsaI	ATAGGTCTCCCATGAAAATCCTGCATTTTCT
chGdf5-611r	GTTATTGTATTGGCGAGTCC
chGdf5-929f	TCGAACTGGAAACTTTTGAC
chNog-330fwd	AATCAAGGGGCTGGAGTTCT
hGDF5-5'-BsmBI	ATACGTCTCACATGAGACTCCCCAAACTCCT
hGDF5-f(+1327)	CCACGAATCATGCAGTCATC
hGDF5-f(+425)	GTCCTTCTGCTGAAGA
hGDF5-f(+899)	TCCGAACTTTAAGAACTCG
hGDF5-r(+1128)	CTGGCTGAACAGGTACTCAT
hGDF5-r(+633)	ATCTTGCCCTTTGTCAATAA
RCAS5'	ACGCTTTTGTCTGTGTGCTGC
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG

3.1.8 Medien und Puffer für die Zellkultur

Die benutzten Medien, Puffer und Zusätze für die Zellkultur wurden von der Firma Cambrex bezogen und gemäß Herstellerempfehlungen eingesetzt.

3.1.9 Einwegartikel für die Zellkultur

Plastik für die Zellkultur wurde von der Firma TPP bezogen.

3.1.10 Zelllinien

Tab. 8 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Kulturmedium
ATDC5	RIKEN	<u>Standardmedium:</u> DMEM:F12; 5% FCS; 10 mg/ml Transferrin; 30 nM Natriumselenit; 1mM L-Gln; Pen/Strep <u>Hungermedium:</u> DMEM:F12; 0.5% FCS; 1mM L-Gln; Pen/Strep
C2C12	ATCC	<u>Standardmedium:</u> DMEM (high glucose); 10% FCS; 1 mM L-Gln; Pen/Strep <u>Hungermedium:</u> DMEM (high glucose); 2% FCS; 1 mM L-Gln; Pen/Strep
C2C12-1B	AG Knaus	vergl. C2C12
COS-7	ATCC	EMEM; 10% FCS; Pen/Strep
DF-1	ATCC	DMEM; 10% FCS; 2% CS; Pen/Strep

3.1.11 Tiere

3.1.11.1 Mäuse

Die Züchtung des Maus-Wildtypstammes C57Bl/6 wurde am institutseigenen Tierhaus (MPI für molekulare Genetik) freundlicherweise von Dr. Ludger Hartmann, Ulf Schröder, Janine Wetzel und Robert Schilke durchgeführt.

3.1.11.2 Hühnerembryonen

Befruchtete SPF-Hühnereier wurden von Charles River oder Tierzucht Lohmann bezogen.

3.1.12 Datenbanken und Server

Tab. 9 Verwendete Datenbanken und Server

Datenbank / Server	Internet-Adresse
chicken EST database	http://www.chick.umist.ac.uk/
ENSEMBL	http://www.ensembl.org
EXPASY	http://www.expasy.org/
Mouse Genome Database	http://www.informatics.jax.org/
OMIM	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim
PDB	http://www.rcsb.org/pdb/
Primer3	http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi
Pubmed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed
RCAS-homepage	http://home.ncifcrf.gov/hivdrp/RCAS/stock.html
UNSW embryology	http://embryology.med.unsw.edu.au/

3.2 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Standardtechniken wie Bakterienaufzucht, Medienherstellung, Agarosegelelektrophorese, Restriktionsenzymverdau oder Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren wurden nach etablierten Protokollen durchgeführt, wie sie in dem Handbuch *Molecular Cloning* beschrieben sind (Sambrook et al., 2001).

3.2.1 Plasmid-Isolierung

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte nach einer alkalischen Lyse über Adsorptionsaufreinigung mittels Plasmid-Mini Kit oder mit größerem Ertrag mittels Plasmid-Midi Kit. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in LB-Flüssigmedium mit 50 µg/ml Ampicillin bei 37° C unter Schütteln.

3.2.2 Isolierung von DNA Fragmenten

Um einzelne DNA-Fragmente (nach PCR oder Restriktionsverdau) nach gelelektrophoretischer Auftrennung zu isolieren, wurde das Gel Out Kit verwendet. Die Aufreinigung erfolgte durch die Adsorption an eine Silika-Matrix nach den Angaben des Herstellers.

3.2.3 Aufreinigung von PCR Produkten

PCR Produkte wurden mit dem PCR Purification Kit aufgereinigt. Die Aufreinigung wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

3.2.4 RNA-Isolierung

Die Proben wurden mit peqGOLD TriFast (Peq-Lab) versetzt und gegebenenfalls mit einem Ultra-Turrax T8 (IKA Labortechnik) für 1-2 min homogenisiert. Die Isolierung der RNA erfolgte aus dem Homogenat nach einer Phenol-Chloroform Extraktion durch ethanolische Ausfällung aus der wässrigen Phase nach den Angaben des Herstellers.

3.2.5 In vitro Mutagenese

Die In vitro Mutagenese erfolgte nach dem Protokoll des QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit. Das Einführen von Punktmutationen erfolgt über eine PCR mit zwei Mutagenese-Primern, die an der entsprechenden Position nicht komplementär zur WT Sequenz sind. Als Template der Mutagenese-PCR wurde der Vektor pSLAX-13 verwendet, in den bereits die codierende Hühnchen-Sequenz von *Gdf5* oder *Bmpr1b* einkloniert war.

3.2.6 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die meisten Sequenzen mit Hilfe einer Standard PCR Methode amplifiziert. Die PCR erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz: 5 µl 10x PCR-Puffer (1.5 mM MgCl₂ f.c.; MBI Fermentas), 1 µl dNTP Mix (200 µM je Nukleotid, f.c.), 0.5 pmol forward Primer, 0.5 pmol reverse Primer, 50 ng DNA Template, 0.5 U *Taq* DNA Polymerase (10 U/µl; Invitaaq). Nach einer initialen Denaturierungsphase bei 96° C für 5 min im Thermocycler (GeneAmp; Perkin Elmer) erfolgten 30 PCR Zyklen des folgenden Standardprogrammes: Denaturierung bei 96° C für 1 min, Primer-Annealing bei 50°-65° C (in Abhängigkeit der Primer) für 1 min, Primer-Extension (in Abhängigkeit der Produktlänge, 1 min/kb) bei 72° C für 1-2 min. Zum Abschluss erfolgte ein finaler Syntheseschritt bei 72° C für 10 min, danach Kühlung bei 4° C bis zur Analyse. Die Optimierung von PCR Reaktionen erfolgte standardmäßig mit einer Veränderung der MgCl₂ Konzentration, der Zugabe von 5-10% DMSO und/oder der Zugabe von Betain.

3.2.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung von doppelsträngiger DNA erfolgte nach dem Prinzip des Didesoxy-Nukleotid Kettenabbruchs (Sanger, Nicklen, & Coulson, 1992).

3.2.8 Klonierung der RCAS-Konstrukte

3.2.8.1 Bmpr1b

Die Vektoren pSLAX und RCAS-A mit der kodierenden Sequenz von Bmpr1b aus Huhn (chicken WT Bmpr1b) wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. Lee Niswander zur Verfügung gestellt (Zou, Wieser, Massague, & Niswander, 1997).

3.2.8.2 Gdf5

Die Klonierung der kodierenden Sequenz von *Gdf5* aus Huhn und Mensch erfolgte über eine PCR-Amplifikation aus Hühner-Embryo cDNA bzw. aus dem Plasmid hGDF5 in pcDNA3.1 (freundlicherweise von Prof. Dr. Frank Luyten zur Verfügung gestellt) mit Gdf5-spezifischen Primern, die durch 5'-terminale Schnittstellen erweitert waren (für chicken Gdf5: chGDF5-5'-BsaI und chGDF5-3'-BamHI und für humanes GDF5: hGDF5-5'-BsmBI und chGDF5-3'-BamHI). Das PCR-Produkt wurde 5' mit BsaI bzw. BsmBI und 3' mit BamHI geschnitten und anschließend in den mit NcoI und BamHI linearisierten pSLAX-13 ligiert (die Bezeichnungen 5' und 3' beziehen sich auf die Position im sense-Strang der cDNA).

Das Einfügen von Mutationen erfolgte jeweils im pSLAX-13-Vektor vor der Umklonierung des Inserts in den viralen Vektor RCAS-A oder RCAS-B (vergl. Kapitel: 3.2.5 In vitro Mutagenese). Zur Umklonierung wurde das Insert mit ClaI aus dem pSLAX-13 ausgeschnitten und in die ClaI-Site des RCAS-A kloniert. Die richtige Orientierung des Inserts im RCAS-Vektor wurde mit einer PCR (RCAS5' und Gen-spezifischer 3'-Primer) überprüft.

3.2.9 Realtime-PCR

Die Realtime-PCR wird unter Verwendung von SYBR Green PCR Master Mix auf einem ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System durchgeführt. Um die Amplifikation von genomischer DNA auszuschließen, werden Intron-überspannende Primerpaare verwendet. Die Primer sind mit Hilfe der Software Primer Express (Applied Biosystems) nach den empfohlenen Spezifikationen des Herstellers ausgewählt. Präparation der cDNA: Je 1 µg Gesamt-RNA der Mikromass-Kulturen wird mit den Taqman Reverse Transcription Reagents nach den Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Die Realtime-PCR wird in einem 30 µl Reaktionsansatz durchgeführt: 10 µl 1:10 verdünnte cDNA oder Standard (ca. 1 ng), 5 µl Primer Mix (7.5 pmol je Primer) und 15 µl SYBR Green PCR Master Mix. Die PCR wird in Triplikaten in 96-well Platten auf einem ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System wie folgt durchgeführt: Hotstart-Taq Aktivierung bei 50° C für 2 min, Template Denaturierung bei 95° C für 10 min; 40 Zyklen bei 95° C für 15 sec und bei 60° C für 1 min. Im Anschluss erfolgt eine Dissoziationskurvenanalyse, die bei 60° C für 15 sec bis 95° C für 15 sec mit einer Heiz- und Kühlrate von 2% aufgezeichnet wird. Hiermit wird verifiziert, dass keine unspezifischen Produkte oder Primer-Dimere amplifiziert werden. Die Ct (threshold cycle)-Werte des Amplifikationsplots werden mit der SDS 2.0 Software bestimmt. Die relative Quantifizierung der Genexpression wird mit Hilfe der Standardkurvenmethode [User Bulletin#2, 10/2001; Applied Biosystems] durchgeführt: Hierzu wird für jede unterschiedliche cDNA Probe und das gewählte Standardtranskript Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (*Gapdh*) eine Standardkurve mit den entsprechenden Verdünnungen der cDNA erstellt. Für jede cDNA Probe wird die Menge des Zielgens und der endogenen Referenz *Gapdh* mit Hilfe der entsprechenden Standardkurve ermittelt. Anschließend wird der ermittelte Wert des Zielgens durch den Wert der endogenen Referenz geteilt. Hierdurch erhält man die normalisierte Menge des Zielgens in der jeweiligen cDNA. Den relativen Expressionsgrad erhält man, indem man den Wert für das normalisierte Zielgen durch den ebenfalls normalisierten Wert des Kalibrators (eine bestimmte cDNA Probe, z.B. die des Kontrollansatzes zum Zeitpunkt null bzw. ohne Stimulation) dividiert. Die ermittelten Werte werden als n-fache Differenz relativ zum Kalibrator angegeben.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Präparation von Mikromass-Kulturen

Die Präparation von Mikromass-Kulturen erfolgte mit leichten Modifikationen nach dem Protokoll von De Lise et al. (DeLise, Stringa, Woodward, Mello, & Tuan, 2000). Befruchtete SPF-Hühnereier werden 4.5 Tage bei 37.5° C in einem Eierinkubator (Ehret) bebrütet. Die Embryonen (Hamburger Hamilton Stadium, HH22-24) werden aus dem Ei präpariert und in PBS überführt. Die Extremitätenknospen von ca. 10-40 Embryonen pro Präparation werden abgetrennt und in HBSS (*Hank's buffered saline solution*) gesammelt. Im Anschluss erfolgt ein Verdau der Extremitätenknospen bei 37° C mit Dispase (3 mg/ml in HBSS) für ca. 15 min, bis sich das Ektoderm ablöst. Zur Entfernung des Ektoderms werden die Extremitätenknospen mehrfach mit HBSS gewaschen. Daraufhin wird der Gewebsverband durch einen Verdau mit 0.1% Collagenase Typ Ia; 0.1% Trypsin; 5% FCS in PBS ohne Ca/Mg in einem Wasserbad bei 37° C aufgelöst. Der Verdau wird durch die Zugabe von 1 ml angewärmten chMM-Standard-Mediums (DMEM:F12; 10% FCS; 0.2% CS; Pen/Strep) abgestoppt und die Zellen durch auf- und abpipettieren vereinzelt. Die Zellsuspension wird dann durch ein 40 µm Zellsieb (BD Falcon) filtriert und die Zellzahl bestimmt. Die Zellen werden für 5 min bei 1000 UpM pelletiert und das Medium abgesaugt. Die Zellkonzentration wird dann auf 2×10^7 Zellen/ml eingestellt und pro Kultur 10 µl in eine 24-Loch Platte ausgesät.

Die Überexpression von Genen in Hühner-Mikromass-Kulturen erfolgt mit Hilfe eines replikations-kompetenten Retrovirus. Der hier verwendete Retrovirus (RCAS-A) basiert auf dem Rous-sarcoma-Virus und infiziert die Mikromass-Zellen aus dem Huhn mit hoher Effizienz (Logan & Tabin, 1998; B. A. Morgan & Fekete, 1996) (vergl. Kapitel: 3.2.8 Klonierung der RCAS-Konstrukte).

Zur Infektion der Kultur wird vor dem Ausplattieren der Zellen 1 µl des Viruskonzentrats (vergl. Kapitel: 3.3.2 Präparation der RCAS-Viren) hinzugefügt und danach je 11 µl ausgesät. Die Kulturen werden 1 h bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert und im Anschluss mit 1 ml Medium versorgt. Das Medium wird alle 2-3 Tage gewechselt. Die terminale Differenzierung erfordert eine besondere Kultivierung der Mikromass-Kulturen. Hierfür wird ab dem zweiten Kultivierungstag ein spezielles

Mineralisierungsmedium (α -MEM; 10% FCS; 0.2% CS; 2 mM L-Gln; 0.6 mg/ml KH_2PO_4 ; Pen/Strep) verwendet. Die Zellen werden für mindestens 3 Wochen in Kultur gehalten, um dann die Kalzifizierung der Knorpelzellen mit Alizarin Rot nachzuweisen.

Zur Analyse der Differenzierung des Mikromass-Kultur-Systems wurden folgende Techniken eingesetzt:

1. Analyse der initialen Knorpeldifferenzierung (Matrixproduktion) mittels Alcian Blau Färbung (vergl. Kapitel: [3.5.2.1 Alcian Blau](#))
2. Nachweis von prähypertropher Knorpeldifferenzierung über die Messung der Aktivität der Knochen-Alkalischen Phosphatase (ALP-Aktivität) (vergl. Kapitel: [3.5.2.2 ALP, qualitativ](#) oder [3.4.3 ALP-Nachweis, quantitativ](#))
3. Analyse der terminalen Knorpeldifferenzierung (Kalzifizierung des Knorpels) mittels Alizarin Rot-Färbung (vergl. Kapitel: [3.5.2.3 Alizarin Rot](#))
4. Verfolgung des gesamten Differenzierungsverlaufes mittels Realtime-PCR von spezifischen Markergenen der Knorpel- und Knochenentwicklung (z.B. Collagen -2, -10, Ihh und Sox-9 (vergl. Kapitel: [3.2.9 Realtime-PCR](#)))

3.3.2 Präparation der RCAS-Viren

Die RCAS-Konstrukte werden in der Hühnerfibroblasten-Zelllinie DF-1, unter Verwendung von Lipofectamin 2000 (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers transfiziert.

Die Zellen werden passagiert, bis sechs Zellkulturschalen mit Durchmesser 15 cm konfluent bedeckt sind. Diese werden mit je 15 ml Medium bedeckt und ü. N. inkubiert. Dann wird der Virusüberstand abgenommen und in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Aufarbeitung eingefroren. Diese Prozedur wird zur Erhöhung der Gesamtausbeute insgesamt dreimal pro Platte an aufeinanderfolgenden Tagen wiederholt.

Der eingefrorene Virusüberstand wird bei 37° C aufgetaut und durch 0.45 μm Durapore-Filter (Millipore) filtriert. Anschließend werden die Viren durch Ultrazentrifugation bei 22000 UpM (Rotor SW27; Beckman) für 3 h bei 4° C aufkonzentriert und anschließend in 25 μl Aliquots in flüssigem N_2 eingefroren und bei -80° C gelagert. Um den Virustiter zu bestimmen, werden von den konzentrierten Retrovirus-Überständen Verdünnungen von 1×10^{-3} bis 1×10^{-6} angesetzt. DF-1 Zellen

(70-80% konfluent) werden in 12-well Mikrotiterplatten mit jeweils 1 µl der Verdünnungen infiziert und für zwei Tage bei 37° C inkubiert. Virus-infizierte Zellen können mit dem monoklonalen Antikörper 3C2 (Logan and Tabin, Material und Methoden 22 1998) markiert und mit dem Vectastain Kit (Vector) nach Angaben des Herstellers detektiert werden. Dabei entspricht die Zahl der gefärbten Zellen (N) in der 1×10^{-5} -Verdünnung einem Virustiter von $N \times 10^8$ IU (infectious units) pro ml. Für eine effiziente Infektion sind mindestens 1×10^7 IU/ml erforderlich.

3.3.3 Differenzierung von C2C12 Zellen

C2C12 ist eine murine Muskelvorläufer-Zelllinie, welche in vitro zu Myoblasten, Osteoblasten oder Adipozyten differenzieren kann. Zur Differenzierung werden C2C12 Zellen auf Deckgläschen in einer Dichte von 1×10^5 Zellen/ml in Wachstumsmedium (DMEM 4.5g/L Glukose; 10% FCS; Pen/Strep) ausgesät. Nach 24 h werden die Zellen mit rekombinanten Proteinen in FCS-reduziertem Medium (DMEM 4.5g/L Glukose; 2% FCS; Pen/Strep) über 5 Tage stimuliert. Ein Medienwechsel mit erneuter Zugabe der Stimulantien erfolgt an Tag 3. Die Zellen werden 2x mit PBS gewaschen und anschließend 15 min mit 4% PFA/PBS bei RT fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgt der Nachweis der Differenzierung zu Myoblasten durch eine anti-Myosin-Immunzytologie (vergl. Kapitel: [3.4.2.2 anti-Myosin](#)) und der Nachweis der Osteoblastendifferenzierung durch eine ALP-Färbung (vergl. Kapitel: [3.5.2.2 ALP qualitativ](#)).

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Western Blot Analyse

Probenvorbereitung:

DF-1 Zellen (Hühnerfibroblasten) werden in Wachstumsmedium (DMEM; 10% FCS; 2% CS; Pen/Strep) gehalten und mit konzentriertem Virusüberstand (WT chicken (ch)Gdf5, R438C chGdf5 oder R438L chGdf5 bzw. EGFP als Negativkontrolle) infiziert. Nach der Expansionsphase werden die Zellen mit einem FCS-reduzierten Medium (DMEM; 2% FCS; 0.2% CS; Pen/Strep) versetzt und ü. N. weiter inkubiert. Der Medienüberstand wird am nächsten Tag gesammelt, und die darin enthaltenen Proteine werden mit dem gleichen Volumen Aceton bei -20° C ü. N. gefällt. Nach einer

Zentrifugation für 25 min bei 12500 UpM und 4° C (Eppendorf-Zentrifuge 5417R) werden die Proteine des Medienüberstandes pelletiert und anschließend in nicht-reduzierendem Probenpuffer (0.1M Tris-HCl, pH 8.8; 2% SDS; 20% Glycerin; 0.01% Bromphenolblau) resuspendiert. Die Zellen werden trypsiniert, zentrifugiert und anschließend in Lysepuffer (50 nM HEPES, pH 7.5; 50 mM NaCl; 10 mM EDTA; 10% Glycerol; 1% Triton X100; complete mini (Roche); PMSF) aufgenommen und lysiert. Das Zelllysate wird dann ebenfalls mit nicht-reduzierendem Probenpuffer versehen.

SDS-PAGE

Die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese dient zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe (Laemmli, 1970). Die Auftrennung sowie die anschließende Überführung der Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgen mit dem Hoefer System. Es werden 15%ige Polyacrylamid Trenngele gegossen, deren Stärke 1 mm beträgt. Die Proteinproben wurden für 5 min bei 55° C im Heizblock erhitzt und danach mit einer Hamiltonpipette auf das Gel aufgetragen. Der Lauf des Gels erfolgte bei 40-80 V bis zum Herauslaufen der Bromphenolblau-Lauffront nach etwa 2 h.

Proteintransfer und Antikörper-Detektion

Der Proteintransfer auf die mit Methanol aktivierte Immobilon-P Transfer Membran (Millipore) erfolgt in Western Blot Kammern bei 25 V ü. N. bei 4° C. Zum Blockieren unspezifischer Bindungen werden 5% Milchpulver in PBST gelöst. Die Membran wird mit dieser Blockierungslösung für eine Stunde bei RT inkubiert. Daraufhin erfolgt die Inkubation mit einem monoklonalen Antikörper gegen den N-terminalen Bereich des reifen GDF5 (aMP-5, 1:1500; Biopharm GmbH) ü. N. bei 4° C in Blockierungslösung. Anschließend wird die Membran 3x 10 min mit PBST gewaschen, bevor der in Blockierungspuffer verdünnte Sekundär-Antikörper (anti-mouse IgG-HRP, 1:2000; Calbiochem) auf die Membran gegeben wird. Nach 1 h Inkubation bei RT wird die Membran erneut 3x 10 min mit PBST gewaschen. Die Immunodetektion erfolgt schließlich mittels eines *enhanced chemiluminescence* Systems (ECL-Detektionssystem; Roth) und Exposition eines Röntgenfilms. Die Expositions- und Entwicklungsdauer werden der Signalstärke angepasst und liegen zwischen 1-10 min für die Exposition und 3-6 min für die Entwicklung.

3.4.2 Immunzytologie

3.4.2.1 anti-HA

COS-7 Zellen werden mit dem pcDNA3.1-basierten Expressionsvektor für mBmpr1b-HA mit Polyfect (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers transfiziert. Nach 48 h Inkubationszeit werden die transfizierten Zellen 2x mit serumfreiem Medium gewaschen und 1 h in serumfreiem Medium bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert, damit die Rezeptoren an die Membran gelangen. Das Medium wird entfernt, die Zellen werden mit PBS gewaschen und dann mit 4% PFA/PBS bei RT für 15 min fixiert. Danach wird erneut mit PBS gewaschen und die Zellen geblockt. Die Blockierung erfolgt bei RT für mindestens 45 min mit Blockierungs-Lösung (10% FCS/PBS). Es folgt die Inkubation mit dem Primär-Antikörper (anti-HA-Kaninchen (Sigma); 1:100 in Blockierungslösung) in einer feuchten Kammer für 1 h bei RT. Danach wird jeweils 3x kurz und 3x für 5 min. mit PBS gewaschen. Nun erfolgt eine einstündige Inkubation bei RT mit dem Sekundär-Antikörper (AlexaFluor 488 Ziege-anti-Kaninchen IgG (Vector); 1:1000 in Blockierungslösung). Nach gründlichem Waschen mit PBS werden die Glasplättchen mit Fluoromount-G (Electron Microscopy Sciences) auf Objektträgern eingedeckelt. Die Proben werden dann an einem Laser Scanning Mikroskop (LSM) von Zeiss ausgewertet.

3.4.2.2 anti-Myosin

Differenzierte C2C12 Zellen werden mit PBS gewaschen und danach für 15 min mit 4% PFA/PBS bei RT fixiert. Die Zellen werden 3x mit PBS gespült und im Anschluss für 30 min in MST (DMEM; 10% FCS; 0.2% Triton-X-100) blockiert. Danach erfolgt eine Inkubation mit dem Primär-Antikörper (anti-Myosin-IgGmouse (Sigma); 1:300 in MST) 1 h bei RT oder ü. N. bei 4° C. Ungebundener Antikörper wird durch dreimaliges Waschen mit MST entfernt, und es folgt die Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper (biotin-anti-mouseIgG (Vector); 1:400 in MST; 0.5% Pferdeserum) für 30 min bei RT. Ungebundener Sekundär-Antikörper wird durch dreimaliges zehninütiges Waschen mit PBST entfernt. Es folgt die Inaktivierung endogener Peroxidasen durch 30-minütiges Inkubieren der Zellen mit 0.3% Wasserstoffperoxid in Methanol. Nach

dreimaligem Waschen mit PBST schließt sich nun eine Inkubation mit Meerrettich-Peroxidase gekoppeltem Avidin (Vectastain Kit; Vector) und nach zweimaligem Waschen mit PBST die Peroxidase-Reaktion mittels DAB-Färbung (DAB Substrate Kit for Peroxidase; Vector) an.

3.4.3 ALP-Nachweis, quantitativ

ATDC5, C2C12 oder C2C12-1B Kulturen werden in einer Konzentration von 1×10^4 Zellen pro Loch einer 96-Loch Platte in Standardmedium ausgesät. Am nächsten Tag erfolgt die Stimulation der Zellen mit rekombinanten Proteinen (BMP2, GDF5, GDF5-Mutanten, NOG) in den jeweils angegebenen Konzentrationen in Hunger-Medium. Es werden jeweils Triplikate eines Ansatzes angefertigt und als Negativkontrolle ein Ansatz unstimuliert belassen. Das Hunger-Medium wird nach 72 h Stimulation entfernt, die Zellen mit 100 μ l PBS gewaschen und für eine Stunde in 100 μ l ALP-Puffer1 (0.1 M Glycine; 1% NP-40; 1 mM $MgCl_2$; 1 mM $ZnCl_2$) bei RT lysiert. Zu 100 μ l Lysat pro Loch werden 100 μ l ALP-Puffer2 (5 mM pNPP; 0.1 M Glycine; 1 mM $MgCl_2$; 1 mM $ZnCl_2$) gegeben und bei 37° C inkubiert bis eine intensive Gelbfärbung eintritt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von 50 μ l 1 M NaOH gestoppt. Die 96-er Platte wird dann in einem Platten-Reader bei 405 nm photometrisch bestimmt. Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase wird durch Berücksichtigung der Reaktionsdauer als Aktivität in Absorptionseinheiten pro Minute angegeben.

Mikromass -ALP-Nachweis, quantitativ

Für die quantitative ALP Bestimmung werden die Kulturen mit PBS gewaschen und anschließend in ALP-Puffer1 (0.1 M Glycin; 1% NP-40; 1 mM $MgCl_2$; 1 mM $ZnCl_2$) mit Hilfe eines Ultra-Turrax homogenisiert und lysiert. Die Extrakte werden für 10 min bei 12500 UpM abzentrifugiert und 100 μ l des Überstandes mit gleichem Volumen ALP-Puffer2 (5 mM pNPP; 0.1M Glycin; 1mM $MgCl_2$; 1mM $ZnCl_2$) versetzt. Nun erfolgt eine Inkubation bei 37° C bis ein deutlicher Farbumschlag ins Gelbe sichtbar wird. Die Alkalische Phosphatase wird durch die Abspaltung von p-Nitrophenol aus p-Nitrophenyl-Phosphat nachgewiesen. Die ALP-Aktivität bezeichnet die Menge gebildeten p-Nitrophenols pro Minute pro mg Protein. Eine Quantifizierung der Reaktion erfolgt photometrisch bei 405 nm. Die Proteinmenge wird ebenfalls photometrisch mit Hilfe des BCA-Kits (Pierce) nach Angaben des Herstellers bestimmt.

3.5 Histologische Methoden

3.5.1 In situ Hybridisierung

3.5.1.1 Transkription DIG-markierter Sonden

Die in-vitro Transkription und die Markierung mit Digoxigenin-UTP (DIG-UTP) erfolgt mit dem DIG-RNA-Labeling Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers.

Tab. 10 Verwendete Sonden

Sonde	Referenz
<i>mBmp2</i>	(Zou et al., 1997)
<i>mBmpr1a</i>	(E. A. Morgan, Nguyen, Scott, & Stadler, 2003)
<i>mBmpr1b</i>	(Baur, Mai, & Dymecki, 2000)
<i>mGdf5</i>	(Stricker, Fundele, Vortkamp, & Mundlos, 2002)
<i>mNog</i>	(Albrecht et al., 2002)

3.5.1.2 Wholemount In situ Hybridisierung (WISH)

Für die WISH werden Mausembryonen der Stadien E11.5-E13.5 präpariert und ü. N. in 4% PFA/PBS fixiert. Die fixierten Embryonen werden durch eine aufsteigende Methanolreihe dehydriert und entfettet und dann in 100% Methanol bei -20° C gelagert. Zur Hybridisierung werden die Embryonen in einer absteigenden Methanolreihe rehydriert, in 6% Wasserstoffperoxid für eine Stunde gebleicht und für 3-8 min mit Proteinase K (10 µg/ml) bei RT verdaut. Nach gründlichem Waschen mit PBST werden die Embryonen für 20 min in Fixierlösung (4% PFA; 0.2% Glutaraldehyd) fixiert und wiederum mehrfach in PBST gewaschen. Zur Prähybridisierung werden die Embryonen für eine Stunde bei 65° C in Hybridisierungspuffer (50% Formamid; 5x SSC; 5% Heparin; 0.1% Tween-20) inkubiert, dann wird die denaturierte Sonde zugegeben (Endkonzentration ca. 0.25 µg/ml). Die Hybridisierung erfolgt ü. N. bei 65° C. Die Embryonen werden zunächst 2x 30 min bei 65° C mit frischem Hybridisierungspuffer gewaschen und dann auf RT abgekühlt, anschließend erfolgt ein RNase A-Verdau (10 µg/ml) bei 37° C. Danach wird mehrfach mit Formamid-Puffer (2xSSC; 50% Formamid; 0.1% Tween20) bei 65° C gewaschen, gefolgt von zweimaligem Waschen in

MABT (100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl; pH7.5 mit NaOH eingestellt; 0.1% Tween-20). Zur Blockierung für die nachfolgende Antikörperinkubation werden die Embryonen mit 10% Blocking Reagent (Roche) in MABT behandelt. Es erfolgt die Antikörperinkubation ü. N. bei 4° C (anti-DIG-Fab (Roche), 1:5000 in MABT). Ungebundene Antikörper werden durch 24-stündiges Waschen mit 0.05% Levamisol (Sigma) in PBST mit mehrfachem Lösungswechsel ausgewaschen. Zur Signaldetektion werden die Embryonen in AP-Puffer (0.1 M NaCl; 0.05 M MgCl₂; 0.1% Tween-20; 0.1 M Tris-HCl pH 9.5; 0.05% Levamisol) überführt und 3x für 20 min äquiliert und anschließend mit BM Purple gefärbt. Zur Konservierung der Signale werden die Embryonen zunächst 3x mit AP-Puffer gewaschen und dann für eine Stunde in Fixierlösung (4% PFA; 0.2% Glutaraldehyd) fixiert. Zur fotografischen Auswertung werden die Präparate schließlich in 80% Glycerin überführt und dort gelagert.

3.5.1.3 In situ Hybridisierung auf Paraffinschnitten (ISH)

Die In situ Hybridisierung wird auf 7 µm Paraffin-Schnitten von Paraffin-eingebetteten Mäuse-Vorderpfoten, Stadium E13.5 und E14.5, unter der Verwendung von DIG-markierten RNA-Sonden durchgeführt (vergl. Kapitel: 3.5.1.1 Transkription DIG-markierter Sonden).

Die Paraffinschnitte auf Objektträgern werden 1 h auf 60° C erhitzt und anschließend auf RT abgekühlt. Es folgt ein Entparaffinierungsschritt für 2x 10 min in Xylen und eine Rehydrierungsreihe (2x 100% EtOH; 75% EtOH; 50% EtOH; 25% EtOH; 2x PBS) mit einer 5 min Inkubationszeit pro Schritt bei RT. Die Gewebeschnitte werden 10 min in 4% PFA/PBS fixiert und danach 3x 5 min mit PBT (PBS; 0.1% Tween-20) gewaschen. Danach erfolgt ein Proteinase K Verdau für 5 min und anschließendes Waschen mit PBT für 2x 5 min. Die Schnitte werden erneut 5 min in 4% PFA/PBS bei RT fixiert, 3x 5 min mit PBT gewaschen und anschließend 10 min acetyliert mit 625 µl Essigsäure-A-Anhydrid in 250 ml 0.1 M TEA (Triethanolamin). Nach dreimaligem Waschen für 5 min in PBT erfolgt die Prä-Hybridisierung für 1-4 h bei 65° C in einer feuchten Kammer mit Hyb-Lösung (10 mM Tris pH7.5; 600 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0.25% SDS; 10% Dextran Sulfat; 1x Denhardt's; 200 µg/ml Hefe tRNA; 50% Formamid). Anschließend wird die DIG-markierte Sonde (2 µl) mit 100 µl Hyb-Lösung auf 85° C für 5 min erhitzt und auf Eis schnell abgekühlt, bevor sie auf die

Gewebeschnitte gegeben wird und ü. N. bei 65° C in einer feuchten Kammer hybridisiert. Es folgt Waschen mit 5xSSC bei 65° C und eine 30-minütige Inkubation bei 65° C in Formamidlösung (50% Formamid in 1xSSC). Danach werden die Gewebeschnitte 10 min bei 37° C mit RNase-Waschpuffer (400 mM NaCl; 10 mM TrisHCl, pH 7.5; 5 mM EDTA) gewaschen. Es folgt ein RNA-Verdau mit 20 µg/ml RNaseA in RNase-Waschpuffer für 30 min bei 37° C. Die RNaseA wird mit 2x SSC und 2x mit 0.2x SSC für je 20 min bei 65° C gewaschen. Es folgt eine zweimalige Inkubation mit MABT (100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl; pH7.5 mit NaOH einstellen; 0.1% Tween-20) für je 5 min bei RT. Danach werden die Schnitte in 20% HISS/MABT für 2 h bei RT geblockt. Danach erfolgt eine Inkubation ü. N. bei 4° C mit anti-DIG-AP-Lösung (α -DIG-AP, 1:2500 in 5% Schaf-Serum in MAB, 0.5% Tween-20) in einer feuchten Kammer. Die Detektion erfolgt am nächsten Tag nach viermaligem Waschen mit MABT für je 5 min und einer zehnminütigen Inkubation mit NTMT (100 mM NaCl; 100 mM Tris pH 9.5; 50 mM MgCl₂; 0.1% Tween-20) und anschließender Inkubation mit BM Purple. Wenn das Signal stark genug ist, wird die Färbelösung durch Waschen mit NTMT entfernt. Es folgen zwei Waschschritte mit PBS für je 5 min und eine finale Fixierung in 4% PFA/PBS für 30 min bei RT. Die Schnitte werden mit dest Wasser gewaschen und anschließend mit Hydro-Matrix (Hydro-Tech-Lab) eingedeckelt.

3.5.2 Klassische Färbungen

3.5.2.1 Alcian Blau

Die Mikromass-Kulturen werden mit PBS gewaschen und mit Kahles Fixierlösung (28.9% EtOH; 0.37% Formaldehyd; 3.9% Eisessig) für 10 min bei RT fixiert. Im Anschluss werden die Kulturen mit PBS gewaschen und mit einer 1%igen Alcian Blau Lösung (Alcian Blau gelöst in 1 N HCl) ü. N. bei RT inkubiert. Am nächsten Tag wird die Färbelösung abgenommen und die Kulturen mit dest. Wasser gewaschen bis sich kein Alcian Blau mehr herauslöst. Die Kulturen werden getrocknet und zu Dokumentationszwecken fotografiert. Danach erfolgt eine Quantifikation der Alcian Blau-Inkorporation durch eine Inkubation ü. N. mit 500 µl 6 M Guanidin-HCl. Die Absorption des Überstands wird am nächsten Tag photometrisch bei einer Wellenlänge von 595-650 nm bestimmt.

3.5.2.2 ALP, qualitativ

Die Zellen werden mit PBS gewaschen und danach für 15 min mit 4% PFA/PBS bei RT fixiert. Es folgt dreimaliges Waschen mit PBS und im Anschluss eine Inkubation für 30 min in CHAP-Puffer (100 mM TRIS, pH 9.5; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl). Nach Zugabe von NBT-BCIP (45 µl NBT; 35 µl BCIP in 10 ml CHAP-Puffer) erfolgt die Entwicklung eines lila Farbniederschlags innerhalb von 15 min. Die Reaktion wird durch Zugabe von TE-Puffer abgestoppt. Die Salze werden durch Waschen mit dest Wasser entfernt und die Kulturen vor dem Fotografieren getrocknet.

3.5.2.3 Alizarin Rot

Die Mikromass-Kulturen werden mit PBS gewaschen und mit 4% PFA/PBS für 15 min bei RT fixiert. Im Anschluss wird 2x mit PBS gewaschen. Die Färbung erfolgt mit Alizarin Rot-Lösung (0.5% Alizarin Rot S, pH 4) für 10 min bei RT. Im Anschluss werden die Kulturen mit dest Wasser klargespült, getrocknet und fotografiert.

3.5.3 Elektronenmikroskopie

Für die elektronenmikroskopische Analyse der Mikromass-Kulturen werden diese auf sterilen Thermanox-Plättchen (Nunc) ausgesät. Nach 5 Tagen in Kultur werden die Zellen in Fixierlösung (3% Formaldehyd; 0.2% Glutaraldehyd) fixiert, in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert, in LR White (London Resin Company) eingebettet und bei 45° C über 3 Tage lang ausgehärtet. Die 70 nm Ultradünnschnitte werden mit Bleicitrat und Uranylacetat nachkontrastiert. Die Auswertung der Proben erfolgt an einem Philips CM 100 Elektronenmikroskop.

3.6 Bioinformatische Methoden

3.6.1 Sequenz-Alignments

Sequenz-Alignments wurden mit CLUSTALX (Thompson, Gibson, Plewniak, Jeanmougin, & Higgins, 1997) berechnet und mit CHROMA farbig dargestellt (Goodstadt & Ponting, 2001).

3.6.2 Protein-3D-Darstellung

Bilder der 3D-Molekularstrukturen wurden mit der UCSF Chimera Software von der Computer Graphics Laboratory, University of California, San Francisco dargestellt (gefördert durch die NIH P41 RR-01081) (Pettersen et al., 2004).

3.6.3 Protein-Struktur-Vorhersage

Die 3D-Struktur der intrazellulären Domäne von BMPRI1B wurde mit SWISS-MODEL Protein Modelling Server berechnet (Guex & Peitsch, 1997; Peitsch, Wells, Stampf, & Sussman, 1995; Schwede, Kopp, Guex, & Peitsch, 2003).