

Alexander Marmé  
Dr. med.

## **Klonierung und eukaryontische Expression von Wildtyp- und Chimeren-Konstrukten der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren 1 und 7**

Geboren am 16.07.1968 in Freiburg  
Reifeprüfung am 10.05.1988 in Freiburg  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1990 bis SS 1997  
Physikum am 16.03.1992 an der Universität Freiburg  
Klinisches Studium in Heidelberg, Birmingham, UK  
Praktisches Jahr in Heidelberg, Basel  
Staatsexamen am 06.11.1997 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)  
Doktorvater: Prof. Dr. med. Norbert Fusenig

Ziel dieser Arbeit war die Klonierung von FGF1 und FGF7 Wildtyp-Konstrukten sowie von Konstrukten, bei denen die sogenannte Bridge-Region zwischen den FGF-Isoformen FGF1 und FGF7 ausgetauscht wird. Diese Bridge-Region ist eine C-terminale Region, die bei allen Isoformen große Sequenzunterschiede aufweist. Sie beinhaltet bei FGF1 die Aminosäuren 115-121, bei FGF7 die Aminosäuren 154-163. Diese Konstrukte sollten dann anschließend in Säugetierzellen exprimiert werden.

In einem ersten Schritt gelang die Klonierung der Wildtyp-Konstrukte von FGF1 (W1 und dW1) und FGF7 (W7 und dW7), sowie der Chimeren Ch 1/7 und Ch 7/1 in den pCDNA 3-Vektor. Die Chimere Ch 1/7 beginnt mit der FGF1-Sequenz an die sich die Bridge-Region und der C-Terminus von FGF7 anschließt. Die Chimere Ch 7/1 beginnt entsprechend mit der FGF7 Sequenz, an die sich dann Bridge-Region und C-Terminus von FGF1 anschließt. Alle Konstrukte wurden mit Restriktionsanalysen und Sequenzierung überprüft und die Richtigkeit der Sequenz festgestellt.

Da die N-terminal mit der FGF1-Sequenz beginnenden Konstrukte keine Signalsequenz enthielten, um den Export dieser Proteine aus der Zelle zu ermöglichen, wurden an die Konstrukte W1, dW1 sowie Ch 1/7 jeweils Ig-Heavy-Chain-Signalsequenz bzw. die hst/KS3-Signalsequenz kloniert. Alle diese Konstrukte ließen sich in einem *in vitro*-Translationsverfahren synthetisieren. Die Konstrukte W1, dW1, W7 sowie Ch 1/7 ließen sich in COS-Zellen exprimieren, wobei W7 aus dem Nährmedium aufgereinigt werden konnte und im Western-Blot Verfahren mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen wurde. Die rekombinanten Proteine W1, dW1 und Ch 1/7 konnten nur in Präparationen aus dem Zellextrakt nachgewiesen werden. Ein Nachweis von aufgereinigtem Protein aus dem Nährmedium war hier weder bei den Konstrukten mit Ig-Heavy-Chain-Signalsequenz noch bei denen mit hst/KS3-Signalsequenz möglich.

Da die nach der Transfektion von COS-Zellen nicht nachweisbaren rekombinanten Proteine dW7 und Ch 7/1 sowohl bei der Sequenzierung die richtige Sequenz aufwiesen, als auch im *in*

*vitro*-Translationsverfahren synthetisiert werden konnten, liegt es nahe, daß der fehlende Nachweis nicht auf eine fehlende Expression in den transfizierten Zellen, sondern auf ein Nichterkennen durch die benutzten Antikörper zurückzuführen ist.

Die rekombinanten Proteine W1, dW1 und Ch 1/7 wurden auch nach der Klonierung zweier verschiedener N-terminaler Signalsequenzen nicht aus der Zelle exportiert. Diese Konstrukte waren so optimiert, daß von den besten Voraussetzungen für den Export des Proteins und das Abtrennen des Signalpeptids auszugehen war. Es ist also nicht wahrscheinlich, daß ein weiterer Versuch einer transienten Transfektion von COS-Zellen mit einem eine andere Signalsequenz enthaltenden Konstrukt zum Erfolg führt. Es ist deshalb im weiteren Verlauf eine stabile Transfektion von NIH3T3-Zellen mit diesen Konstrukten anzustreben. Sollte dieses Vorgehen zum Erfolg führen, können die im Rahmen dieser Arbeit klonierten Konstrukte sicher wesentlich zum Verständnis der Wirkung und Regulationmechanismen der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Familie beitragen.