

**Die Prodomäne des Knochenwachstumsfaktors GDF5:
biophysikalische Charakterisierung und Untersuchung
krankheitsassoziierter Varianten**

Dissertation

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

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Herrn Tino Thieme

geb. am 08.02.1985 in Merseburg

Gutachter:

1. Prof. Dr. Elisabeth Schwarz
2. Prof. Dr. Mike Schutkowski
3. Prof. Dr. Yves Muller

Promotionsgesuch eingereicht am: 05. Februar 2015

Tag der öffentlichen Verteidigung: 03. Juni 2015

Inhalt

1 Einleitung.....	1
1.1 <i>Bone Morphogenetic Proteins</i> (BMPs).....	1
1.1.1 Funktion	1
1.1.2 Struktur und Biogenese	2
1.1.3 Signaltransduktion und Regulation.....	5
1.2 Die umfangreichen Prodomänen der TGF- β -Superfamilie.....	6
1.2.1 Funktion	6
1.2.2 Struktur	8
1.3 <i>Growth and Differentiation Factor</i> (GDF) 5	10
1.3.1 Durch Mutationen im <i>gdf5</i> -Gen ausgelöste Krankheiten.....	12
1.3.2 Bedeutung von GDF5 für Medizin und Therapie	14
1.4 Zielstellung.....	15
2 Materialien und Methoden	17
2.1 Materialien	17
2.1.1 Chemikalien.....	17
2.1.2 Standards und <i>Kits</i>	17
2.1.3 Enzyme und Antikörper	18
2.1.4 <i>E. coli</i> -Stämme	18
2.1.5 Plasmide und <i>Primer</i>	19
2.1.6 Säulen und Säulenmatrizes zur Chromatographie	20
2.1.7 Geräte und Zubehör.....	20
2.1.8 Puffer und Medien	22
2.2 Methoden	22
2.2.1 Molekular- und mikrobiologische Methoden.....	22
2.2.2 Proteinchemische Methoden	25
2.2.3 Chromatographische Methoden.....	27
2.2.4 Biochemische und biophysikalische Methoden	30

3 Ergebnisse.....	42
3.1 Die Charakterisierung der Prodomäne von GDF5	42
3.1.1 Herstellung der isolierten Prodomäne	42
3.1.2 Die Prodomäne zeigt eine definierte Sekundär- und Tertiärstruktur.....	44
3.1.3 Die isolierte Prodomäne liegt als Monomer vor.....	48
3.1.4 Die Prodomäne wird durch GDF5 stabilisiert	49
3.1.5 Die Prodomäne bindet nicht-kovalent an GDF5	52
3.1.6 Die Prodomäne beeinflusst vermutlich die Rezeptorbindung von GDF5.....	55
3.2 Vergleichende Charakterisierung krankheitsassoziierter Prodomänenvarianten	57
3.2.1 Die Varianten weisen strukturelle Unterschiede auf	58
3.2.2 Limitierte Proteolyse bestätigt die strukturellen Unterschiede.....	61
3.2.3 Beide krankheitsassoziierte AS-Austausche führen zu einer Veränderung der thermodynamischen Stabilität.....	63
3.2.4 Der Austausch T201P reduziert die Affinität der Prodomäne zu GDF5.....	66
3.3 Die Charakterisierung des Kernfragments der GDF5-Prodomäne	67
3.3.1 Herstellung des Kernfragments	68
3.3.2 Das Kernfragment zeigt definierte Sekundär- und Tertiärkontakte.....	69
3.3.3 Das Kernfragment zeigt eine kooperative, reversible Denaturierung.....	72
3.3.4 Eine Wechselwirkung zwischen dem Kernfragment und GDF5 kann nicht eindeutig belegt werden	73
3.3.5 Vorbereitende Arbeiten zur Strukturaufklärung des Kernfragments.....	75
3.3.6 NMR-Untersuchungen	77
4 Diskussion	79
4.1 Die isolierte Prodomäne	79
4.2 Potentielle Funktionen der Prodomäne	83
4.3 Biochemische Konsequenzen der krankheitsassozierten Varianten.....	86
4.4 Das Kernfragment, eine Subdomäne der Prodomäne	90
5 Zusammenfassung und Ausblick	94
5.1 Die Charakterisierung der Prodomäne von GDF5	94

5.2 Vergleichende Charakterisierung krankheitsassoziierter Prodomänenvarianten	94
5.3 Die Charakterisierung des Kernfragments der GDF5-Prodomäne	95
5.4 Ausblick.....	95
6 Anhang.....	97
6.1 Herstellung von GDF5, proGDF5 und der BMPR1A-Ektodomäne	97
6.2 Dekonvolution der Fern-UV-CD-Spektren	98
6.3 Limitierte Proteolyse der proGDF5-Varianten	99
6.4 SPR-Daten zu den Prodomänenvarianten	100
6.5 AS-Sequenzalignement der Prodomänen von GDF5 und TGF- β 1	101
6.6 Originaldaten des Peptid- <i>Microarrays</i>	102
7 Literaturverzeichnis.....	103
8 Abkürzungsverzeichnis	118

1 Einleitung

1.1 *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs)

Im Jahr 1965 beschrieb Marshall R. Urist die Fähigkeit demineralisierter Knochenmatrix, die ektope Knochenneubildung in Nagern zu induzieren (Urist, 1965). Später konnte diese Beobachtung einer Proteinklasse zugeordnet werden, die als *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs) bezeichnet wurde (Urist & Strates, 1971). Anfang der 80er Jahre gelang es erstmals, diese BMPs anzureichern und näher zu untersuchen (Sampath & Reddi, 1981; Urist *et al.*, 1983). 1988 wurden die ersten drei Vertreter der Proteinfamilie (BMP1, BMP2A und BMP3) isoliert, funktionell charakterisiert und die für sie kodierenden Gene in einer humanen cDNA-Datenbank identifiziert (Wozney *et al.*, 1988). In den folgenden Jahren wurde eine Vielzahl an weiteren Vertretern der BMP-Familie entdeckt, sodass deren Anzahl derzeit auf 20 angestiegen ist (ten Dijke, 2006).

Schon im Rahmen der ersten Charakterisierung konnten die BMPs aufgrund ihrer Sequenzhomologie in die *Transforming Growth Factor* (TGF) β -Superfamilie eingeordnet werden (Wozney *et al.*, 1988). Weiterhin unterscheidet man innerhalb der BMP-Familie, basierend auf dem Ausmaß der Sequenzidentität, einzelne Untergruppen (Reddi, 1998). Eine Ausnahme bildet BMP1, eine Metalloprotease, die keinerlei strukturelle Gemeinsamkeiten mit anderen BMPs aufweist (Wozney *et al.*, 1988). Da die einzelnen Vertreter der BMP-Familie unter verschiedenen Umständen entdeckt wurden, werden sie teilweise als *Osteogenic Proteins* (OPs), *Cartilage-Derived Morphogenetic Proteins* (CDMPs) oder *Growth and Differentiation Factors* (GDFs) bezeichnet (Ducy & Karsenty, 2000).

1.1.1 Funktion

Die BMPs sind endo-, auto- und parakrin wirkende Zytokine und übernehmen sowohl in der Embryonalentwicklung als auch im adulten Organismus eine Vielzahl an Funktionen. Dabei kann die Funktion einzelner Wachstumsfaktoren abhängig von deren Wirkkonzentration, dem Zeitpunkt der Genexpression, der Bindung an unterschiedliche Rezeptorsubtypen (siehe 1.1.3) und dem Zusammenwirken mit anderen Wachstumsfaktoren variieren.

Die Neubildung von Knochen und Gelenken stellt in diesem Zusammenhang die bekannteste Funktion dar. Der Einfluss der BMPs umfasst den gesamten Ablauf der Knochen- und Knorpelentstehung (Wozney, 2002; Yoon & Lyons, 2004). Die Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten, Osteoklasten und Chondrozyten sowie die vorhergehende Infiltration der Zellen und die anschließende Vaskularisierung des gebildeten Gewebes werden durch BMPs vermittelt. BMP2, BMP6 und BMP9 gelten als die Vertreter mit

der stärksten osteogenen Wirkung (Cheng *et al.*, 2003). Dem gegenüber stehen BMP3 und BMP12, die nur sehr geringe oder keine osteogene Aktivität aufweisen. Bei BMP3 handelt es sich sogar um einen Antagonisten zu BMP2 und somit einen negativen Regulator des Knochenwachstums, dessen *knock out* im Mausmodell zu einer erhöhten Knochendichte führt (Daluiski *et al.*, 2001). Über die Knochenbildung hinaus reguliert die Familie der BMPs eine Vielzahl an biologischen Prozessen, vor allem während der Zelldifferenzierung bei der Organogenese (Hogan, 1996). Von BMP10 ist bekannt, dass es eine wichtige Rolle in der Herzentwicklung spielt und in der Maus ausschließlich bei diesem Entwicklungsschritt exprimiert wird (Neuhaus *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2004). BMP7 wirkt neben der Steuerung der Skelettentwicklung auch auf die Nierenentwicklung und stimuliert die Ausbildung der Glomeruli (Dudley *et al.*, 1995; Luo *et al.*, 1995). Weiterhin ist das Protein an der Entwicklung des Auges beteiligt. Einige BMPs steuern die Entwicklung des zentralen und peripheren Nervensystems, indem sie sowohl Art als auch Anzahl der gebildeten Neuronen kontrollieren (Liu & Niswander, 2005). Außer den zahlreichen positiven Wirkungen auf Zellproliferation und -differenzierung können BMPs auch inhibitorische Effekte bewirken. Für BMP2, BMP4 und BMP7 ist bekannt, dass sie während der Embryogenese gewebspezifisch zur Apoptose führen (Macias *et al.*, 1997; Song *et al.*, 1998).

Neben der Wirkung der BMPs während der Embryogenese sind auch zahlreiche Funktionen bekannt, die sie im adulten Organismus übernehmen. Analog zur osteogenen Aktivität in den Entwicklungsstadien wird später die Knochenhomöostase reguliert (Hentunen *et al.*, 1995). Je nach Belastung der Knochen oder bei der Knochenheilung kann deren Dichte über das Verhältnis zwischen Osteoblasten und Osteoklasten ausbalanciert werden. Dabei können BMP2 und BMP7 entgegen ihrer osteogenen Wirkung in der Embryogenese als Auslöser für den Osteoklasten-vermittelten Knochenabbau wirken (Kaneko *et al.*, 2000). Myostatin (GDF8) wirkt inhibierend auf das Wachstum von Muskelfasern und wird durch Trainingsreize herunterreguliert (Lee, 2004). Zusätzlich zur Aufrechterhaltung der Homöostase in Geweben haben BMPs auch Einfluss auf Stoffwechselaktivitäten. So steuert BMP9 die Glukosehomöostase in der Leber, indem es die Glukoseproduktion inhibiert und die Adipogenese des braunen Fettgewebes anregt (Chen *et al.*, 2003; Kuo *et al.*, 2014).

1.1.2 Struktur und Biogenese

Die Proteine der BMP-Familie werden als Vorläuferproteine synthetisiert und bestehen aus einem Signalpeptid, einer Prodomäne und dem reifen Wachstumsfaktor (Abb. 1.1A). Das in der Regel 20 bis 25 Aminosäuren (AS) umfassende Signalpeptid vermittelt den kotranslationellen Transport in das endoplasmatische Retikulum (ER). Am N-Terminus des Proproteins befindet sich die Prodomäne, die bei fast allen Vertretern der Proteinfamilie den

reifen Teil um das Zwei- bis Dreifache an Molekülmasse übersteigt und meist aus 220 bis 300 AS besteht. Den Prodomänen wird eine Vielzahl von Funktionen zugesprochen, die im Folgenden noch näher beschrieben werden. C-terminal der Prozessierungsstelle der Prodomäne befindet sich der eigentliche, funktionelle Wachstumsfaktor mit ungefähr 100 bis 130 AS.

Die erste Struktur eines reifen Wachstumsfaktors aus der TGF- β -Superfamilie wurde 1992 veröffentlicht und als sehr ungewöhnlich und neuartig beschrieben, da sie stark von einer globulären Form abweicht (Daopin *et al.*, 1992; Schlunegger & Grütter, 1992). Trotz teils nur mäßiger Übereinstimmungen der AS-Sequenzen der verschiedenen reifen Domänen war schon früh abzusehen, dass diese auffällige Topologie in der gesamten Proteinfamilie konserviert vorliegt (Griffith *et al.*, 1996) (Abb. 1.1B). Ein Monomer der ausnahmslos dimerbildenden Proteine wird sehr oft mit einer flachen Hand verglichen (Daopin *et al.*, 1992). Die Finger entsprechen in diesem schematischen Vergleich zwei antiparallelen β -Faltblättern, die aus jeweils zwei Einzelsträngen bestehen. Sie laufen in einer sogenannten "wrist"-Region zusammen, die durch eine α -Helix charakterisiert und in der Größe variabel ist (Rider & Mulloy, 2010). Dadurch bildet sich eine konkave „Handfläche“ und ein konvexer „Handrücken“ aus. Diese Struktur wird durch den sogenannten Cystinknoten stabilisiert, der die einzelnen Bereiche des Monomers und deren Position zueinander festlegt (McDonald & Hendrickson, 1993). Der Cystinknoten, ein hochkonserviertes Strukturmotiv, entsteht, indem vier der sechs konservierten Cysteine durch die Ausbildung der zwei intramolekularen Disulfidbrücken Cys_{II}-Cys_V und Cys_{III}-Cys_{VI} mit dem Peptidrückgrat einen acht AS umfassenden Ring bilden, durch den die dritte Disulfidbrücke Cys_I-Cys_{IV} hindurchtritt (Abb. 1.1C). Weiterhin ist in der Sequenz des Pentapeptids zwischen den Cysteinen Cys_{II} und Cys_{III} ein Glycin konserviert, das im Ring die nötigen sterischen Freiheiten gewährleistet (Isaacs, 1995).

Der Cystinknoten und die dadurch vorgegebene Struktur kompensieren vermutlich die Abwesenheit eines hydrophoben Kerns in den Wachstumsfaktoren der TGF- β -Superfamilie (Scheufler *et al.*, 1999). Die Ausbildung eines antiparallelen Dimers führt dazu, dass viele der exponierten hydrophoben Reste zwischen den beiden Monomeren abgeschirmt werden. Bei den meisten Vertretern werden diese Dimere durch eine intermolekulare Disulfidbrücke stabilisiert, die sich durch ein siebtes konserviertes Cystein bildet, welches unmittelbar N-terminal zu Cys_{IV} gelegen ist. Lediglich GDF3, GDF9 und BMP15 liegen als nicht-kovalent gebundene Dimere vor (Rider & Mulloy, 2010). Der Bereich N-terminal zu Cys_I ist in vielen verfügbaren Kristallstrukturen nicht definiert. Er scheint äußerst flexibel zu sein, sobald er nicht, wie beispielsweise bei TGF- β 1, durch ein zusätzliches Disulfid fixiert wird. Für einige BMPs ist in diesem Bereich eine Heparin-Bindestelle nachgewiesen, die an der extrazellulären Positionierung der Wachstumsfaktoren beteiligt ist (Ruppert *et al.*, 1996; Ohkawara *et al.*, 2002).

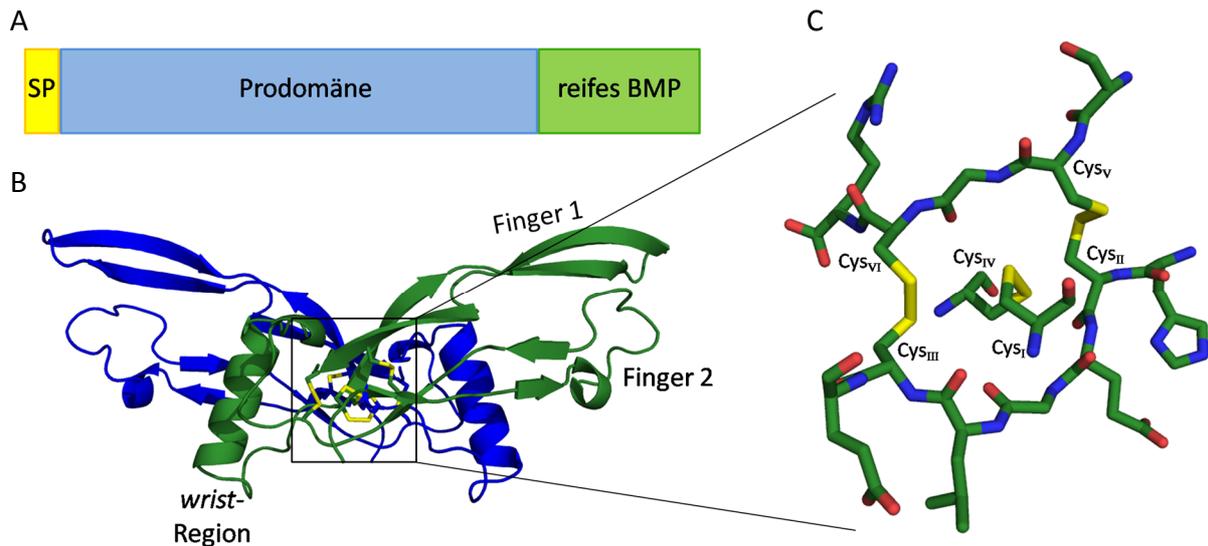


Abbildung 1.1: (A) Schema eines BMP-Vorläuferproteins. Gezeigt sind Signalpeptid (SP; gelb), Prodomäne (blau) und reifes BMP (grün). (B) Kristallstruktur des GDF5-Dimers in der *cartoon*-Darstellung (PDB-Code: 1WAQ, Nickel et al. 2005). Die GDF5-Monomere sind in blau und grün dargestellt, Disulfidbrücken sind als Stabdarstellung gezeigt mit den Schwefelatomen in gelb. (C) Detailliarstellung des Cystinknoten-Motivs eines Monomers in der Stabdarstellung. Kohlenstoffatome sind in grün, Stickstoffatome in blau, Sauerstoff in rot und Schwefel in gelb dargestellt.

Die verschiedenen BMPs zeigen nicht nur sehr heterogene Funktionen, sie unterscheiden sich auch sehr stark in ihren Expressionsmustern. BMPs wirken meist an Orten der epithelial-mesenchymalen Interaktion, wo sie die Entstehung und Ordnung neuer Gewebe kontrollieren (Ducy & Karsenty, 2000). Besonders in der Embryonalentwicklung sind Zeitpunkt, Ort, Dauer und Ausmaß der Expression eines BMPs von enormer Bedeutung, um die gewünschte zelluläre Differenzierung oder ein gerichtetes Wachstum zu erzielen (Hogan, 1996; Macias *et al.*, 1997; Cheng *et al.*, 2003).

Nach einem kotranslationellen Transport des Präproteins in das ER wird das Signalpeptid abgespalten und das Proprotein nimmt seine native Konformation ein. Die korrekte Faltung eines Monomers stellt dabei die Voraussetzung für die Bildung der antiparallelen Dimere dar (Hillger *et al.*, 2005). In der Regel liegen BMPs als Homodimere vor, obwohl für einige nah verwandte Vertreter auch Heterodimere nachgewiesen wurden (Liao *et al.*, 2003; Valera *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2012). Nach der Dimerisierung erfolgt die proteolytische Abspaltung der Prodomäne durch *Subtilisin-like Proprotein Convertases* (SPC) wie Furin (Constam & Robertson, 1999). Die Prozessierung findet C-terminal zur basischen Konsensussequenz RXXR statt, die sich am C-terminalen Ende der Prodomäne befindet. Im weiteren Verlauf wird der prozessierte Wachstumsfaktor durch das Golgi-Netzwerk transportiert, wo einige BMPs im Prä-Helix-Loop glykosyliert werden (Rider & Mulloy, 2010). Abschließend erfolgt die Sekretion

des reifen Wachstumsfaktors. Zahlreiche Publikationen belegen, dass statt des reifen BMP-Moleküls ein nicht-kovalenter Proproteinkomplex freigesetzt wird (Gentry & Nash, 1990; Jones *et al.*, 1994; Hill *et al.*, 2002). Von einigen Vertretern ist auch bekannt, dass sie aufgrund einer unvollständigen Prozessierung als Proprotein sezerniert werden. In diesem Fall wird die Spaltung durch extrazellulär vorkommende SPCs katalysiert (Beck *et al.*, 2002; Lories *et al.*, 2003).

1.1.3 Signaltransduktion und Regulation

Ihre Wirkung entfalten die extrazellulär lokalisierten BMPs über membranständige Rezeptoren. Diese bestehen aus einer extrazellulären Ligandenbindedomäne (Ektodomäne), einer α -helikalen Transmembrandomäne und einer intrazellulären Serin-Threonin-Kinasedomäne (ten Dijke *et al.*, 2003). Es wird zwischen dem hochaffinen Rezeptortyp 1 und dem niederaffinen Rezeptortyp 2 unterschieden (Nohe *et al.*, 2002). Das Bindeepitop für eine Ektodomäne des Typ 1 bildet sich aus der konkaven „Handfläche“ des einen Monomers und der α -Helix des anderen. Die Typ 2-Ektodomänen binden die konvexen „Handrücken“ (Allendorph *et al.*, 2006). Für die Aktivierung der Rezeptoren durch ein gebundenes BMP-Dimer und die anschließende intrazelluläre Signaltransduktion ist ein Heterotetramer aus einem Rezeptortyp 1-Dimer und einem Rezeptortyp 2-Dimer nötig (Wrana *et al.*, 1994). Abhängig von der Art der Bildung des Rezeptor-Liganden-Komplexes kommt es zu zwei verschiedenen Mechanismen der Signalweiterleitung in den Zellkern (Gilboa *et al.*, 2000; Hassel *et al.*, 2003).

Einerseits existiert in der Zellmembran auch in Abwesenheit eines Liganden ein sogenannter *Preformed Complex* (Nohe *et al.*, 2002). Durch die Ligandenbindung an das bereits bestehende Heterotetramer kommt es zur Aktivierung der SMAD-Signalkaskade. Andererseits kann BMP zuerst an den hochaffinen Rezeptortyp 1 binden und dadurch die Rekrutierung des Typ 2-Rezeptors und die Bildung eines *BMP Induced Signalling Complex* induzieren (Iwasaki *et al.*, 1999). Die daraus resultierende Signalweiterleitung geschieht über die p38/MAPK-Kaskade.

Interessanterweise konnten für die 20 bekannten Vertreter der BMP-Familie bisher nur fünf Typ 1-Rezeptoren (BMPR1A, BMPR1B, ActR1, TSR1 und T β R1) und drei Typ 2-Rezeptoren (BMPR2, ActR2 und ActR2B) identifiziert werden (Müller & Nickel, 2012). Dadurch wird von einer gewissen Promiskuität ausgegangen, da mehrere Liganden die gleichen Kombinationen aus Typ 1- und Typ 2-Rezeptoren aktivieren. Weiterhin ist belegt, dass einige BMPs an verschiedene Rezeptoroligomere binden (ten Dijke *et al.*, 1994). Es wird allerdings vermutet, dass die *in vivo* vorhandenen Möglichkeiten der Liganden-Rezeptor-Kombination durch die Expressionsmuster der einzelnen Proteine stark reduziert sind (Müller & Nickel, 2012).

Eine zusätzliche Regulation der BMP-Aktivität erfolgt im extrazellulären Raum durch Antagonisten wie NOGGIN, Chordin und Follistatin (Piccolo *et al.*, 1996; Zimmerman *et al.*, 1996; Iemura *et al.*, 1998). Diese Proteine konkurrieren um die Bindung der BMPs an deren Rezeptoren und verhindern somit eine Signalweiterleitung. Außerdem gibt es membranständige Pseudorezeptoren und intrazellulär sogenannte *Inhibitory* SMADs, die direkt in die Signalkaskade eingreifen (Onichtchouk *et al.*, 1999; Itoh *et al.*, 2001).

1.2 Die umfangreichen Prodomänen der TGF- β -Superfamilie

Eine wichtige, aber bisher nur teilweise verstandene Funktion in der Steuerung der BMP-Aktivität kommt der Prodomäne zu. Diese enthält die zwei- bis dreifache AS-Anzahl des reifen Wachstumsfaktors und wird meistens vor der Sezernierung im ER proteolytisch abgespalten. Es wird aber auch von extrazellulärer Prozessierung und nicht-kovalent verbundenen Proproteinen berichtet (Gentry & Nash, 1990; Beck *et al.*, 2002). Durch Assoziation mit dem reifen Teil übt sie eine Vielzahl von Funktionen hinsichtlich Regulation, Bioverfügbarkeit oder Lokalisierung aus. Die bisher nachgewiesenen Funktionen sind sehr divergent und nicht in der Proteinfamilie konserviert.

1.2.1 Funktion

Bei einigen Vertretern hat die Prodomäne bereits während der Biogenese Einfluss auf den reifen Teil. Von TGF- β 1 ist aus Zellkulturversuchen bekannt, dass die reife Domäne in Abwesenheit der Prodomäne nicht als funktionelles Dimer sezerniert wird (Gray & Mason, 1990). Eine Coexpression von separater Prodomäne und reifem Teil führte jedoch zur Sekretion. Dies zeigt, dass eine kovalente Verbindung zwischen TGF- β 1 und dessen Prodomäne nicht nötig ist. Mittlerweile wird vermutet, dass die Prodomäne von TGF- β 1 die Lage der Monomere zueinander verändert und durch die Zugänglichkeit des intermolekularen Cystins für Disulfidisomerasen die Dimerisierung beeinflusst (Shi *et al.*, 2011). Diese Fähigkeit der Prodomänen, als intramolekulares Chaperon zu wirken, wurde außerdem noch für die beiden anderen Vertreter *Activin A* und BMP2 nachgewiesen, wobei bei letzterem eine kovalente Verbindung zwischen Prodomäne und dem reifen Wachstumsfaktor notwendig ist (Kuhfahl & Schwarz, 2014). In *in vitro*-Versuchen konnten die reifen Domänen verschiedener Vertreter auch in Abwesenheit der Prodomäne renaturiert werden. Allerdings konnte unter anderem für Myostatin gezeigt werden, dass die Prodomäne essentiell für das Erreichen der nativen Faltung und die Dimerisierung des rekombinant hergestellten Proteins ist (Jin *et al.*, 2004). In Zellkulturstudien war die Prodomäne von TGF- β 1 in Abwesenheit der reifen Domäne in der Lage, einen nativen Faltungszustand anzunehmen (Gentry & Nash, 1990). Demnach

kann davon ausgegangen werden, dass die Prodomäne bei diesem Vertreter entweder vor oder gleichzeitig mit dem Wachstumsfaktor faltet. Bei dem *Macrophage-inhibitory Cytokine 1* (MIC-1), einem weiteren Mitglied der TGF- β -Superfamilie, kontrolliert die Prodomäne die korrekte Faltung der reifen Domäne, indem ein N-terminaler Bereich der Prodomäne den proteolytischen Abbau von falschgefalteten MIC-1-Molekülen induziert (Bauskin *et al.*, 2000).

Eine andere, wahrscheinlich weit verbreitete Funktion ist die Vermittlung der Löslichkeit unter physiologischen Bedingungen (Ruppert *et al.*, 1996; Plöger *et al.*, 2008). Aufgrund ihres isoelektrischen Punktes und der Exposition hydrophober Reste auf der Oberfläche sind die meisten reifen BMPs bei neutralem pH-Wert nur sehr schlecht löslich. Die Proproteine besitzen in der Regel eine deutlich bessere Löslichkeit, weshalb angenommen wird, dass die Prodomäne die hydrophoben Reste maskiert und somit die reife Domäne in Lösung hält. Darüber hinaus konnte für einige Vertreter wie beispielsweise BMP7 oder BMP2 gezeigt werden, dass deren Prodomänen mit hoher Affinität an eine N-terminale Region der extrazellulären Matrixproteine Fibrillin-1 und 2 binden (Gregory *et al.*, 2005; Sengle *et al.*, 2008a, 2011). Der nicht-kovalent verbundene Proproteinkomplex wird lokal konzentriert und eine unkontrollierte Verbreitung des reifen Wachstumsfaktors durch Diffusion vom Ort seiner Freisetzung wird verhindert. Diese Funktion hat einen derart starken Einfluss auf die Wirkung der BMPs, dass Mutationen im Gen von Fibrillin vergleichbare Phänotypen auslösen können wie sie von Mutationen in BMP-Genen bekannt sind (Nistala *et al.*, 2010; Al Kaissi *et al.*, 2013).

Eine weitere Funktion der Prodomänen liegt in der Regulation der Aktivität der assoziierten Wachstumsfaktoren. So ist von den analogen Proteinen TGF- β 1, 2 und 3 bekannt, dass sie im Komplex mit ihren als *Latency-Associated Peptide* (LAP) bezeichneten Prodomänen auch nach der proteolytischen Reifung inaktiv sind (Böttlinger *et al.*, 1996). Dabei schirmt die Prodomäne die Rezeptorbindeepitope ab und verhindert die Signalweiterleitung (De Crescenzo *et al.*, 2001). Auch Myostatin und GDF11 sind im nicht-kovalenten Komplex mit ihrer Prodomäne inaktiv (Thies *et al.*, 2001; Ge *et al.*, 2005), wobei für Myostatin die Inhibierung der Rezeptorbindung belegt werden konnte. Die Proform von BMP2 ist ebenfalls inaktiv und konkurriert mit dem reifen Wachstumsfaktor um die Rezeptorbindung, resultierend in einer Inhibierung der Signalweiterleitung (Hauburger *et al.*, 2009). Bei BMP7 und BMP9 wurde gezeigt, dass die nicht-kovalent verbundenen Komplexe aus reifem Teil und Prodomäne eine vergleichbare Aktivität besitzen wie die freien Wachstumsfaktoren (Brown *et al.*, 2005; Sengle *et al.*, 2008b). Für BMP7 wurde jedoch belegt, dass die BMP-bindenden Typ 2-Rezeptoren eine höhere Affinität zum Wachstumsfaktor besitzen als die Prodomäne. Dadurch konkurrieren die Rezeptoren mit der Prodomäne um den Wachstumsfaktor und die tatsächliche Rezeptoraktivierung findet in Abwesenheit der Prodomäne statt. Die Aktivität des *Anti-Mullerian Hormone* (AMH) wird im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Beispielen durch die Komplexbildung mit dessen Prodomäne erheblich verstärkt statt verringert (Wilson *et al.*,

1993). Demnach ist auch die latenzvermittelnde Funktion der Prodomäne nicht über alle Vertreter konserviert.

Die Freisetzung des aktiven Wachstumsfaktors aus dem inaktiven Proproteinkomplex verläuft bei den einzelnen Vertretern nach unterschiedlichen Mechanismen. Bei TGF- β 1 erfolgt bereits intrazellulär eine kovalente Anlagerung eines *Latent TGF- β Binding Protein* (LTBP) an das Proprotein (Miyazono *et al.*, 1991). Nach der Sekretion lagert sich der Komplex an Integrin an, wodurch vermutlich eine an den entgegengesetzten Enden der Prodomäne wirkende Zugkraft zu einer strukturellen Umlagerung führt und reifes TGF- β 1 freigesetzt und somit aktiviert wird (Annes *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2011). Bei Myostatin und GDF11 führt eine proteolytische Spaltung innerhalb der Prodomäne durch eine BMP1/Tolloid-Metalloprotease zur Freisetzung des Wachstumsfaktors (Ge *et al.*, 2005; Anderson *et al.*, 2008). Von BMP4 ist bekannt, dass sich in dessen Prodomäne eine zweite, weniger spezifische Furin-Spaltstelle N-terminal des eigentlichen Prozessierungsmotivs befindet, die für die Regulation der Aktivität mitverantwortlich ist (Cui *et al.*, 2001; Sopory *et al.*, 2006). Eine weitere Möglichkeit der Freisetzung besteht in der konkurrierenden Bindung des Wachstumsfaktors an Prodomäne bzw. Rezeptor, wodurch der höheraffine Rezeptor die Prodomäne aus dem Komplex verdrängt (Sengle *et al.*, 2008b).

Der *Nerve Growth Factor* (NGF), ein neurotropher Wachstumsfaktor, der ebenfalls einen Cystinknoten und eine ausgedehnte Prodomäne enthält, besitzt in Anwesenheit der Prodomäne eine vollkommen andere Funktion (Lee *et al.*, 2001; Nykjaer *et al.*, 2004). Während reifes NGF das Wachstum und Überleben von Nervenzellen fördert, induziert proNGF deren Apoptose. Eine vergleichbare Wirkweise für die BMP-Familie konnte bisher jedoch noch nicht nachgewiesen werden.

1.2.2 Struktur

Zur Struktur der Prodomänen der TGF- β -Superfamilie ist nur sehr wenig bekannt. Die einzige bisher aufgeklärte Struktur eines Proproteins zeigt TGF- β 1 mit den beiden Prodomänen (Shi *et al.*, 2011) (Abb. 1.2). In der ringförmigen Struktur schließt der sogenannte "*straitjacket*"-Bereich der Prodomänen den reifen Wachstumsfaktor ein. Die N-terminale, amphipathische α -Helix 1 ist über hydrophobe Wechselwirkungen tief zwischen den beiden Monomeren positioniert und führt zu einer strukturellen Umlagerung von TGF- β 1, wodurch das Bindeepitop des Rezeptortyp 1 verformt wird. C-terminal der Helix liegt das prolinreiche "*latency lasso*", welches die beiden „Finger“ eines Monomers des Wachstumsfaktors umschließt und dadurch das Bindeepitop für den Rezeptortyp 2 abschirmt. Es wird angenommen, dass die Prodomäne und die reife Domäne, die miteinander interagieren, nicht

in demselben Polypeptid liegen, ein Großteil der Interaktionen also intermolekular ausgebildet wird. Den strukturellen Kern einer Prodomäne bildet die "arm domain", die aus zwei viersträngigen antiparallelen β -Faltblättern und drei kurzen α -Helices besteht und viele hochkonservierte, hydrophobe Reste enthält. Die Dimerisierung der Prodomänen erfolgt über ein als "bow tie" bezeichnetes Strukturmotiv durch je ein doppelsträngiges antiparalleles β -Faltblatt und zwei intermolekulare Disulfidbrücken. C-terminal zum "bow tie" befindet sich ein RGD-Motiv, welches im extrazellulären Raum die Bindung an Integrin vermittelt.

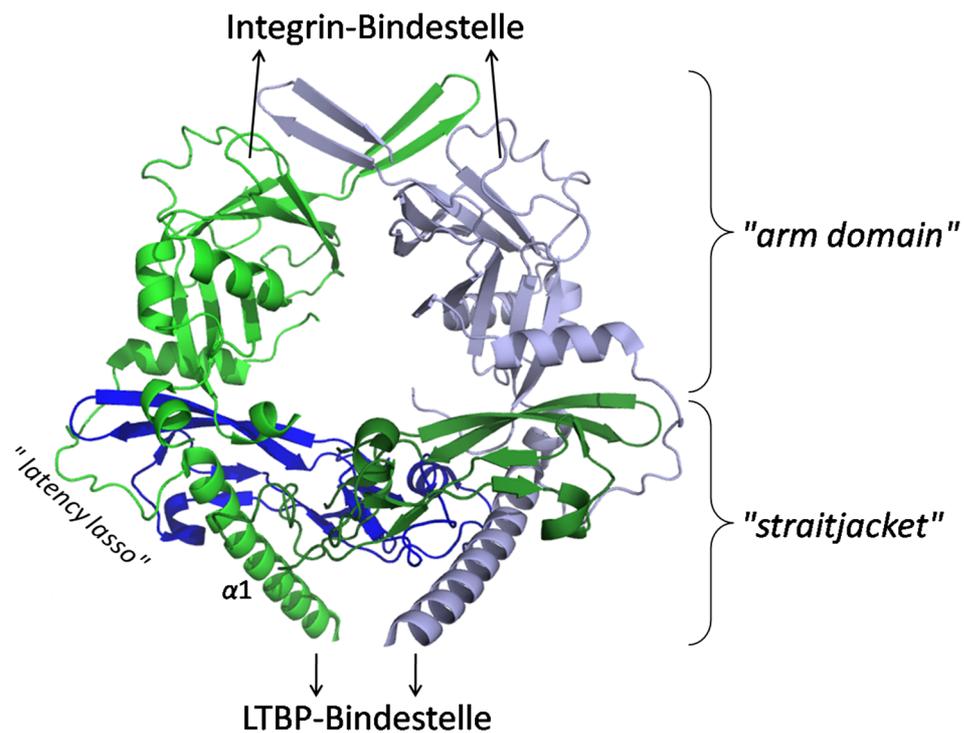


Abbildung 1.2: Kristallstruktur des proTGF- β 1-Dimers in der *cartoon*-Darstellung (PDB-Code: 3RJR, Shi et al. 2011). Die TGF- β 1-Monomere sind in blau und grün dargestellt, die jeweils zugehörigen Prodomänen in hellblau und hellgrün.

Aufgrund einem in der Veröffentlichung gezeigten Sequenzvergleich zwischen TGF- β 1 und den anderen Vertretern der TGF- β -Superfamilie wird die Hypothese aufgestellt, dass alle Prodomänen eine vergleichbare Struktur aufweisen (Shi et al., 2011). Allerdings ist diese Hypothese wegen einer teilweise sehr geringen Sequenzidentität und deutlicher Unterschiede in der AS-Anzahl kritisch zu betrachten.

1.3 Growth and Differentiation Factor (GDF) 5

Das in dieser Arbeit behandelte GDF5 ist ein Vertreter der BMP-Familie und wird auch als BMP14 oder CDMP1 bezeichnet. Aufgrund der hohen Sequenzidentität bildet es gemeinsam mit GDF6 und GDF7 eine eigene Untergruppe innerhalb der BMPs. GDF5 wurde erstmals 1994 im Zusammenhang mit dem Phänotyp *brachypodism* (*bp*) in Mäusen beschrieben, der durch eine Inaktivierung des *gdf5*-Gens induziert wurde (Storm *et al.*, 1994). Diese *knock out*-Maus ist durch eine Verkürzung der Extremitätenknochen und die Verformung bzw. Abwesenheit einzelner Gelenke charakterisiert.

GDF5 wirkt hauptsächlich während der Embryonalentwicklung in den Gelenkregionen der Arme und Beine sowie im Brustbein (Chang *et al.*, 1994; Storm & Kingsley, 1996). Das in den Knorpelprimordien der Gliedmaßen gebildete GDF5 induziert dort die Chondrogenese in den Gelenkflächen (Buxton *et al.*, 2001). Der dazwischenliegende Gelenkspalt wird dabei durch das Expressionsmuster der zur Prozessierung notwendigen Proproteinkonvertasen, der verschiedenen Rezeptoren und dem Antagonisten NOGGIN festgelegt (Brunet *et al.*, 1998; Baur *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2006). Weiterhin führt GDF5 im Zuge der endochondralen Ossifikation zur Aggregation von mesenchymalen Stammzellen und anschließend zur Differenzierung zu Chondrozyten und deren Wachstum (Hötten *et al.*, 1996). GDF5 konnte ausschließlich in den Gliedmaßen detektiert werden, in axialen Skelettregionen scheint diese Aufgabe von anderen Vertretern der BMP-Familie übernommen zu werden. Im Muskelgewebe von Ratten wurde durch GDF5 die Bildung von Knochen, Knorpel, Sehnen und Bändern induziert (Hötten *et al.*, 1996; Wolfman *et al.*, 1997). Daher ist anzunehmen, dass der Einfluss von GDF5 auf die Gelenkbildung über die Ausbildung des Gelenkspalts hinausgeht. Beispielsweise waren in *bp*-Mäusen die Achillessehnen stark beeinträchtigt, da diese weicher und weniger reißfest als im Wildtyp waren (Mikic *et al.*, 2001). Diese Schwächung konnte mit einem verringerten Kollagenanteil und strukturell veränderten Kollagenfasern begründet werden. Weiterhin konnte anhand des *bp*-Maus-Modells ein genereller Einfluss von GDF5 auf Kollagen 1-reiche Gewebe festgestellt werden. So wurde beispielsweise gezeigt, dass die Knochen von GDF5-defizienten Mäusen eine gering vernetzte Struktur aufweisen und dadurch biegsam und wenig bruchresistent sind (Mikic *et al.*, 2002). An den Bandscheiben von *bp*-Mäusen wurde eine veränderte Kollagenzusammensetzung und eine Verringerung der Größe beobachtet (Li *et al.*, 2004). Als weiteres Kollagen 1-reiches Gewebe war auch die Haut von *bp*-Mäusen dünner und weniger elastisch als die des Wildtyps (Battaglia, 2005). Durch chemotaktische Einwanderung von Endothelzellen induziert GDF5 außerdem die Angiogenese während der endochondralen Ossifikation (Yamashita *et al.*, 1997). Die Entwicklung des zentralen Nervensystems wird ebenfalls durch GDF5 beeinflusst. Ähnlich wie die zwei neurotroph wirkenden Proteine TGF- β 3 und *Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor*

(GDNF) schützt GDF5 dopaminerge Nervenzellen und begünstigt deren Überleben (Kriegstein *et al.*, 1995). Darüber hinaus fördert es im sich entwickelnden Hippocampus das Wachstum von Dendriten (Osório *et al.*, 2013).

Im adulten Organismus reguliert GDF5 die Knorpelhomöostase durch Stimulation der Stoffwechselaktivität der Chondrocyten (Erlacher *et al.*, 1998). GDF5 beeinflusst auch die Heilung von Knochenfrakturen, da es die Bildung des an der Bruchstelle entstehenden Kallus begünstigt (Chhabra *et al.*, 2005). Die Regeneration von Sehndefekten war in GDF5-defizienten Mäusen um mehrere Wochen verzögert (Chhabra *et al.*, 2003). Zudem wird davon ausgegangen, dass GDF5 auf die Wundheilung einwirkt, indem es die Bildung des Wundgranulationsgewebes und die physiologische Angiogenese sowie die Zellmigration fördert (Schiefer *et al.*, 2014).

GDF5 wird als ein 501 AS umfassendes Vorläuferprotein exprimiert. Der reife Wachstumsfaktor besteht aus 120 AS, während die Prodomäne 354 AS enthält. Wie bei allen Vertretern der TGF- β -Superfamilie weist das GDF5-Monomer die typische, an eine flache Hand erinnernde Tertiärstruktur auf (Schreuder *et al.*, 2005). Die Monomere werden durch einen Cystinknoten stabilisiert und bilden disulfidverbrückte Homodimere. Zwischen Prodomäne und Wachstumsfaktor befindet sich die doppelt überlagerte Spaltsequenz RRKRR³⁸¹, die theoretisch die Prozessierung an zwei verschiedenen Positionen ermöglicht (Hötten *et al.*, 1996). Dabei konnte im Krallenfrosch gezeigt werden, dass zur vollständigen Prozessierung von GDF5 sowohl Furin (SPC 1) als auch SPC 6 notwendig ist (Thomas *et al.*, 2006). Die Signaltransduktion erfolgt durch Bindung an die Typ 1-Rezeptoren BMPR1A und BMPR1B und die Typ 2-Rezeptoren ActR2, ActR2B und BMPR2 (Nishitoh *et al.*, 1996; Erlacher *et al.*, 1998). GDF5 zeigt eine zehn- bis 20-fach höhere Affinität für BMPR1B als für BMPR1A (Nickel *et al.*, 2005; Heinecke *et al.*, 2009). Während der hochaffine BMPR1B hauptsächlich für die Induktion der Chondrogenese in der Embryonalentwicklung verantwortlich ist, spielt BMPR1A eine wichtige Rolle in der Knorpelhomöostase im adulten Organismus (Zou *et al.*, 1997; Rountree *et al.*, 2004).

Eine Besonderheit von proGDF5 liegt darin, dass es eine der größten Prodomänen der BMP-Familie besitzt, die mit 354 AS nahezu drei Viertel des gesamten Proproteins ausmacht. Zur Funktion der GDF5-Prodomäne ist nur sehr wenig bekannt. So ist GDF5 im Krallenfrosch vor der Prozessierung inaktiv (Thomas *et al.*, 2006). Außerdem ist die Prodomäne des humanen GDF5 in der Lage, Fibrillin bzw. LTBP1/2 nicht-kovalent zu binden (Sengle *et al.*, 2008a; Farooq *et al.*, 2013). Die Struktur der Prodomäne ist bisher ungeklärt.

1.3.1 Durch Mutationen im *gdf5*-Gen ausgelöste Krankheiten

Die Ausbildung eines funktionellen Bewegungsapparates erfordert ein präzises Zusammenspiel nahezu aller BMPs. Abweichungen, wie sie zum Beispiel durch Mutationen in den dafür kodierenden Genen entstehen, können zu schweren Fehlbildungen und Funktionsstörungen führen. Wie das Modell der *bp*-Maus zeigt, kommt es auch durch Mutationen im *gdf5*-Gen zu teils schwerwiegenden Skelettfehlbildungen (Storm *et al.*, 1994). Auch beim Menschen sind im Zusammenhang mit GDF5 aufgrund der wichtigen Funktionen des Proteins während der Embryonalentwicklung diverse Krankheitsbilder bekannt.

Die wohl schwerwiegendste, durch einen *gdf5*-Gendefekt ausgelöste Krankheit ist die akromesomale Dysplasie (AD). Man unterscheidet den *Hunter-Thompson*- und den *Grebe*-Typ, die durch auf die Gliedmaßen beschränkte Knochen- und Gelenkschäden charakterisiert sind (Grebe, 1955; Quelce-Salgado, 1964; Hunter & Thompson, 1976). Hauptsächlich kommt es zu starker Verkürzung einzelner Knochen und Deformierung von Gelenken. Die distalen Elemente sind dabei stärker beeinträchtigt als die proximalen. Thorax und Schädel sind indes unverändert. Das *DuPan*-Syndrom ist der AD sehr ähnlich, allerdings sind die unteren Extremitäten stärker betroffen als die oberen (Du Pan, 1924; Kohn *et al.*, 1989). Bei diesen autosomal rezessiv vererbten Krankheiten variieren die Phänotypen je nach Genotyp im Grad der Fehlbildungen, wodurch eine genaue Klassifizierung oft nicht möglich ist (Langer *et al.*, 1989).

Eine weitere Krankheit stellt die *Brachydactyly* (BD, „Kurzfingerigkeit“) dar. Von den elf bekannten Unterarten werden BD Typ A1, A2 und C durch Defekte im *gdf5*-Gen ausgelöst (Polinkovsky *et al.*, 1997; Kjaer *et al.*, 2006; Byrnes *et al.*, 2010). Eine nicht korrekt ausgebildete Epiphyse führt zu stark verkürzten und deltaförmigen Fingergliedern und damit zu kurzen, meist seitlich abwinkelnden Fingern (Temtamy & Aglan, 2008). Je nach Unterart sind verschiedene Finger betroffen, was zu charakteristischen Phänotypen führt (Abb. 1.3A). Der ebenfalls durch Defekte im *gdf5*-Gen ausgelöste *proximale Symphalangismus* äußert sich in versteiften Finger- und Handgelenken, ohne die Länge der betroffenen Knochen zu verändern (Takahashi *et al.*, 2001). Die Verwachsungen einzelner Knochen kann sich in Form des *multiple Synostosen*-Syndroms auch auf andere Gelenke in Händen, Füßen und der Halswirbelsäule ausbreiten, meist einhergehend mit Taubheit und leichten Verformungen im Gesicht (Hachimi *et al.*, 2012). Sowohl BD als auch *proximaler Symphalangismus* sowie das *multiple Synostosen*-Syndrom werden dominant oder semidominant vererbt (Everman *et al.*, 2002; Dawson *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006).

Eine weitaus häufigere, mit GDF5 in Verbindung stehende Krankheit ist *Osteoarthritis* Typ 5 (OA5), eine degenerative Krankheit der Hüft- und Kniegelenke, bei der eine herabgesetzte Transkriptionsaktivität des *gdf5*-Gens zu einer Störung der Knorpelhomöostase führt. Der daraus folgende übermäßige Verschleiß von hyalinem Knorpel resultiert im Verlauf der Krankheit in Schmerzen und Gelenkversteifung (Meulenbelt *et al.*, 2006; Miyamoto *et al.*, 2007).

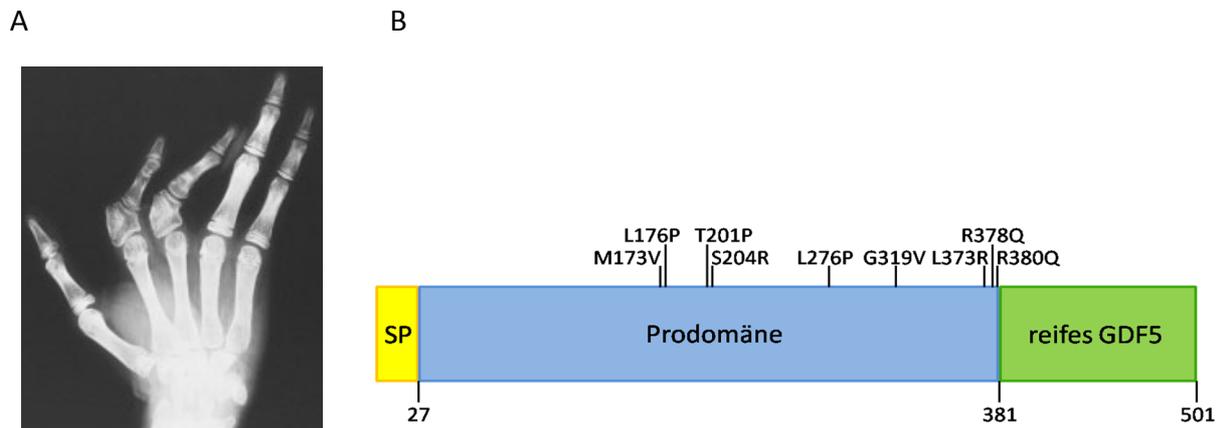


Abbildung 1.3: (A) Röntgenaufnahme einer Hand mit charakteristischem BD C-Phänotyp (Schwabe *et al.*, 2004). Das erste Fingerglied des Zeige- und Mittelfingers ist verkürzt und deformiert. (B) Schema von humanem pre-proGDF5 mit pathogenen AS-Austauschen im Bereich der Prodomäne. Gezeigt sind Signalpeptid (SP; gelb), Prodomäne (blau) und reifes GDF5 (grün). Oberhalb des Schemas sind AS-Austausche angegeben, Zahlen unterhalb geben jeweilige Begrenzung bzw. Länge der Abschnitte an.

Das krankheitsassoziierte Mutationsspektrum von GDF5 umfasst zum großen Teil *frameshift*-Mutationen, die zu vorzeitigen Kettenabbrüchen führen oder Substitutionsmutationen, die hochkonservierte AS innerhalb der reifen Domäne betreffen (Thomas *et al.*, 1996; Polinkovsky *et al.*, 1997; Everman *et al.*, 2002; Faiyaz-UI-Haque *et al.*, 2002; Dawson *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006; Basit *et al.*, 2008; Byrnes *et al.*, 2010). Weiterhin ist auch eine Reihe an Mutationen bekannt, die in einem AS-Austausch innerhalb der Prodomäne bzw. im Bereich der Spaltstelle zur reifen Domäne resultieren (Everman *et al.*, 2002; Schwabe *et al.*, 2004; Douzgou *et al.*, 2008; Plöger *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008; Farooq *et al.*, 2013; Stange *et al.*, 2014) (Abb. 1.3B). Diese Mutationen bewirken in heterozygoter Ausprägung BD oder *proximalen Symphalangismus*, während es bei homozygotem Auftreten auch zu AD, *Grebe*-Typ oder dem *DuPan*-Syndrom kommen kann. Die in dieser Arbeit untersuchten Mutationen sind die AS-Austausche T201P und G319V und führen zu einer dominant vererbten BD C. Damit haben die Mutationen in der Prodomäne die gleiche pathogene Relevanz wie Mutationen im reifen Wachstumsfaktor und unterstreichen den immensen Einfluss der Prodomäne auf die korrekte Funktion von GDF5. Bisher ist allerdings nur in Ansätzen geklärt, zu welchen Veränderungen

diese AS-Austausche innerhalb der Prodomäne führen und auf welche Weise dies die Funktion des Wachstumsfaktors beeinträchtigt.

1.3.2 Bedeutung von GDF5 für Medizin und Therapie

Durch den zentralen Einfluss der BMP-Familie auf Entwicklungs- und Heilungsprozesse im menschlichen Körper liegt die klinische Nutzung dieser Proteine nahe. Rekombinant hergestelltes BMP2 ist seit 2002 sowohl in Europa als auch in den USA zu therapeutischen Zwecken zugelassen (Kain & Einhorn, 2005) und wird mittlerweile unter den Namen *InductOs*[®] (Pfizer) oder *Infuse Bone Graft*[®] (Medtronic Sofamor Danek) bei schwer heilenden Schienbeinfrakturen, Wirbelfusionen und auch in der rekonstruktiven Gesichts- und Kieferchirurgie angewendet (Govender *et al.*, 2002; Carlisle & Fischgrund, 2005). BMP7 ist von der *US Food and Drug Administration* (FDA) für ähnliche Indikationen zugelassen.

GDF5 hat bisher noch keine vergleichbare Zulassung für therapeutische Zwecke, jedoch ist das potentielle Anwendungsgebiet aufgrund der weitreichenden Funktionen des Proteins enorm. Im Nagelmodell konnte gezeigt werden, dass zertrennte Sehnen schneller verheilen und auch schneller wieder die maximale Zugbelastung erreichen, wenn die Nahtstelle mit GDF5 behandelt wurde (Aspenberg & Forslund, 1999; Henn *et al.*, 2010). Der gleiche Effekt konnte bei der Behandlung von Bänderrissen beobachtet werden (Tashiro *et al.*, 1999). Auch im Bereich der Knorpelregeneration war es im Kaninchenmodell möglich, die Heilung eines Defekts im Gelenkknorpel und dem darunterliegenden Knochen durch GDF5 zu beschleunigen (Simank *et al.*, 2004). Weiterhin konnte in Nagern belegt werden, dass durch Injektion von GDF5 in den Kern einer beschädigten und degenerierten Bandscheibe der Verfallsprozess aufgehalten oder gar rückgängig gemacht werden konnte (Walsh *et al.*, 2004; Chujo *et al.*, 2006). Bei Wirbelfusionen im Kaninchenmodell konnte durch den Einsatz einer mineralisierten Kollagenmatrix mit GDF5 eine stabile Verbindung der Wirbelkörper erreicht und somit ähnliche Ergebnisse wie mit BMP2 erzielt werden (Spiro *et al.*, 2001). Die Fähigkeit zur Vermehrung von Knochengewebe konnte in verschiedenen Tiermodellen auch zur Verdickung des knöchernen Bodens der Kieferhöhle und der alveolaren Knochen genutzt werden, um Zahnimplantate besser zu verankern (Lee & Wikesjö, 2014). Weiterhin wird die beschleunigte Heilung chronischer Defekte im Kieferknochen beschrieben. Klinische Studien zu dieser Thematik laufen bereits. Da sich GDF5 auch positiv auf dopaminerge Nervenzellen auswirkt, erscheint eine Anwendung bei der *Parkinsonschen Krankheit* möglich. Die bei dieser Krankheit in Mitleidenschaft gezogenen nigrostriatalen dopaminergen Neuronen konnten im Rattenmodell durch GDF5 geschützt und das Überleben und die Funktion transplanteder dopaminergener Neuronen verbessert werden (Sullivan & O'Keefe, 2005).

Die therapeutische Nutzung von BMPs birgt aufgrund der notwendigen hohen Dosierungen das Risiko von mitunter starken Nebenwirkungen. Bei der Behandlung mit BMP2 kommt es teilweise zu Hämatomen, Ödemen, Schwellungen und Knochenabbau (Shields *et al.*, 2006; Benglis *et al.*, 2008). Auch in Experimenten mit GDF5 wurden beispielsweise Knorpel­einlagerungen in den behandelten Sehnen beobachtet (Rickert *et al.*, 2001). Aus diesem Grund wird versucht, die Knochenwachstumsfaktoren an Trägermedien wie Tricalciumphosphat, Poly- α -Hydroxysäuren oder porösen Kollagen-Materialien zu adsorbieren und dadurch eine langsame Freisetzung zu gewährleisten (Li & Wozney, 2001). Eine weitere Möglichkeit bestände darin, die natürliche Aktivierung der Wachstumsfaktoren aus deren inaktiven Proproteinen zu nutzen und dadurch dauerhaft niedrige Wirkkonzentrationen zu erhalten. Diese Art der Anwendung setzt umfangreiche Kenntnisse zur Struktur und Funktion der Prodomänen voraus.

1.4 Zielstellung

Es besteht großes Interesse an der therapeutischen Nutzung von Knochenwachstumsfaktoren. Die Proproteine könnten als natürliche Retardformen einen Lösungsansatz darstellen, um die häufig auftretenden Nebenwirkungen, die wahrscheinlich auf Überdosierung beruhen, zu umgehen (Rudolph *et al.*, 2008). Eine Aufklärung der Struktur und eine eingehende Charakterisierung der Prodomänen gelten als Voraussetzung für die pharmazeutische Anwendung. Bisher existieren keine Daten zur Struktur der Prodomäne von GDF5.

Ein Ziel der Arbeit bestand darin, einen Beitrag zur Strukturaufklärung der GDF5-Prodomäne zu leisten. Aus Vorversuchen war bekannt, dass eine Strukturaufklärung mittels kristallographischer Methoden nicht aussichtsreich erschien. In vorangegangenen Forschungen der Arbeitsgruppe konnte ein proteolysestabiles Fragment identifiziert werden, das sich für strukturelle Untersuchungen geeignet zeigte (Thieme 2009, Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg). Dieses Fragment sollte zunächst exprimiert, renaturiert und gereinigt werden. Im Anschluss sollte eine biophysikalische Charakterisierung und ein Vergleich zur gesamten Prodomäne durchgeführt werden. Die Strukturanalyse des Fragments sollte in einer Kooperation mittels NMR-Untersuchungen erfolgen.

Als Vorarbeit zur Strukturaufklärung des Kernfragments sollte außerdem die gesamte Prodomäne hergestellt und biochemisch untersucht werden. Hierfür sollte sie rekombinant in *E. coli* exprimiert und eine Strategie zur Renaturierung und Reinigung des Proteins etabliert werden. Zur Klärung der Frage, ob die isoliert hergestellte Prodomäne eine unabhängig faltende Domäne darstellt, sollte im Anschluss eine biophysikalische Charakterisierung

mithilfe spektroskopischer und thermodynamischer Methoden erfolgen. Weiterhin sollte überprüft werden, ob die Prodomäne, wie bei proTGF- β 1 beobachtet, als disulfidverbrücktes Dimer vorliegt (Brunner *et al.*, 1989). Abschließend sollte die Interaktion der Prodomäne mit GDF5 und deren Einfluss auf die Rezeptorbindung analysiert werden, um Rückschlüsse auf deren Funktion bei der Signaltransduktion ziehen zu können. Zum besseren Verständnis ist dieser Abschnitt im Ergebnisteil als Erstes beschrieben.

In einem weiteren Teilprojekt sollten zwei krankheitsassoziierte Prodomänenvarianten untersucht werden, welche die Austausche T201P bzw. G319V besitzen. Diese Varianten sollten analog zum Wildtyp hergestellt werden. Durch die Charakterisierung der Varianten und deren Vergleich mit der Wildtypprodomäne sollten die Auswirkungen der pathogenen Austausche auf die Prodomäne erkannt und Hinweise auf den Pathogeneseprozess erhalten werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Die zur Herstellung von Pufferlösungen und Medien verwendeten Chemikalien stammten von den Firmen AppliChem GmbH, Carl Roth GmbH u. Co. KG oder Sigma-Aldrich GmbH und wurden, falls nicht anders beschrieben, in doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) gelöst.

2.1.2 Standards und Kits

Tabelle 2.1: Verwendete Standards und Kits

Produkt	Hersteller
<i>6x DNA Loading Dye</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>EZ-Link® Sulfo-NHS-LC-Biotin</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>GeneRuler 1 kbp DNA-Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>GeneRuler 100 bp DNA-Ladder Plus</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit</i>	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
<i>peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I</i>	peqlab Biotechnologie GmbH
<i>peqGOLD Protein-Marker I</i>	peqlab Biotechnologie GmbH
<i>QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit</i>	Agilent Technologies Inc.
<i>Taq PCR Kit</i>	New England Biolabs Inc.
<i>Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit</i>	Life Technologies

2.1.3 Enzyme und Antikörper

Tabelle 2.2: Verwendete Enzyme und Antikörper

Produkt	Hersteller
Aprotinin	Carl Roth GmbH u. Co. KG
DNaseI	AppliChem GmbH
<i>FastDigest</i> [®] <i>Bam</i> HI	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>FastDigest</i> [®] <i>Nde</i> I	Thermo Fisher Scientific Inc.
Lysozym	AppliChem GmbH
Kaninchen-anti-BMPRI1A IgG (K36)	Abgent Inc.
<i>peqGOLD Pwo</i> -DNA-Polymerase	peqlab Biotechnologie GmbH
T4 DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific Inc.
Trypsin	Roche GmbH
Ziege-anti-Kaninchen IgG, <i>DyLight</i> 649-konjugiert	Thermo Fisher Scientific Inc.

2.1.4 *E. coli*-Stämme

Tabelle 2.3: Verwendete *E. coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Hersteller
BL21 (DE3)	B F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)	Merck KGaA
<i>One Shot</i> [®] <i>TOP 10</i>	F ⁻ <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG</i>	Life Technologies
<i>XL1-Blue</i>	F ⁻ <i>proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r) / recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i>	Agilent Technologies Inc.

2.1.5 Plasmide und *Primer*

Tabelle 2.4: Verwendete Plasmide

Plasmide	Herkunft
pET-11a	Merck KGaA
pET-11a/GDF5	in dieser Arbeit hergestellt
pET-11a/GDF5-NFLAG-Kernfragment	Christin Deicke, Masterarbeit
pET-15b/ECD-BMPRIA	Anja Hauburger, Dissertation
pET-15b/GDF5-Kernfragment	Maria-Teresa Weichler, Bachelorarbeit
pET-15b/GDF5-Prodomäne	in dieser Arbeit hergestellt
pET-15b/GDF5-Prodomäne G319V	in dieser Arbeit hergestellt
pET-15b/GDF5-Prodomäne T201P	Florian Job, Diplomarbeit
pET-15b/proGDF5	Anne Baude, Diplomarbeit
pET-15b/proGDF5 G319V	Anne Baude, Diplomarbeit
pET-15b/proGDF5 T201P	Dr. Petra Seemann, Charité Berlin
pUBS520 (<i>dnaY p15A ori lacI^q kan^r</i>)	Dr. Ulrich Brinkmann (Brinkmann <i>et al.</i> , 1989)

Tabelle 2.5: Verwendete *Primer*

Primer	Sequenz
<i>core for</i>	5'- CAG CGT GAA GCA TAT GTT GGA GGC TGG CCT GGC -3'
<i>core rev</i>	5'- CGT TTC TTG GTG GAT CCT TAG CGG CCA AAC ACC AGG -3'
<i>mat for</i>	5'- CGA TAT CAT ATG GCC CCA CTG GCC ACT CGC CAG GGC -3'
<i>mat rev</i>	5'- CTT TAC GGA TCC CTA CCT GCA GCC ACA CGA CTC CAC G -3'
<i>pro for</i>	5'- CGA AAA CGG TAA GCC CCA CTG GCC -3'
<i>pro rev</i>	5'- GGC CAG TGG GGC TTA CCG TTT TCG -3'

2.1.6 Säulen und Säulenmatrizes zur Chromatographie

Tabelle 2.6: Verwendete Säulen und Säulenmatrizes

Produkt	Hersteller
Ni-NTA His Bind® Superflow, 60 ml ¹	Merck KGaA
Superdex 200 Prep Grade, 24 ml ²	GE Healthcare
Heparin Sepharose™ 6 FF, 50 ml ³	GE Healthcare
Source™ 15Q, 20 ml ⁴	GE Healthcare
¹ gepackt in XK 26/20 Leersäule	GE Healthcare
² gepackt in Tricorn 10/300 Leersäule	GE Healthcare
³ gepackt in XK 16/40 Leersäule	GE Healthcare
⁴ gepackt in XK 16/20 Leersäule	GE Healthcare
HiLoad 16/600 Superdex 75 pg, 120 ml	GE Healthcare
HiTrap™ Heparin HP, 5 ml	GE Healthcare
HiTrap™ SP FF, 5 ml	GE Healthcare
Vydac® 214TP510 (C4, 300 Å, 250 x 10 mm)	Grace

2.1.7 Geräte und Zubehör

Tabelle 2.7: Verwendete Geräte und Zubehör

Produkt	Hersteller
ÄKTA® purifier / explorer	GE Healthcare
Amicon® Stirred Ultrafiltration Cell 8200	Merck KGaA
Amicon® Ultra Centrifugal Filters	Merck KGaA
Avanti® J-20 und J-25 Centrifuge	Beckman Coulter
Beta 1-16 Lyophille	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH
BIACORE® X	GE Healthcare

demontierbare Küvette 106-QS (0,1 mm)	Hellma Analytics
FluoroMax®-4 Spectrofluorometer	HORIBA Scientific
Gaulin Micron Lab 40® Homogenisator	APV
GenePix® 4000B Microarray Scanner	Molecular Devices, LLC
Halb-Mikroküvette 104F-QS (10x4 mm)	Hellma Analytics
HPLC P580A	Gyncotec
HS 400® Hybridization Station	Tecan Group Ltd.
J-810 Spectropolarimeter	Jasco
Mastercycler® gradient	Eppendorf AG
NanoPhotometer™ UV/Vis Spectrophotometer	Implen GmbH
Optima® TLX Ultracentrifuge	Beckman Coulter
Optima® XL-A Analytical Ultracentrifuge	Beckman Coulter
PepStar® Peptide Microarray Chip	JPT Peptide Technologies GmbH
Refraktometer Modell G	Carl Zeiss Jena GmbH
Sample Loop (2 ml)	GE Healthcare
Sensor Chip SA	GE Healthcare
Superloop® (10 ml, 50 ml, 150 ml)	GE Healthcare
Ultra-Mikroküvette 105.250-QS (10x2 mm)	Hellma Analytics
Ultra-Turrax® T25	IKA®-Werke GmbH & Co. KG
Vivaflow® 200	Sartorius AG
VP-DSC MicroCalorimeter®	GE Healthcare
ZipTips®	Merck KGaA

Neben den in Tabelle 2.7 aufgeführten Geräten wurden zusätzlich die Geräte der Standardlaborausstattung verwendet.

2.1.8 Puffer und Medien

Puffer, die bei chromatographischen Methoden zur Anwendung kamen, wurden filtriert (Porengröße 0,45 µm) und entgast. Die Sterilisation von Medien, Puffern und anderen Lösungen zur Verwendung bei mikrobiologischen Arbeiten erfolgte durch 20-minütige Dampfsterilisation bei 121 °C oder Sterilfiltration (Porengröße 0,22 µm).

2.2 Methoden

2.2.1 Molekular- und mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Isolierung von DNA

Die Plasmidpräparation diente der Gewinnung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen für die PCR, zur Spaltung mit Restriktionsenzymen oder zur DNA-Sequenzierung. Dazu wurde die DNA aus 10 ml-LB-Übernachtskultur mithilfe des *peqGOLD Plasmid Miniprep Kits I* nach Herstellerangaben extrahiert, jedoch mit ddH₂O eluiert.

Die Isolierung von PCR-Produkten oder von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit dem *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit* nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) fand Anwendung bei der gezielten Amplifizierung und Veränderung von DNA-Fragmenten.

Mithilfe der in Tabelle 5 aufgeführten Primer *mat for/rev* und *core for/rev* wurden die kodierenden Sequenzen für GDF5 bzw. das Kernfragment aus dem Plasmid pET-15b/proGDF5 mit spezifischen Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Nde*I samt Überhang gewonnen. Zur Amplifizierung wurde die *peqGOLD Pwo*-DNA-Polymerase gemäß den Herstellerangaben genutzt. Die *annealing*-Temperatur betrug aufgrund der kürzeren komplementären Sequenz im ersten Zyklus der Kettenreaktion 60 °C und wurde in allen folgenden Zyklen auf 65 °C erhöht.

Die Herstellung der Prodomänenkonstrukte gelang durch zielgerichtete Insertion eines Stoppcodons in das jeweilige pET-15b/proGDF5-Konstrukt am 3'-Ende der kodierenden Sequenz der Prodomäne mithilfe des *QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kits*. Die verwendeten Primer *pro for/rev* sind in der Tabelle 5 aufgeführt.

Zur Kontrolle der Reinheit und Größe der PCR-Produkte diente jeweils eine Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.2.1.6).

2.2.1.3 Blunt-End-Klonierung von PCR-Produkten und Spaltung durch Restriktionsendonukleasen

Zur Vervielfältigung und Sequenzierung wurden PCR-Produkte in den *pCR™ II-Blunt-TOPO®*-Vektor eingefügt. Hierfür kam *Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit* den Herstellerangaben entsprechend zur Anwendung.

Die Spaltung durch Restriktionsendonukleasen diente der Erzeugung komplementärer Überhänge an PCR-Produkten und Zielvektoren und im weiteren Verlauf als Nachweis rekombinanter Produkte. Für die Restriktion wurden die *Fast Digest®*-Enzyme *Bam*HI und *Nde*I verwendet. Die Spaltung erfolgte parallel mit beiden Enzymen. Die Reaktionsansätze wurden nach Herstellerangaben pipettiert und anschließend 20 min bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.4 Ligierung

Zur Ligierung der DNA-Fragmente und der linearisierten Leervektoren wurde *T4 DNA-Ligase* genutzt. Der Reaktionsansatz entsprach den Herstellerangaben, jedoch mit zehnfachem molarem Überschuss des DNA-Fragments gegenüber dem Vektor. Die Inkubation des Reaktionsansatzes erfolgte 2 h bei 20 °C. Um eine optimale Transformation durch Elektroporation (siehe 2.2.1.8) zu ermöglichen, wurden störende Ionen durch eine 30-minütige Dialyse gegen 10 % (v/v) Glycerin entfernt.

2.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Zur größenabhängigen Auftrennung von DNA-Fragmenten im elektrischen Feld diente die Agarose-Gelelektrophorese. Dazu wurde eine erhitzte Lösung aus 1 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer in eine Gelkammer gegossen und abgekühlt. Die DNA-Proben wurden mit *6x DNA Loading Dye* versetzt und in die Taschen des Agarosegels gegeben. Die elektrophoretische Trennung gelang bei einer Spannung von 90 V in TAE-Puffer bei einer Laufzeit von 30 - 60 min. Durch Inkubation des Gels für 15 min in Ethidiumbromid (1 µg/ml) und anschließender UV-Exposition bei einer Wellenlänge von 312 nm wurden die DNA-Fragmente detektiert.

TAE-Puffer: 40 mM Tris/HCl; pH 8,5; 20 mM Essigsäure; 2 mM EDTA

2.2.1.6 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung der hergestellten DNA-Konstrukte führte die Firma *Eurofins MWG Operon* durch. Hierfür wurden 1,5 µg DNA in 15 µl ddH₂O versendet. Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten in pET-Vektoren erfolgte unter Verwendung der Primer *T7* und *T7term*, die von

pCR™ II-Blunt-TOPO®-Vektor-Konstrukten mittels des Primers *M13 uni (-21)*. Das Programm *Vector NTI Advance 11* von *Life Technologies* diente zur Datenauswertung.

2.2.1.7 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

Bei der Transformation von Plasmid-DNA zu deren Vervielfältigung wurden die Stämme *XL1-Blue* oder *One Shot® TOP 10* verwendet, bei der Herstellung von Klonen für die rekombinante Genexpression kam der Stamm *BL21(DE3)* zum Einsatz.

Zur Transformation mittels Elektroporation wurden 40 µl Zellsuspension mit 50 - 100 ng Plasmid-DNA versetzt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Das Einbringen der DNA in die Zellen gelang bei 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF. Daran schloss sich eine 30-minütige Inkubation der Zellen in 1 ml, auf 37 °C vorgewärmtem SOC-Medium bei 200 rpm an.

Die Transformation durch Hitzeschock folgte einer 30-minütigen Inkubation von 50 - 100 ng Plasmid-DNA in 40 µl Zellsuspension auf Eis. Der Hitzeeinwirkung (42 °C, 45 s) schloss sich eine 2-minütige Abkühlung auf Eis an. Danach wurde die Zellsuspension in 1 ml, auf 37 °C vorgewärmtes SOC-Medium überführt und 30 min bei 200 rpm inkubiert.

Die Selektion positiver Transformanten wurde durch Ausstreichen von 15 µl Zellsuspension auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum und anschließender Inkubation bei 37 °C über Nacht erreicht.

SOC-Medium:	20 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 4 g/l Glukose; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgSO ₄ ; 10 mM MgCl ₂
LB-Agarplatten:	10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl; 0,1 % (v/v) Antibiotika-Lösung; 1,5 % (w/v) Agar-Agar
Antibiotika-Lösungen:	Ampicillin 100 mg/ml; Kanamycin 50 mg/ml; Streptomycin 50 mg/ml; Tetracyclin 15 mg/ml

2.2.1.8 Rekombinante Genexpression

Um die Proteinausbeute zu erhöhen, enthielten die für die rekombinante Genexpression genutzten *E. coli BL21 (DE3)*-Zellen zusätzlich das Plasmid *pUBS520*, welches für in *E. coli* seltene tRNAs_{Arg} kodiert (Brinkmann *et al.*, 1989).

Zellkultivierung in Vollmedium

Zunächst wurden 20 ml einer LB-Vorkultur in einem 100 ml-Kolben mit einer Einzelkolonie angeimpft und mindestens 8 h bei 37 °C und 120 rpm inkubiert. Die Hauptkultur, bestehend aus 1 l TB-Medium in einem 5 l-Kolben, wurde mit 0,2 % (v/v) Vorkultur versetzt und 14 - 16 h

bei 37 °C und 120 rpm inkubiert. Die Induktion der Genexpression geschah bei einer OD₆₀₀ von 2,5 - 3 durch Zugabe von 1 mM IPTG. Nach 4 h Inkubation wurden die Zellen bei 5000 x g und 4 °C innerhalb 20 min sedimentiert. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -80 °C.

Zellkultivierung in Minimalmedium

Für die selektive Isotopenmarkierung der Proteine mit ¹⁵N und ¹³C wurde die Genexpression in M9-Minimalmedium mit definierter Kohlenstoff- und Stickstoffquelle durchgeführt. Auf die LB-Vorkultur (20 ml) folgten drei weitere Kulturen in M9-Minimalmedium. Die Hauptkultur wurde je nach gewünschter selektiver Markierung mit ¹³C-Glukose und ¹⁵N-Ammoniumchlorid angesetzt, mit 2 % (v/v) der letzten Vorkultur angeimpft und der Ansatz bei 37 °C inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6 - 0,8 folgte nach Zugabe von weiteren 2 g/l Glukose die Induktion der Genexpression. Nach 14 - 16 h Inkubation in Gegenwart von 1 mM IPTG wurden die Zellen bei 5000 x g und 4 °C 20 min sedimentiert und bei -80 °C gelagert.

LB-Medium:	10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl; 0,1 % (v/v) Antibiotika-Lösung
TB-Medium:	50 mM Na ₂ HPO ₄ ; 50 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7; 1 mM MgSO ₄ ; 12 g/l Trypton; 24 g/l Hefeextrakt; 4 ml/l Glycerol; 0,1 % (v/v) Antibiotika-Lösung
M9-Minimalmedium:	42 mM Na ₂ HPO ₄ ; 22 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,3; 8,5 mM NaCl; 1 mM MgSO ₄ ; 1 mM CaCl ₂ ; 170 µM EDTA; 50 µM FeCl ₃ ; 3,7 µM ZnCl ₂ ; 0,6 µM CuSO ₄ ; 0,4 µM CoCl ₂ ; 1,6 µM H ₃ BO ₃ ; 126 µM MnCl ₂ ; 0,3 µM Na ₂ MoO ₄ ; 150 mM Thiamin; 5 g/l Glukose; 1 g/l NH ₄ Cl; 0,1 % (v/v) Antibiotika-Lösung
Antibiotika-Lösungen:	Ampicillin 100 mg/ml; Kanamycin 50 mg/ml

2.2.2 Proteinchemische Methoden

2.2.2.1 Isolierung und Solubilisierung von *inclusion bodies*

Isolierung von *inclusion bodies* (IBs)

Alle untersuchten Proteine wurden in Form unlöslicher IBs synthetisiert, welche nach der Vorschrift von Rudolph et al. (1997, Protokoll 3, Seite 66) aus den Zellen isoliert wurden. Der Zellaufschluss gelang durch Hochdruckdispersion mit einem durchschnittlichen Druck von 750 bar in drei Zyklen. Die sedimentierten IBs wurden bei -20 °C gelagert.

Solubilisierung

Die Solubilisierung der IBs erfolgte in Anlehnung an Rudolph et al. (1997, Protokoll 4, Seite 67). Abweichend davon wurde 1 g IBs in 5 ml Solubilisierungspuffer 2 h bei 20 °C inkubiert und durch Zugabe von 200 mM Dithiothreitol (DTT) in weiteren 2 h vollständig reduziert. Nach

anschließender Absenkung des pH-Wertes der Proteinlösung mit Essigsäure auf pH 3 - 4 wurde das Reduktionsmittel durch mehrfache Dialyse gegen 5 M GdmCl, 10 mM Essigsäure, pH 4 entfernt. Danach wurde der Ansatz mit 10 % (v/v) Tris-Stammlösung neutralisiert und bei 48000 x g für 20 min zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile zu entfernen.

Solubilisierungspuffer: 100 mM Tris/HCl; pH 8,5; 6 M GdmCl; 5 mM EDTA
Tris-Stammlösung: 1 M Tris/HCl; pH 7,5

2.2.2.2 Renaturierung

Die Renaturierung der hergestellten Proteine geschah nach Protokoll von Hillger et al. (2005). Zur Vermeidung einer Oxidation durch Luftsauerstoff wurden die verwendeten Renaturierungspuffer vor der Zugabe des Redox-Systems entgast. Falls nötig, erfolgte eine Konzentrierung des IB-Solubilisats auf mindestens 5 mg/ml. Dazu wurde einer *Amicon® Stirred Ultrafiltration Cell 8200* und Membranen mit einem *molecular weight cut off* (MWCO) von 3 bzw. 10 kDa bei einem Innendruck von 3 - 4 bar und 100 rpm verwendet. Auf eine 20-minütige Zentrifugation bei 48000 x g folgte die Verdünnung des Zentrifugationsüberstandes im Renaturierungspuffer auf eine Konzentration von 100 µg/ml. Die Zugabe des Solubilisats wurde unter Rühren bei 50 rpm nach dem *rapid dilution*-Verfahren durchgeführt. Nach Überschichtung mit Stickstoff inkubierte der Ansatz je nach Protein 5 - 14 Tage bei 4 °C. Die anschließende Konzentrierung des Renaturierungsansatzes wurde mit Hilfe einer *Vivaflow® 200* Tangentialflussfilterzelle mit einem MWCO von 10 kDa bei einem Innendruck von 2 - 2,5 bar durchgeführt. Bei den dimerisierenden Proteinen wurde eine SDS-PAGE (siehe 2.2.2.3) zur Analyse des Fortschritts der Renaturierung genutzt. Die intermolekulare Disulfidbrücke von proGDF5 und GDF5 ermöglicht dabei durch den Vergleich von reduzierten und nicht-reduzierten Proben eine Abschätzung des Anteils an nativ gefaltetem Protein.

Zur Renaturierung von GDF5, den proGDF5-Varianten und den Prodomänenvarianten wurde der Renaturierungspuffer I verwendet (Hillger *et al.*, 2005), bei der Renaturierung des Kernfragments der Prodomäne kam der Renaturierungspuffer II (Bennmann 2011, Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg) zum Einsatz.

Renaturierungspuffer I: 100 mM Tris/HCl; pH 8,5; 1 M L-Arg; 5 mM EDTA; 5 mM GSSG; 2 mM GSH
Renaturierungspuffer II: 50 mM Tris/HCl; pH 7,7; 1 M L-Arg; 5 mM EDTA; 5 mM GSSG; 0,5 mM GSH

2.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Trennung von Proteinen nach Ladung und Masse im elektrischen Feld erfolgte nach Laemmli, 1970. Die Proben wurden mit reduzierendem SDS-Probenpuffer (5x) mit β -Mercaptoethanol versetzt und 5 min bei 95 °C inkubiert. Alternativ kam auch nicht-reduzierender Probenpuffer ohne β -Mercaptoethanol zum Einsatz, wobei das Erhitzen der Proben entfiel. Falls nötig ging dem eine Entsalzung und Konzentrierung der Proteinlösungen durch eine NaDOC/TCA-Fällung nach Arnold & Ulbrich-Hofmann (1999) voraus. Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde bei einer Spannung von 175 - 200 V durchgeführt. Durch Inkubation der Gele in einer Coomassie-haltigen Färbelösung wurden die aufgetrennten Proben gefärbt und anschließend überschüssiges Coomassie in Entfärbelösung wieder entfernt.

SDS-PAGE-Laufpuffer:	25 mM Tris/HCl; pH 8,3; 200 mM Glycin; 0,075 % (w/v) SDS
SDS-Probenpuffer (5x):	100 mM Tris/HCl; pH 8; 4,8 % (w/v) SDS; 16 % (v/v) Glycerin; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau \pm 2 % (v/v) β -Mercaptoethanol
PAGE-Färbelösung:	10 % (v/v) Essigsäure; 0,5 g/l Coomassie Brilliant Blau G 250
PAGE-Entfärbelösung:	10 % (v/v) Essigsäure; 10 % (v/v) Ethanol
PA-Sammelgel (6 %):	125 mM Tris/HCl; pH 6,8; 0,1 % (w/v) SDS; 20 % (v/v) AA/BAA (29:1); 1 % (v/v) APS-Lösung (10 % (w/v)); 0,5 % (v/v) TEMED
PA-Trenngel (14 %):	750 mM Tris/HCl; pH 8,85; 0,1 % (w/v) SDS; 46,7 % (v/v) AA/BAA (29:1); 0,67 % (v/v) APS-Lösung (10 % (w/v)); 0,33 % (v/v) TEMED

2.2.3 Chromatographische Methoden

Sämtliche chromatographische Methoden wurden an den ÄKTA[®]-Systemen *purifier* oder *explorer* bei 4 °C durchgeführt. In Vorbereitung der chromatographischen Reinigung erfolgte eine Dialyse der Proteinlösungen gegen das 50-fache Volumen des jeweiligen Laufpuffers und die Equilibrierung der Säule mit mindestens 2 Säulenvolumen (SV). Die Fraktionierung der Chromatographieläufe geschah zu je 2 - 5 ml, relevante Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE (siehe 2.2.2.3) analysiert. Die Kombination der im Folgenden beschriebenen Chromatographieverfahren wird an entsprechender Stelle im Ergebnisteil erläutert.

2.2.3.1 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie

Die immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) basiert auf der Chelatbildung zwischen Nickel-Nitriloessigsäure und den freien Elektronenpaaren in den Histidinen und diente als erster Reinigungsschritt von Proteinen mit N-terminalem His-Tag[®]. Nicht gebundene Proteine wurden durch einen Waschschrift mit 2 SV IMAC-Laufpuffer

entfernt. Im Anschluss folgte ein linearer Gradient auf 100 % IMAC-Elutionspuffer über 5 SV um bindende Proteine zu eluieren. Die Flussgeschwindigkeit betrug während der gesamten Chromatographie 1 ml/min.

IMAC-Laufpuffer:	100 mM Tris/HCl; pH 7,5; 5 M GdmCl; 20 mM Imidazol
IMAC-Elutionspuffer:	100 mM Tris/HCl; pH 7,5; 5 M GdmCl; 200 mM Imidazol

2.2.3.2 Heparin SepharoseTM-Chromatographie

Die *Heparin Sepharose*TM-Chromatographie basiert auf der Bindung des immobilisierten Glykosaminoglykan Heparin und der entsprechenden Bindestelle in GDF5 (Gandhi & Mancera, 2012). Aufgrund der negativen Ladung der Sulfatgruppen im Heparin kann es auch als Kationenaustauscher fungieren. Mittels eines Waschschruttes mit 3 - 4 SV Heparin-Laufpuffer wurden ungebundene Proteine entfernt. Danach folgte ein linearer Gradient auf 60 % Heparin-Elutionspuffer über 20 SV um die gebundenen Proteine voneinander zu separieren. Dabei wurden die Tris-Heparin-Puffer in Verbindung mit der *HiTrap*TM-Säule verwendet. Im Fall der Herstellung von reifem GDF5 kamen im letzten Reinigungsschritt die Säule mit 50 ml *Heparin Sepharose*TM und die NaAc-Heparin-Puffer zum Einsatz. Die Elution der gebundenen Proteine gelang hier mit einem zweistufigen Gradienten auf 40 % Elutionspuffer, gefolgt von einem linearen Gradienten über 3 SV auf 70 %. Die Flussgeschwindigkeit betrug während aller Läufe 2 ml/min.

Tris-Heparin-Laufpuffer:	100 mM Tris/Essigsäure; pH 6; 6 M Harnstoff; 5 mM EDTA
Tris-Heparin-Elutionspuffer:	100 mM Tris/Essigsäure; pH 6; 6 M Harnstoff; 5 mM EDTA; 1 M NaCl
NaAc-Heparin-Laufpuffer:	100 mM NaAc/Essigsäure; pH 4; 6 M Harnstoff; 5 mM EDTA
NaAc-Heparin-Elutionspuffer:	100 mM NaAc/Essigsäure; pH 4; 6 M Harnstoff; 5 mM EDTA; 1 M NaCl

2.2.3.3 Kationenaustausch-Chromatographie

Die Kationenaustausch-Chromatographie unter Verwendung von *Sulphopropyl (SP)-Sepharose*TM basiert auf der Wechselwirkung zwischen dem immobilisierten, starken Kationenaustauscher Sulfopropyl und den beim gewählten pH-Wert positiv geladenen Proteinen. Ungebundene Proteine wurden durch 4 SV SP-Laufpuffer von der Säule gewaschen. Zur Trennung der gebundenen Proteine folgte anschließend ein linearer Gradient auf 40 % SP-Elutionspuffer über 40 SV. Der gesamte Lauf erfolgte bei einer Flussgeschwindigkeit von 2 ml/min.

SP-Laufpuffer:	50 mM Tris/HCl; pH 7,5; 5 mM EDTA
SP-Elutionspuffer:	50 mM Tris/HCl; pH 7,5; 5 mM EDTA; 1 M NaCl

2.2.3.4 Größenausschluss-Chromatographie

Die Größenausschluss-Chromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) basiert auf der größenabhängigen Retention durch poröses Säulenmaterial. Je geringer der hydrodynamische Radius eines Proteins, desto größer ist das verfügbare Säulenvolumen und demnach auch die Retentionszeit.

Die präparative Auftrennung von Proteingemischen erfolgte mithilfe einer *HiLoad 16/600 Superdex*-Säule. Der gesamte Lauf wurde mit SP-Laufpuffer und einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min durchgeführt.

Im analytischen Maßstab wurden die Proteine und Proteinkomplexe mittels einer *Superdex 200 Prep Grade*-Säule aufgetrennt. Im Fall der Bestimmung der apparenten Molekülmasse der separaten Prodomäne wurde die Chromatographie mit SP-Laufpuffer und einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min durchgeführt. Bei der analytischen SEC zum Nachweis der nicht-kovalenten Interaktion von GDF5 mit der Prodomäne bzw. dem Kernfragment kam aufgrund der bei neutralem pH begrenzten Löslichkeit von GDF5 (Plöger *et al.*, 2008) bei unveränderter Laufgeschwindigkeit Acetatpuffer zum Einsatz. Vor der Chromatographie wurde GDF5 mit dem jeweiligen Komplexbildner im molaren Verhältnis von 1:2 (GDF5 im Unterschuss) 10 min inkubiert. Zur Berechnung der apparenten Molekülmasse der Prodomäne wurde die *Superdex 200 Prep Grade*-Säule mit verschiedenen Proteinen geeicht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2.8 dargestellt. Die Herstellung der Proteine GDF5 und proGDF5 ist im Anhang erläutert (siehe Abb. 6.1).

Tabelle 2.8: Molekülmassen und Retentionsvolumina der verwendeten Eichproteine

Protein	Molekülmasse in kDa	Retentionsvolumen in ml
Thyroglobulin	669	9,53
Aldolase	158	13,28
Rinderserumalbumin	62	14,72
DNase I	31	17,13
Lactalbumin	14	21,24
Aprotinin	6,5	22,5

SP-Laufpuffer: 50 mM Tris/HCl; pH 7,5; 5 mM EDTA
Acetatpuffer: 50 mM NaAc/Essigsäure; pH 4

2.2.4 Biochemische und biophysikalische Methoden

2.2.4.1 Konzentrationsbestimmung von Protein- und Nukleinsäurelösungen

Zur Konzentrationsbestimmung von Protein- und Nukleinsäurelösungen diene deren Eigenschaft der Extinktion von ultraviolettem Licht. Das Lambert-Beer'sche Gesetz (Gl.1) beschreibt die Beziehung zwischen der Konzentration von Proteinlösungen und deren Extinktion bei 280 nm (A_{280}).

$$A_{280} = \epsilon_{280} \cdot c \cdot d \quad (\text{Gl. 1})$$

A_{280}	Extinktion bei 280 nm
ϵ_{280}	molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm in $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$
c	Proteinkonzentration in M
d	Küvettschichtdicke in cm

Die Extinktionskoeffizienten der untersuchten Proteine unter nativen Bedingungen wurden nach Gill und von Hippel berechnet (Gill & Hippel, 1989) und sind in Tabelle 2.9 zusammengefasst. Die Aufnahme eines Extinktionsspektrums von 240 - 400 nm erlaubte über das Verhältnis A_{280}/A_{260} Rückschlüsse über DNA-Kontaminationen. Außerdem lieferte der A_{320} -Wert Hinweise auf eventuell vorliegende Proteinaggregate.

Tabelle 2.9: Molare Extinktionskoeffizienten der untersuchten Proteine

Protein	molarer Extinktionskoeffizient ϵ_{280} in $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$
GDF5 (Dimer)	31690
proGDF5 (Dimer, alle Varianten)	82820
GDF5-Prodomäne (alle Varianten)	25565
17 kDa-Fragment (<i>FLAG-Tag</i> [®])	18115
17 kDa-Fragment (<i>His-Tag</i> [®])	19605
BMPRIA-Ektodomäne	5095

Da bei Proteingemischen die Bestimmung eines genauen Extinktionskoeffizienten nicht möglich ist, wurde in diesem Fall mit einer Näherungsgleichung (Gl. 2) gearbeitet (Warburg & Christian, 1941).

$$c = (1,552 \cdot A_{280}) - (0,757 \cdot A_{260}) \quad (\text{Gl. 2})$$

c	Proteinkonzentration in mg ml ⁻¹
A ₂₈₀	Extinktion bei 280 nm
A ₂₆₀	Extinktion bei 260 nm

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen erfolgte auf Basis der Näherung, dass eine Extinktion von 1 bei 260 nm (A₂₆₀) einer Konzentration von 50 µg/ml entspricht.

2.2.4.2 Limitierte Proteolyse

Die limitierte Proteolyse stellt eine kontrollierte Hydrolyse von Proteinen dar, wobei Unterschiede zwischen den Proteolyseprodukten Rückschlüsse auf strukturelle Unterschiede der verwendeten Proteine zulassen. Als Protease kam Trypsin zum Einsatz, um aufgrund der geringen Spezifität eine gleichmäßige Streuung der Spaltstellen zu erhalten. Die zu spaltenden Proteine wurden mit steigenden Konzentrationen an Trypsin versetzt und 30 min bei 20 °C inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion gelang durch Zugabe des Trypsininhibitors Aprotinin im fünffachen molaren Überschuss zur höchsten Trypsinkonzentration. Daran schlossen sich unmittelbar die Zugabe von nichtreduzierendem SDS-Probenpuffer zu den Proben und die Analyse mittels SDS-PAGE (siehe 2.2.2.3) an. Die auf das Gel aufgetragenen Mengen variierten je nach Trypsinkonzentrationen, um auch die Banden der kleineren Fragmente zu erfassen.

2.2.4.3 Fluoreszenzspektroskopie

Da die Fluoreszenzeigenschaften eines Proteins stark von der Umgebung der enthaltenen aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin abhängig sind, bietet sich die Fluoreszenzspektroskopie an, um Informationen über deren Lösungsmittelexposition zu erhalten. Diese Informationen geben wiederum Aufschluss über den Faltungszustand des jeweiligen Proteins unter den gegebenen Pufferbedingungen (Cantor & Schimmel, 1980; Schmid, 1997). Die Fluoreszenzmessungen wurden an einem *FluoroMax®-4 Spectrofluorometer* in einer Ultra-Mikroküvette bei 20 °C durchgeführt. Die Aufnahme der Spektren unter nativen Bedingungen erfolgte in SP-Puffer bei einer Proteinkonzentration von 30 µg/ml. Spektren unter denaturierenden Bedingungen wurden in Anwesenheit von 6 M GdmCl im Puffer aufgenommen. Bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm bzw. 295 nm lag der Messbereich zwischen 300 nm und 400 nm mit einem Messabstand von 0,2 nm und einer Integrationszeit von 0,1 s. Die Spaltbreiten der Strahlengänge betragen 5 nm für die Anregung

bzw. 8 nm für die Emission. Die Spektren wurden jeweils dreifach akkumuliert und um die Eigenfluoreszenz des Puffers korrigiert.

SP-Puffer: 50 mM Tris/HCl; pH 7,5; 5 mM EDTA

2.2.4.4 Chemisch-induzierte Denaturierungsübergänge

Zur Bestimmung der thermodynamischen Stabilität der untersuchten Proteine dienten chemisch-induzierte Denaturierungsübergänge. Unter der Annahme, dass während der Entfaltung eines Proteins keine Intermediate akkumulieren und nur native und denaturierte Spezies vorliegen, kann diese Entfaltung durch ein Zwei-Zustandsmodell beschrieben werden (Tanford, 1968).

$$\Delta G_D = -R \cdot T \cdot \ln K_D \quad (\text{Gl. 3})$$

$$K_D = \frac{D}{N} \quad (\text{Gl. 4})$$

$$\Delta G_D = \Delta G_D^{H_2O} - m \cdot [D] \quad (\text{Gl. 5})$$

$$y = \frac{(y_N + b_N \cdot [D]) + (y_D + b_D \cdot [D]) \cdot \exp\left(-\frac{\Delta G_D^{H_2O} - m \cdot [D]}{RT}\right)}{1 + \exp\left(-\frac{\Delta G_D^{H_2O} - m \cdot [D]}{RT}\right)} \quad (\text{Gl. 6})$$

ΔG_D	Gibbs'sche freie Entfaltungsenthalpie in J mol^{-1}
R	universelle Gaskonstante ($8,3145 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)
T	absolute Temperatur in K
K_D	Gleichgewichtskonstante
D	Anteil an denaturiertem Protein
N	Anteil an nativem Protein
[D]	Harnstoffkonzentration in M
$\Delta G_D^{H_2O}$	Gibbs'sche freie Entfaltungsenthalpie in J mol^{-1} bei $[D] = 0 \text{ M}$
m	m-Wert in $\text{J mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$
y	experimenteller Messwert
y_N	Ordinatenschnittpunkt des Plateaus des nativen Proteins
b_N	Anstieg des Plateaus des nativen Proteins
y_D	Ordinatenschnittpunkt des Plateaus des denat. Proteins
b_D	Anstieg des Plateaus des denaturierten Proteins

Die thermodynamische Stabilität des Proteins ist definiert durch die Gibbs'sche freie Entfaltungsenthalpie ΔG_D (Gl. 3). Die Gleichgewichtskonstante K_D ergibt sich aus den Anteilen an nativem und denaturiertem Protein (Gl. 4). Am Übergangsmittelpunkt liegen gleiche Mengen an nativer und entfalteter Spezies vor. Daraus ergibt sich $K_D = 1$ und somit auch $\Delta G_D = 0$. Nach der Methode der linearen Extrapolation wird die Abhängigkeit des ΔG_D -Wertes von der Harnstoffkonzentration in Gleichung 5 beschrieben. Unter der Voraussetzung einer linearen Abhängigkeit der spektroskopischen Eigenschaften der nativen und denaturierten Spezies von der Denaturierungsmittelkonzentration war durch Einsetzen der Gleichungen 4 und 5 in Gleichung 3 die Ermittlung der thermodynamischen Kenngrößen aus den Messdaten möglich (Gl. 6) (Santoro & Bolen, 1988; Pace & Shaw, 2000).

$$[D] = 117,66 \cdot \Delta N + 29,753 \cdot \Delta N^2 + 185,56 \cdot \Delta N^3 \quad (\text{Gl. 7})$$

$$[D]_{1/2} = \frac{\Delta G_D^{H_2O}}{m} \quad (\text{Gl. 8})$$

$$\alpha_N = \frac{y - (y_D + b_D \cdot [D])}{(y_N + b_N \cdot [D]) - (y_D + b_D \cdot [D])} \quad (\text{Gl. 9})$$

[D]	Harnstoffkonzentration in M
ΔN	Änderung des Brechungsindex
$[D]_{1/2}$	Übergangsmittelpunkt in M
$\Delta G_D^{H_2O}$	Gibbs'sche freie Entfaltungsenthalpie in J mol^{-1} bei $[D] = 0 \text{ M}$
m	m -Wert in $\text{J mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$
α_N	Anteil an nativem Protein
y	experimenteller Fluoreszenzmesswert
y_N	Ordinatenschnittpunkt des Plateaus des nativen Proteins
b_N	Anstieg des Plateaus des nativen Proteins
y_D	Ordinatenschnittpunkt des Plateaus des denat. Proteins
b_D	Anstieg des Plateaus des denaturierten Proteins

Die bereits in Abschnitt 2.2.4.3 beschriebenen, vom Faltungszustand abhängigen Fluoreszenzeigenschaften des Proteins dienten bei dieser Methode als Messgröße. Die zu untersuchenden Proteine wurden bei einer Endkonzentration von $2 \mu\text{M}$ in Ansätzen aus SP-Puffer mit Harnstoffkonzentrationen von $0 - 8 \text{ M}$ über Nacht bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Die Überprüfung der Reversibilität der Übergänge gelang durch analog zu den Denaturierungen angefertigte Renaturierungsübergänge. Hierfür wurde das Protein vor der Verwendung in den

Messansätzen durch Dialyse in SP-Puffer mit 8 M Harnstoff denaturiert. Die Fluoreszenzmessung erfolgte in einer Ultra-Mikroküvette am *FluoroMax®-4 Spectrofluorometer* bei 20 °C. Bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm wurde das Emissionssignal bei 335 nm dreimal über 10 s gemessen, akkumuliert und der Durchschnittswert gebildet. Das Messintervall und die Integrationszeit betragen je 0,1 s, die Spaltbreiten der Strahlengänge beliefen sich auf 5 nm für die Anregung bzw. 8 nm für die Emission. Die Korrektur der Messwerte um den jeweiligen Pufferwert geschah mittels einer Eichgerade von 0 - 8 M Harnstoff in SP-Puffer. Die exakte Bestimmung der Harnstoffkonzentration gelang durch refraktometrische Messung des Brechungsindex und anschließende Berechnung nach Gleichung 7 (Pace, 1986). Zur Bestimmung der thermodynamischen Kenngrößen wurden die Messwerte als Funktion der Harnstoffkonzentration dargestellt und nach oben beschriebener Methode angepasst (Gl. 6). Die Berechnung des Übergangsmittelpunkts wird durch Gleichung 8 beschrieben. Für den Vergleich mehrerer Übergänge wurden die Messwerte normiert, um den Anteil an nativem Protein abzuleiten (Gl. 9).

SP-Puffer: 50 mM Tris/HCl; pH 7,5; 5 mM EDTA

2.2.4.5 Circular dichroismus-Spektroskopie

Chirale Moleküle absorbieren rechts und links zirkular polarisiertes Licht in unterschiedlichem Maße und erzeugen somit elliptisch polarisiertes Licht. Diese Eigenschaft findet bei der Circular dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) Anwendung, um Informationen über die Struktur der Proteine zu erlangen. Man unterscheidet zwischen dem Fern-UV-Messbereich, der Aufschluss über die Sekundärstrukturanteile gibt, und dem Nah-UV-Bereich, in dem die Absorptionseigenschaften der aromatischen Aminosäuren ein für die vorhandene Tertiärstruktur charakteristisches Spektrum ergeben (Schmid, 1997).

Alle Messungen wurden an einem *J-810 Spectropolarimeter* bei 20 °C mit einer Bandbreite von 1 nm, einer Messgeschwindigkeit von 50 nm/s und einer Zeitkonstante von 1 s durchgeführt und mindestens 50-fach akkumuliert. Die Untersuchung der Proformen, der Prodomänen und des Kernfragments unter nativen Bedingungen erfolgte in SP-Puffer bei einer Konzentration von 0,5 - 0,8 mg/ml, während GDF5 bei einer Konzentration von 0,2 - 0,4 mg/ml in Acetatpuffer gemessen wurde. Denaturierende Bedingungen wurden durch Zugabe von 6 M GdmCl zum Puffer erzeugt. Der Messbereich der Fern-UV-Spektren lag bei 190 - 250 nm mit einem Messabstand von 0,1 nm. Dabei kam eine Küvette mit einer Schichtdicke von 0,1 mm zum Einsatz. Bei der Aufnahme der Nah-UV-Spektren wurde in einer Halb-Mikroküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm im Bereich von 250 - 320 nm und mit

einem Messabstand von 0,2 nm gemessen. Nach Korrektur um das Puffersignal fand eine Normierung der Daten auf die molare Elliptizität $[\Theta]$ statt (Gl. 10), wobei die Fern-UV-Daten zusätzlich auf die mittlere residuelle Elliptizität $[\Theta]_{MRW}$ umgerechnet wurden (Gl. 11) (Schmid, 1997). Die Herstellung der Proteine GDF5 und proGDF5 ist im Anhang erläutert (siehe Abb. 6.1).

$$[\Theta] = \frac{\theta \cdot MW}{c \cdot d \cdot 10} \quad (\text{Gl. 10})$$

$$[\Theta]_{MRW} = \frac{[\theta]}{N} \quad (\text{Gl. 11})$$

$[\Theta]$	molare Elliptizität in $\text{deg cm}^2 \text{ d mol}^{-1}$
$[\Theta]_{MRW}$	mittlere residuelle Elliptizität in $\text{deg cm}^2 \text{ d mol}^{-1}$
θ	gemessene Elliptizität in mdeg
MW	Molekulargewicht des Proteins in Da
c	Proteinkonzentration in mg/ml
d	Schichtdicke der Küvette in cm
N	Anzahl der Aminosäuren im untersuchten Protein

Für die Analyse von Unterschieden zwischen einzelnen Fern-UV-Spektren wurden Differenzspektren nach Gleichung 12 berechnet.

$$[\Theta]_{DIFF} = \frac{[\theta]_{P1} - [\theta]_{P2}}{\Delta N} \quad (\text{Gl. 12})$$

$[\Theta]_{DIFF}$	$[\Theta]_{MRW}$ des Differenzspektrums in $\text{deg cm}^2 \text{ d mol}^{-1}$
$[\theta]_{P1}$	molare Elliptizität von Protein 1 in $\text{deg cm}^2 \text{ d mol}^{-1}$
$[\theta]_{P2}$	molare Elliptizität von Protein 2 in $\text{deg cm}^2 \text{ d mol}^{-1}$
ΔN	Differenz der Aminosäureanzahl der beiden Proteine

SP-Puffer: 50 mM Tris/HCl; pH 7,5; 5 mM EDTA

2.2.4.6 Dynamische Differenzkalorimetrie

Zur Bestimmung der thermodynamischen Stabilität der untersuchten Proteine dienten thermisch-induzierte Denaturierungsübergänge, die mittels dynamischer Differenzkalorimetrie (*differential scanning calorimetry*, DSC) ermittelt wurden. Dabei wird durch Erhitzen einer Proteinprobe und einer Pufferreferenz in einem Kompensationskalorimeter mithilfe der dafür nötigen elektrischen Leistung eine Übergangskurve erzeugt. Aus dem Unterschied zwischen Referenz- und Probenzelle resultiert nach Korrektur um eine gerätespezifische Basislinie die spezifische isobare Wärmekapazität c_p des Proteins. Durch das bei der Denaturierung des Proteins herrschende Entfaltungsgleichgewicht besteht c_p als Funktion der Temperatur aus einer Komponente für die native Spezies und einer für die denaturierte Spezies sowie der Änderung der Wärmekapazität bei der Entfaltung (Freire, 1995) (Gl. 13). Unter Einbindung der Formel für die Gleichgewichtskonstante K_D (Gl. 14) und der van't Hoff'schen Reaktionsisobare (Gl. 15) ergibt sich in Gleichung 16 eine Anpassung der Auftragung der spezifischen Wärmekapazität gegen die Temperatur.

$$c_p(T) = \alpha_N \cdot c_{p,N} + \alpha_D \cdot c_{p,D} + \Delta H_D \cdot \left(\frac{\partial \alpha_D}{\partial T} \right) \quad (\text{Gl. 13})$$

$$K_D = \frac{\alpha_D}{\alpha_N} \quad (\text{Gl. 14})$$

$$\left(\frac{\partial \ln K_D}{\partial T} \right)_p = \frac{\Delta H_D^T}{RT^2} \quad (\text{Gl. 15})$$

$$c_p = c_{p,N} + \left(\frac{K_D}{1+K_D} \right) \cdot \Delta c_p + \frac{\Delta H_D^2}{R \cdot T^2} \cdot \left(\frac{K_D}{(1+K_D)^2} \right) \quad (\text{Gl. 16})$$

c_p	spezifische Wärmekapazität in $\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
α_N	Anteil an nativem Protein
α_D	Anteil an denaturiertem Protein
$c_{p,N}$	spez. Wärmekapazität d. nativen Proteins in $\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
$c_{p,D}$	spez. Wärmekapazität d. denaturierten Proteins in $\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
ΔH_D	Entfaltungsenthalpie in J mol^{-1}
T	Temperatur in K
K_D	Gleichgewichtskonstante
R	universelle Gaskonstante ($8,3145 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)
Δc_p	Differenz der spez. Wärmekapazität zwischen nativem und denaturiertem Zustands in $\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$

Über die lineare Temperaturabhängigkeit der spezifischen Wärmekapazitäten (Gl. 17 und 18) und der Entfaltungsenthalpie (Gl. 19) kann schließlich die Entfaltungsenthalpie bei der Übergangstemperatur berechnet werden.

$$c_{p,N} = c_{p,N}^{T_m} + m_N(T - T_m) \quad (\text{Gl. 17})$$

$$\Delta c_p = \Delta c_p^{T_m} + m(T - T_m) \quad (\text{Gl. 18})$$

$$\Delta H_D = \Delta H_D^{T_m} + \Delta c_p^{T_m}(T - T_m) \quad (\text{Gl. 19})$$

$c_{p,N}$	spez. Wärmekapazität des nativen Zustands in $\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
Δc_p	Differenz der spez. Wärmekapazität zwischen nativem und denaturiertem Zustands in $\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
ΔH_D	Entfaltungsenthalpie in J mol^{-1}
$c_{p,N}^{T_m}$	$c_{p,N}$ bei der Übergangstemperatur
$\Delta c_p^{T_m}$	Δc_p bei der Übergangstemperatur
$\Delta H_D^{T_m}$	ΔH_D bei der Übergangstemperatur
T	Temperatur in K
T_m	Übergangstemperatur in K
m_N	Anstieg der Basislinie des nativen Proteins
m	Anstieg der Basislinie des denaturierten Proteins

Alle Messungen erfolgten mit einem *VP-DSC microcalorimeter* bei einer Heizrate von 1 K/min und einer Proteinkonzentration von 0,4 - 0,6 mg/ml in Acetatpuffer. Zur Vorbereitung wurden die Proben dreimal gegen das 100-fache Volumen des Messpuffers dialysiert und je 5 min/ml entgast. Der Messbereich lag bei 10 - 80 °C bzw. 20 - 90 °C, wobei jedem Messzyklus eine 15-minütige Inkubation der Proben bei der jeweiligen Starttemperatur vorausging. Nach der Basislinienkorrektur und der Konzentrationsnormierung konnte die Übergangstemperatur T_m aus der Auftragung der spezifischen Wärmekapazität gegen die Temperatur abgelesen werden. Die Bestimmung der Entfaltungsenthalpie bei der Übergangstemperatur, $\Delta H_D^{T_m}$ erfolgte durch Anpassung sämtlicher Messwerte nach Gleichung 16. Um die Genauigkeit der Anpassung zu erhöhen wurden bei einigen Messungen die Basislinien vor und nach dem Übergang durch Extrapolation verlängert.

Acetatpuffer: 50 mM NaAc/Essigsäure; pH 4

2.2.4.7 Oberflächenplasmonresonanz

Zur Untersuchung von Proteininteraktion wurde die Methode der Oberflächenplasmonresonanz (*surface plasmon resonance*, SPR) verwendet. Dabei wird Licht durch ein Prisma auf die Unterseite einer darauf aufgebracht dünnen Metallschicht gestrahlt und daran reflektiert. Je nach Zustand der Oberfläche dieser Metallschicht kommt es in einem bestimmten Winkel der Reflektion zu einer evaneszenten Welle, die in das Material eindringt und dadurch zu einer energetischen Auslöschung im reflektierten Licht führt. Die Verschiebung dieses Winkels durch an der Oberfläche bindende Analytmoleküle dient als Messsignal (Schuck, 1997). Zunächst wurden die Liganden biotinyliert, um sie auf einem Streptavidin (SA)-Chip zu immobilisieren. Dazu wurde GDF5 bzw. die Ligandenbindedomäne des BMPRI1A-Rezeptors bei einer Konzentration von 0,1 mg/ml nach Herstellerangaben mit *EZ-Link® Sulfo-NHS-LC-Biotin* behandelt. Abweichend vom Protokoll des Herstellers wurde der pH-Wert auf 6,3 abgesenkt und ein fünffach molarer Überschuss an Biotin verwendet, um die Liganden möglichst spezifisch an dem N-terminalen Amin zu biotinylieren. Die Ektodomäne des Rezeptors wurde im Anschluss gegen HBS-EP-Puffer dialysiert, um freies Biotin zu entfernen. Die Immobilisierung erfolgte bei einer Konzentration von 0,5 µg/ml und einer Flussrate von 5 µl/min. Es wurden ca. 150 RU immobilisiert. GDF5 wurde auf die gleiche Weise behandelt, allerdings wurde hier Acetatpuffer verwendet und es wurden ca. 1000 RU immobilisiert. Alle Analytmessungen wurden in filtriertem und entgastem HBS-EP-Puffer und nach doppelter Dialyse der Analyte durchgeführt. Einer Assoziationsphase von 240 - 300 s folgte eine Dissoziationsphase von 300 s bei 20 °C und einer Flussrate von jeweils 20 µl/min. Jeder Messung schloss sich ein Regenerationsschritt von 120 s mit 10 mM Glycin, pH 2 an. Alle Sensogramme wurden automatisch durch Subtraktion des Signals einer Referenzzelle korrigiert.

$$RU = RU_0 \cdot \exp(-k_D \cdot (t - t_0)) \quad (\text{Gl. 20})$$

$$RU = \frac{k_A \cdot c \cdot RU_{\max}}{k_A \cdot c + k_D} \cdot (1 - \exp(-(k_A \cdot c + k_D) \cdot t)) \quad (\text{Gl. 21})$$

RU	gemessene <i>response units</i>
RU ₀	<i>response units</i> zu Beginn der Dissoziationsphase
RU _{max}	Maximalwert für RU im Gleichgewicht
k _D	Dissoziationsrate in s ⁻¹
k _A	Assoziationsrate in M ⁻¹ s ⁻¹
t	Zeit in s
t ₀	Zeit in s zu Beginn der Dissoziationsphase
c	Konzentration des Analyten in M

Die Auswertung der Messungen mit der Rezeptorektodomäne als Ligand gelang über ein Langmuir'sches Bindungsmodell für eine 1:1-Interaktion mithilfe der *BIAevaluation™ Software 4.1.1*. Dafür wurde zunächst die Dissoziation nach Gleichung 20 angepasst. Durch die so erhaltene Dissoziationsrate k_D war es möglich, die Assoziationsreaktion anzupassen. Die von der *BIAevaluation™ Software* dafür verwendete Gleichung 21 setzt sich aus einer Langmuir-Isotherme für die Assoziationsreaktion und einer negativen Exponentialfunktion für die gleichzeitig stattfindende Dissoziation zusammen. Bei den Messungen mit GDF5 als Ligand wurde der Mittelwert aus den letzten 20 s der jeweiligen Assoziationsphase bestimmt und gegen die Analytkonzentration aufgetragen. Unter der Annahme von zwei unterschiedlichen Bindungsereignissen folgte die Anpassung der so entstandenen Bindungskurve nach Gleichung 22, die sich aus zwei hyperbolen Bindungstermen zusammensetzt.

$$RU = \frac{RU_{max,1} \cdot c}{K_{D,1} + c} + \frac{RU_{max,2} \cdot c}{K_{D,2} + c} \quad (\text{Gl. 22})$$

RU	gemessene <i>response units</i>
$RU_{max,1/2}$	Maximalwert für RU im Gleichgewicht
$K_{D, 1/2}$	Gleichgewichtskonstante in M
c	Konzentration des Analyten in M

Die Herstellung von GDF5 und der BMPR1A-Ektodomäne ist im Anhang erläutert (siehe Abb. 6.1).

HBS-EP-Puffer:	10 mM HEPES/NaOH; pH 7,5; 500 mM NaCl; 3,4 mM EDTA; 0,05 % (v/v) Tween 20
Acetatpuffer:	50 mM NaAc/Essigsäure; pH 4

2.2.4.8 Peptid-Microarray

Zur Identifizierung der Bindeepitope zwischen GDF5 bzw. proGDF5 und der Ektodomäne des Rezeptors BMPR1A kamen Peptid-Microarray-Untersuchungen zur Anwendung. Dazu wurde von *JPT Peptide Technologies GmbH* die Aminosäuresequenz von pre-proGDF5 in Form von überlappenden Polypeptiden einer Länge von 15 AS und einem Versatz von jeweils 3 AS auf einem *PepStar™ Peptide Microarray Chip* immobilisiert. Es folgte zunächst eine einstündige Inkubation der Chips mit 200 µg der Rezeptorektodomäne in 400 µl SP-Puffer. Danach wurden die Chips in die *HS 400™ Hybridization Station* eingebracht und dreimal mit TBS/T und einmal mit TBS gewaschen. Nach einer einstündigen Inkubation mit dem primären Antikörper Kaninchen-anti-BMPR1A IgG und weiteren fünf Waschschritten mit TBS/T und einem mit TBS

schloss sich die 30-minütige Inkubation mit dem sekundären, *DyLight* 649-konjugierten Antikörper Ziege-anti-Kaninchen IgG an. Abschließend wurde der Chip erneut fünfmal mit TBS/T und zweimal mit ddH₂O gewaschen und mit Stickstoff getrocknet. Die Signaldetektion erfolgte im *GenePix*[®] 4000B *Microarray Scanner* bei 532 nm und 635 nm. Als Referenz kam ein Chip zum Einsatz, der nicht mit der Rezeptor-ECD inkubiert, allerdings auf die gleiche Weise mit den Antikörpern behandelt wurde. Bei der Datenauswertung kam die Software *GenePix*[®] *Pro 7.0* zur Anwendung. Messpunkte, deren Fluoreszenzsignal bei 635 nm abzüglich des Hintergrunds den Wert der Referenz um mehr als 100 überschritt, wurden als Bindungsereignis gewertet. Die Herstellung der BMPR1A-Ektodomäne ist im Anhang erläutert (siehe Abb. 6.1).

SP-Puffer:	50 mM Tris/HCl; pH 7,5; 5 mM EDTA
TBS:	20 mM Tris/HCl; pH 7,5; 150 mM NaCl
TBS/T:	20 mM Tris/HCl; pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1 % (v/v) Tween-20

2.2.4.9 Ellman-Test

Der Ellman-Test beruht auf der stöchiometrischen Reaktion von Dithionitrobenzoesäure (DTNB) mit freien Thiolen und dient der Quantifizierung von reduziert vorliegenden Cysteinresten in Proteinen (Ellman, 1959). Der hervorgerufenen Farbreaktion liegt eine Freisetzung von Nitrothiobenzoat (NTB) zugrunde, welches bei 412 nm ein Extinktionsmaximum besitzt. 40 µl der zu untersuchenden Proteinlösung wurden mit je 100 µl Verdünnungspuffer und Methanol, sowie 40 µl DTNB-Lösung versetzt und 30 min bei 20 °C inkubiert. Mithilfe der Extinktion bei 412 nm (A_{412}) und einer mit 0 - 200 µM N-Acetylcystein ermittelten Eichreihe wurde der Gehalts an freien SH-Gruppen bestimmt.

Verdünnungspuffer:	30 mM Tris/HCl; pH 8,2; 3 mM EDTA
DTNB-Lösung:	3 mM DTNB in Methanol

2.2.4.10 Analytische Ultrazentrifugation

Die analytische Ultrazentrifugation diente dazu, das Sedimentationsverhalten und das apparente Molekulargewicht der Prodomäne in Lösung zu untersuchen. Diese Informationen lassen Rückschlüsse auf das Verhältnis zwischen Molekulargewicht und hydrodynamischem Radius sowie eventuelle nicht-kovalente Interaktionen zu (Svedberg & Pedersen, 1940). Im dreistündigen Lauf zur Sedimentationsgeschwindigkeitsanalyse wurde bei 40000 rpm alle 10 min die Extinktion bei 280 nm gemessen. Im Anschluss folgte der Lauf zur Analyse des Sedimentationsgleichgewichts bei 12000 rpm bis zur Einstellung des Gleichgewichts, wobei

ebenfalls die Extinktion bei 280 nm als Messgröße diene. Alle Messungen wurden in der *Optima™ XL-A Analytical Ultracentrifuge* mit dem Rotor *An50Ti* und Doppelsektorzellen bei 20 °C durchgeführt. Die Proteinkonzentration betrug 0,2 mg/ml in SP-Puffer. Die Datenanalyse führte PD Dr. Hauke Lilie (MLU Halle-Wittenberg, Institut für Biochemie und Biotechnologie) mithilfe der entsprechenden Software von *Beckman Instruments* nach der „time derivative“-Methode durch.

SP-Puffer: 50 mM Tris/HCl; pH 7,5; 5 mM EDTA

2.2.4.11 NMR-Spektroskopie

Zur Aufklärung der Struktur des Kernfragments wurden NMR-spektroskopische Untersuchungen durchgeführt. Dafür wurde ein $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -Korrelationsspektrum, das FHSQC (*fast Heteronuclear Single-Quantum Correlation*) (Mori *et al.*, 1995) aufgenommen. Die Messungen erfolgten mit einem Gerät des Typs AvancellIII800 (800 MHz Resonanzfrequenz der Protonen, entspricht einer Magnetfeldstärke von 18,8 T) der Firma Bruker Biospin GmbH mit der Software *TopSpin* Version 2.2.1 bei 293 K. Das Gerät war mit einem 5 mm Kryoprobenkopf mit Z-Gradienten ausgestattet. Die Proteinlösung wurde vor den Messungen gegen NMR-Puffer dialysiert, auf eine Endkonzentration von 650 μM konzentriert und vor der Messung mit 10 % (v/v) D_2O versetzt. Zum Prozessieren und Analysieren des $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -Korrelationsspektrums wurden die Programme *NMRPipe* und *NMRView* verwendet. Messungen und Datenanalyse wurden von Rica Patzschke (MLU Halle-Wittenberg, Institut für Physik) durchgeführt.

NMR-Puffer: 50 mM Tris/HCl; pH 7,5; 5 mM EDTA; 100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

2.2.4.12 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrischen Untersuchungen zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen und zur Sequenzidentifizierung von Proteinfragmenten wurden von Dr. Angelika Schierhorn (Max-Planck-Gesellschaft, Halle) durchgeführt. Zunächst erfolgte das Entsalzen der Proteine mithilfe von *ZipTips®* nach Herstellerangaben bzw. das Ausschneiden der zu untersuchenden Banden aus SDS-PA-Gelen. Die Untersuchungen fanden nach dem MALDI-TOF-MS-Verfahren an einem *REFLEX™*- oder *Ultraflex™ 3*-Massenspektrometer (Bruker-Franzen-Analytik, Bremen) statt.

3 Ergebnisse

Die Prodomäne scheint in der TGF- β -Superfamilie einen erheblichen Einfluss auf die biologische Funktion des jeweiligen Knochenwachstumsfaktors zu besitzen. Die in anderen Arbeiten der Arbeitsgruppe erhaltenen Ergebnisse deuteten darauf hin, dass auch im Fall von GDF5 eine biologische Interaktion zwischen der Prodomäne und dem reifen GDF5 besteht (Neumann 2014, Masterarbeit, MLU Halle-Wittenberg). In dieser Arbeit wurden die isolierte Prodomäne (AS 28 - 381 des Präproteins) und eine bereits identifizierte Subdomäne der Prodomäne (AS 194 - 347 des Präproteins) hergestellt und biophysikalisch charakterisiert. Die dadurch gewonnenen Daten sollten Einblicke auf die Funktion und Struktur der Prodomäne zulassen. Des Weiteren wurden NMR-Experimente mit der Subdomäne durchgeführt, um ein Strukturmodell dieses Teils der Prodomäne zu erstellen und somit die Klärung der Struktur der Prodomäne voranzutreiben. Die Untersuchung von zwei krankheitsassoziierten, innerhalb der genannten Subdomäne lokalisierten AS-Austauschen sollte Hinweise auf deren Einfluss auf die Funktion von GDF5 und den Pathogeneseprozess liefern.

3.1 Die Charakterisierung der Prodomäne von GDF5

3.1.1 Herstellung der isolierten Prodomäne

Das Expressionsplasmid zur Herstellung der isolierten Prodomäne wurde durch Insertion eines Stoppcodons am 5'-Ende der codierenden cDNA-Sequenz in das Plasmid pET-15b/proGDF5 hergestellt. Dies wurde durch *site directed mutagenesis* unter Verwendung der in Tabelle 2.5 beschriebenen Primer *pro for* und *pro rev* erreicht (siehe Material & Methoden). Das daraus entstandene Konstrukt wurde rekombinant in *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen exprimiert, wodurch Protein in Form von IBs akkumulierte. Durch die sich anschließende IB-Präparation konnten durchschnittlich 11 mg solubilisiertes Protein pro Gramm Zellfeuchtmasse gewonnen werden. In den IBs wurde neben der Prodomäne ein weiteres Protein detektiert, welches durch eine massenspektrometrische Analyse als *Outer Membrane Protein C* identifiziert wurde. Da diese Verunreinigung auch durch eine Intensivierung der Waschschrte nicht beseitigt werden konnte, wurde sie mittels einer immobilisierten Metallchelate-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen entfernt (Abb. 3.1A) (siehe 2.2.3.1).

Die Renaturierung der Prodomäne wurde auf Grundlage des bereits etablierten Protokolls von proGDF5 in Renaturierungspuffer I über eine Dauer von fünf Tagen durchgeführt (Hillger *et al.*, 2005). In einer SDS-PAGE wies das renaturierte Protein beim Vergleich von reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen keinen Unterschied im Laufverhalten auf. Da in der AS-Sequenz der Prodomäne zwei Cysteine vorkommen, lag aufgrund der Abwesenheit von Dimeren unter nicht-reduzierenden Bedingungen die Vermutung nahe, dass eine intramolekulare Disulfidbrücke vorhanden ist (Abb. 3.2). Die Reinigung der nativ gefalteten Prodomäne erfolgte zunächst mittels einer *SP-Sepharose*TM-Chromatographie, durch die verbliebene Verunreinigungen und während der Renaturierung entstandene, falsch gefaltete Proteinspezies abgetrennt wurden.

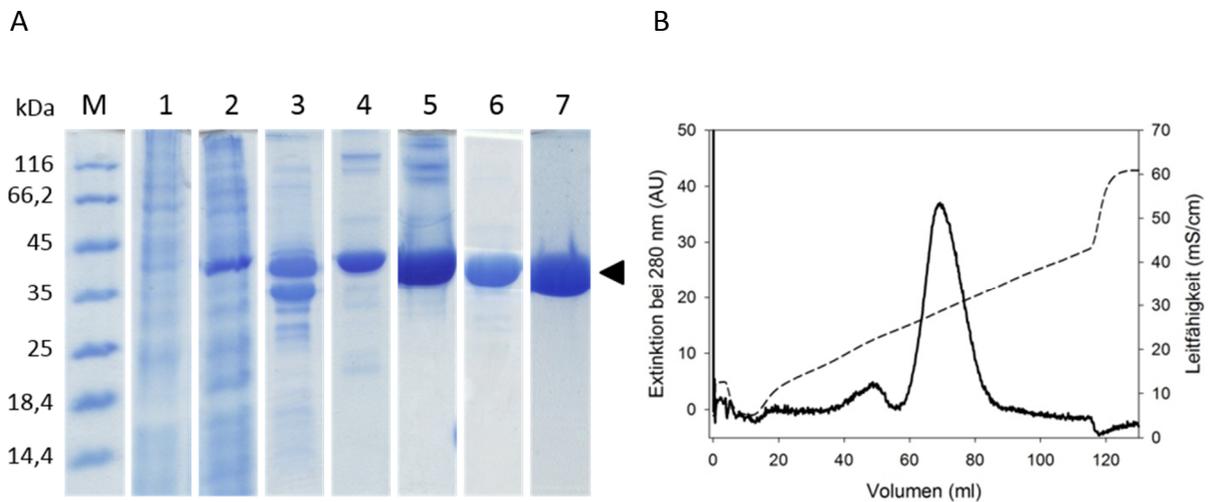


Abbildung 3.1: Rekombinante Genexpression und Reinigung der Prodomäne von GDF5. (A) SDS-PAGE-Gel des Proteins nach dem jeweiligen Herstellungsschritt: M) Proteingrößenstandard, 1) Zelllysats vor Induktion, 2) Zelllysats nach Induktion, 3) IB-Solubilisat, 4) nach IMAC, 5) nach Renaturierung, 6) nach *SP-Sepharose*TM-Chromatographie, 7) nach Heparin *Sepharose*TM-Chromatographie. Ein schwarzes Dreieck markiert das gereinigte Protein. (B) Elutionsprofil der Heparin *Sepharose*TM-Chromatographie der renaturierten Prodomäne. Gezeigt sind die Extinktion bei 280 nm (durchgezogene Linie) und die Leitfähigkeit (gestrichelte Linie).

Bei der Analyse der entsprechenden Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE konnten „Nebenbanden“ beobachtet werden, die mit der Prodomäne zusammen eluierenden, proteolytischen Abbauprodukten zugeordnet werden konnten. Mittels eines abschließenden Reinigungsschritts in Form einer Heparin *Sepharose*TM-Chromatographie konnten diese Verunreinigungen entfernt werden (Abb. 3.1A). Das zugehörige Elutionsprofil zeigt einen Peak bei einer Leitfähigkeit von 25,8 - 32,1 mS/cm. Dies entspricht einer NaCl-Konzentration von

370 - 480 mM im eluierenden Puffer. Die Symmetrie des Elutionspeaks lässt darauf schließen, dass das Protein als homogene Spezies vorlag (Abb. 3.1B). Zudem kann man im SDS-PA-Gel der entsprechenden Fraktionen erkennen, dass das eluierte Protein keine detektierbaren Verunreinigungen enthielt (schwarzer Pfeil). Nach der Renaturierung und der Entfernung verbliebener Verunreinigungen belief sich die Ausbeute an nativem Protein, bezogen auf die zur Renaturierung eingesetzten Menge, auf 40 %.

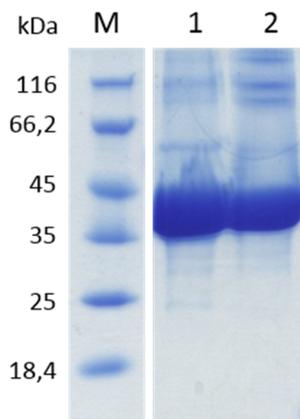


Abbildung 3.2: SDS-PA-Gel der renaturierten Prodomäne: M) Proteingrößenstandard, 1) Prodomäne unter reduzierenden Bedingungen, 2) Prodomäne unter nicht-reduzierenden Bedingungen.

3.1.2 Die Prodomäne zeigt eine definierte Sekundär- und Tertiärstruktur

Das in der Heparin *Sepharose*TM-Chromatographie in einem symmetrischen Peak eluierte Protein war ein erster Hinweis auf einen definierten Faltungszustand der Prodomäne. Diese Tatsache lieferte jedoch keine Aussage darüber, ob dieser der nativen Faltung entsprach. Um diese Frage zu klären, wurde die Prodomäne mit verschiedenen spektroskopischen Methoden untersucht.

Die bei der Fluoreszenzspektroskopie erhaltenen Daten lassen Rückschlüsse auf Tertiärkontakte von Proteinen zu. Wenn die aromatischen AS im hydrophoben Kern des Proteins lokalisiert sind, sollte die Denaturierung zu einer bathochromen Verschiebung des Emissionsmaximums führen. Die Emissionsspektren der mit Licht einer Wellenlänge von 280 nm angeregten Prodomäne zeigen diese Veränderung sehr deutlich (Abb. 3.3A). Das Maximum des Emissionsspektrums befand sich unter nativen Bedingungen bei $\lambda_{max} = 348$ nm. Unter denaturierenden Bedingungen verschob sich dieses Maximum auf $\lambda_{max} = 359,5$ nm. Bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm, der spezifischen Anregungswellenlänge von Tryptophan, war der gleiche Effekt zu beobachten (Abb. 3.3B). Das Emissionsmaximum lag unter nativen Bedingungen bei $\lambda_{max} = 349$ nm und damit ebenfalls bei einer kürzeren

Wellenlänge als unter denaturierenden Bedingungen bei $\lambda_{max} = 358$ nm. Diese Beobachtung legte nahe, dass die Umgebung der aromatischen AS unter nativen Bedingungen deutlich hydrophober war als im denaturierten Zustand. Demnach konnte davon ausgegangen werden, dass diese AS durch die Ausbildung einer definierten Tertiärstruktur vom Lösungsmittel abgeschirmt waren.

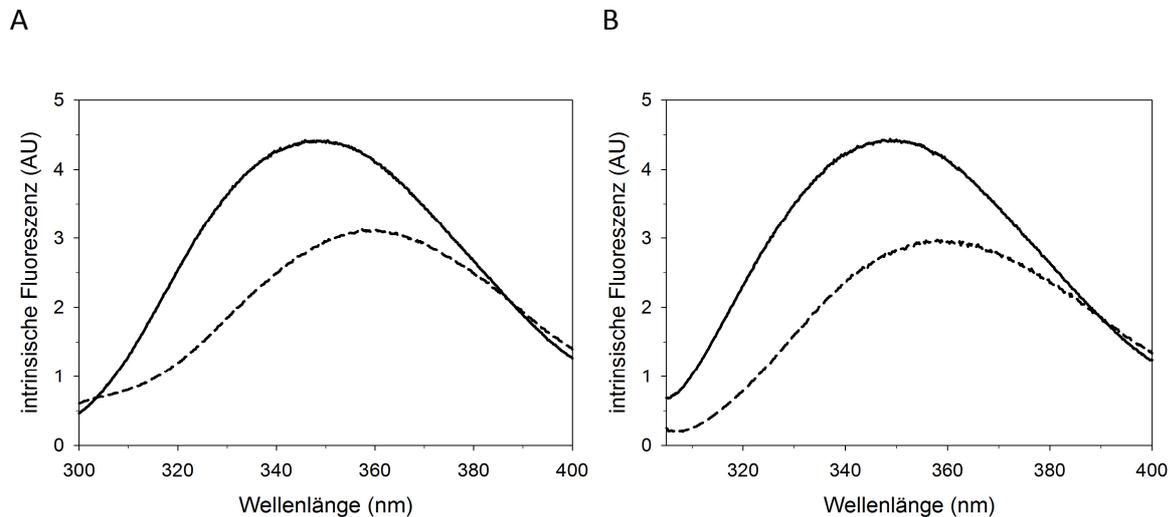


Abbildung 3.3: Intrinsische Fluoreszenz der Prodomäne von GDF5. Spektren wurden unter nativen (durchgezogene Linie) und denaturierenden Bedingungen (gestrichelte Linie) nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 280 nm (A) und 295 nm (B) gemessen. Details zur Methode siehe Abschnitt 2.2.4.3.

Um weitere Informationen über den Faltungszustand der isolierten Prodomäne zu erhalten, wurden Fern-UV-CD-Spektren aufgenommen. Anhand des Spektrenverlaufs kann ermittelt werden, welche Sekundärstrukturelemente das Protein aufweist. Wie bereits bei den Fluoreszenzspektren beobachtet werden konnte, lässt sich ein deutlicher Unterschied zwischen dem Spektrum unter nativen und dem unter denaturierenden Bedingungen feststellen (Abb. 3.4 A). Das denaturierte Protein zeichnete sich durch ein Spektrum aus, dessen Verlauf zwischen 205 nm und 250 nm auf *random coil*-Strukturen hindeutete (Sreerama & Woody, 2004). Das Spektrum des Proteins unter nativen Bedingungen wies hingegen auf definierte Sekundärstrukturelemente hin. Die Verschiebung der Messwerte zwischen 215 nm und 235 nm in den stärker negativen Signalbereich im Vergleich zum Spektrum des denaturierten Proteins war auf einen signifikanten Anteil an α -helikalen und β -Faltblattstrukturen zurückzuführen. Das Minimum lag bei 201 nm und somit zwischen dem eines *random coil*- und eines α -Helix-Spektrums. Der Anstieg des Signals von diesem Minimum

zu einer Wellenlänge von 190 nm beruht ebenfalls auf α - und β -Strukturanteilen. Die Tatsache, dass die Nulllinie bei 190 nm zwar fast erreicht, allerdings nicht überschritten wurde, deutete darauf hin, dass das Spektrum des Proteins trotz der vorhandenen Sekundärstrukturanteile von den *random coil*-Bereichen dominiert wird. Eine Dekonvolution des Spektrums mit mehreren Berechnungsprogrammen ergab einen durchschnittlichen Anteil von 54 % an ungefalteten Bereichen (Sreerama & Woody, 2000) (siehe Anhang, Tab. 6.1). Demnach ist davon auszugehen, dass die Struktur der Prodomäne von zahlreichen *loop*-Regionen geprägt ist.

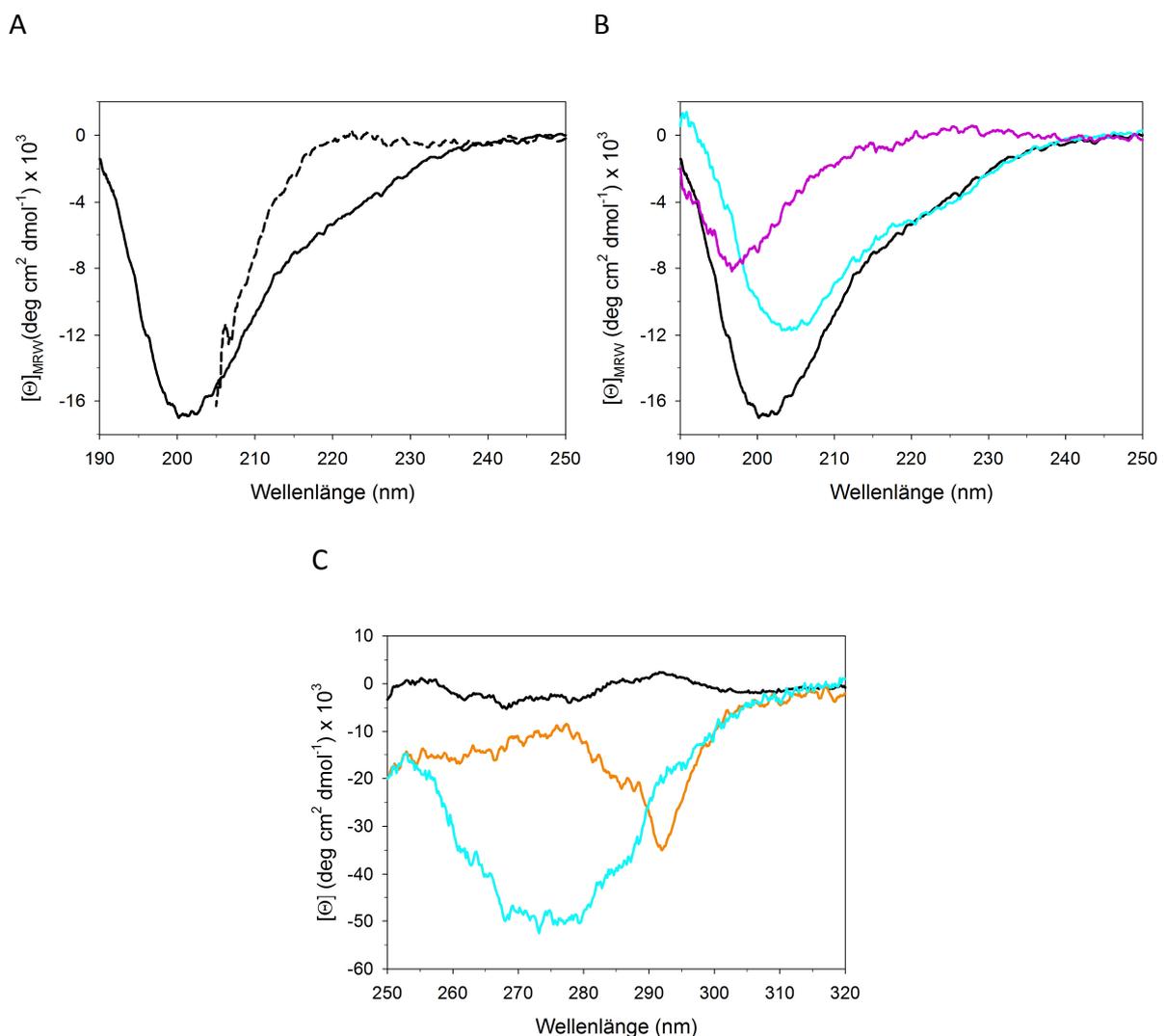


Abbildung 3.4: CD-Spektren der Prodomäne von GDF5 im Fern- (A und B) und Nah-UV-Bereich (C). (A) Spektren unter nativen (durchgezogene Linie) und denaturierenden Bedingungen (gestrichelte Linie). (B) Spektrum der Prodomäne (schwarze Linie), Differenzspektrum A (proGDF5 – GDF5, türkise Linie), Differenzspektrum B (Prodomäne – Differenzspektrum A, violette Linie). (C) Spektren der Prodomäne (schwarze Linie), von proGDF5 (türkise Linie) und GDF5 (orange Linie). Experimentelle Details siehe Abschnitt 2.2.4.5.

Ein Vergleich des Prodomänenspektrums unter nativen Bedingungen mit dem Differenzspektrum, das sich aus dem Spektrum von proGDF5 abzüglich des Spektrums des GDF5-Dimers ergab (Differenzspektrum A), zeigte die Unterschiede der isolierten Prodomäne zum äquivalenten Bereich im Proprotein auf (Abb. 3.4B). Im gesamten Bereich von 190 - 220 nm wies die isolierte Prodomäne eine stärker negative Elliptizität auf als das Differenzspektrum A. Dies ist ein deutlicher Hinweis dafür, dass die isolierte Prodomäne einen höheren *random coil*-Anteil besitzt als die Prodomäne im Kontext des Proproteins. Ein weiteres Merkmal des Differenzspektrums A, das für höhere Sekundärstrukturanteile der an GDF5 gebundenen Prodomäne spricht, stellt das zu einer längeren Wellenlänge verschobene Minimum dar. Ein Differenzspektrum, das sich durch die Subtraktion des bereits beschriebenen Differenzspektrums A von dem Spektrum der Prodomäne ergab (Differenzspektrum B), wies alle Charakteristika eines typischen *random coil*-Spektrums auf. Weiterhin führte eine Dekonvolution des Differenzspektrums A mit verschiedenen Berechnungsprogrammen zu einem *random coil*-Anteil von durchschnittlich 48 % und somit 6 % weniger als bei dem Spektrum der isolierten Prodomäne (Sreerama & Woody, 2000) (siehe Anhang, Tab. 6.1). Dies unterstützt die Annahme, dass Bereiche der Prodomäne nur in Gegenwart des GDF5-Dimers in der Lage sind, definierte Strukturen auszubilden.

Die CD-Spektren im Nah-UV-Bereich lassen wie bereits die Fluoreszenzspektren Rückschlüsse auf die Tertiärkontakte im Bereich der aromatischen AS zu. Dabei entsteht ein für das untersuchte Protein charakteristisches Spektrum, Strukturvorhersagen sind jedoch nicht möglich. Beim Vergleich der Spektren der Prodomäne und des Proproteins fallen die deutlich höheren Signalamplituden im Spektrum von proGDF5 auf (Abb. 3.4C). Im Spektrum von GDF5 war ebenfalls eine stärkere Amplitude als in dem der Prodomäne zu beobachten. Die Werte erreichten jedoch bei weitem nicht die des Proproteins. Dementsprechend muss von ausgedehnten Tertiärkontakten zwischen der Prodomäne und dem GDF5-Dimer ausgegangen werden.

3.1.3 Die isolierte Prodomäne liegt als Monomer vor

Von anderen Vertretern der Proteinfamilie wie z.B. TGF- β 1 ist bekannt, dass in der Prodomäne enthaltene Cysteine in einer intermolekularen Disulfidbrücke vorliegen. Dadurch entsteht zusätzlich zur Disulfidbrücke zwischen den Monomeren der reifen Domäne eine weitere kovalente Verbindung, welche zur Stabilisierung des dimeren Proproteins beiträgt (Brunner *et al.*, 1989). Wie die SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen jedoch zeigt, lag die renaturierte GDF5-Prodomäne nicht als kovalent verbrücktes Dimer vor. Im Anschluss an die Renaturierung wurde ein Ellman-Test durchgeführt, um zu prüfen, ob die zwei vorhandenen Cysteine oxidiert vorliegen. Weder in der isolierten Prodomäne, noch in proGDF5 konnten freie Thiolgruppen nachgewiesen werden. Da die Renaturierung beider Proteine in einem oxidierenden Milieu durchgeführt wurde, war zu erwarten, dass in der Prodomäne eine intramolekulare Disulfidbrücke vorhanden ist.

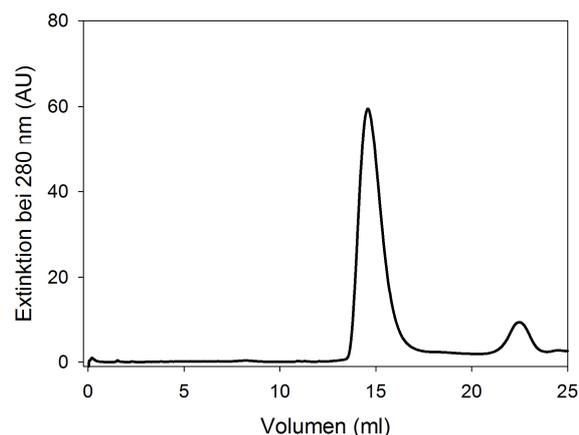


Abbildung 3.5: Elutionsprofil der analytischen Größenausschluss-Chromatographie mittels einer *Superdex 200 Prep Grade*-Säule der Prodomäne von GDF5. Gezeigt ist die Extinktion bei 280 nm. Weitere Details zur Methode siehe Abschnitt 2.2.3.4.

Nachdem ein kovalent verbundenes Prodomänendimer ausgeschlossen werden konnte, wurde geprüft, ob die Prodomäne in der Lage ist, eine nicht-kovalente Wechselwirkung mit einer zweiten Prodomäne auszubilden. Eine analytische Größenausschluss-Chromatographie der Prodomäne ergab eine apparente Molekülmasse von 95,9 kDa (Abb. 3.5). Die Tatsache, dass die berechnete Molekülmasse der hergestellten Prodomäne bei 40,9 kDa liegt, machte zunächst das Vorliegen eines Dimers wahrscheinlich.

Zur Überprüfung der Ergebnisse wurde eine analytische Ultrazentrifugation durchgeführt. Die Sedimentationsgeschwindigkeitsanalyse führte zu einem Sedimentationskoeffizienten von $s_{app} = 2,13$ S (Abb. 3.6A). Dieser Wert ist für ein globuläres Protein mit einer Molekülmasse von ca. 40 kDa deutlich zu klein (Svedberg & Pedersen, 1940). Die Daten der sich anschließenden Sedimentationsgleichgewichtsanalyse ergaben eine apparente Molekülmasse von 40,6 kDa (Abb. 3.6B). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die isolierte Prodomäne unter diesen Bedingungen in Lösung als Monomer vorliegt. Die Ergebnisse der analytischen Größenausschluss-Chromatographie und der Sedimentationsgeschwindigkeitsanalyse deuten jedoch darauf hin, dass die Form der Prodomäne stark von der eines globulären Proteins abweicht.

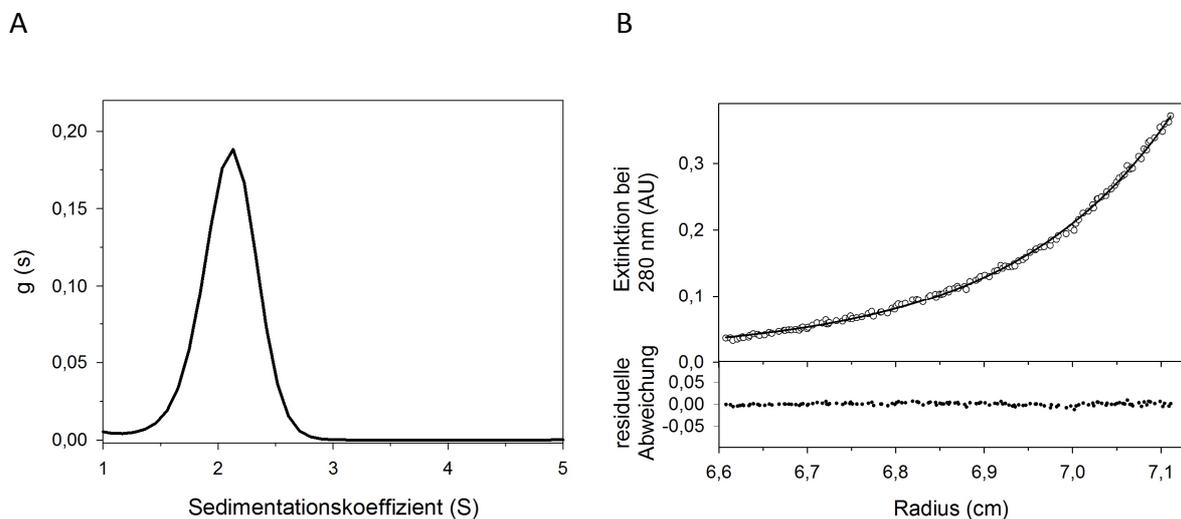


Abbildung 3.6: Analytische Ultrazentrifugation der Prodomäne von GDF5. (A) Sedimentationsgeschwindigkeitsanalyse bei 40 000 rpm. (B) Sedimentationsgleichgewichtsanalyse bei 12 000 rpm, Messpunkte (weiße Kreise) und nicht-lineare Regression (schwarze Linie) im oberen Feld, residuelle Abweichung im unteren Feld. Weitere Details zur Methode siehe Abschnitt 2.2.4.10. Die gezeigten Daten wurden von PD Dr. Hauke Lilie (MLU Halle-Wittenberg, Institut für Biochemie und Biotechnologie) erhalten.

3.1.4 Die Prodomäne wird durch GDF5 stabilisiert

Da die Ergebnisse der CD-Spektroskopie einen Hinweis darauf lieferten, dass es durch die Abwesenheit von GDF5 zu einer strukturellen Veränderung in der isolierten Prodomäne kommt, sollte nun geklärt werden, ob auch auf thermodynamischer Ebene Unterschiede zwischen der Prodomäne im Kontext des Proproteins und der isolierten Variante vorhanden sind.

Bei den mittels Fluoreszenzspektroskopie detektierten, chemisch-induzierten Entfaltungsübergängen wurden die Proteine durch steigende Harnstoffkonzentrationen denaturiert. Renaturierungsübergänge belegten eine volle Reversibilität der Entfaltung, eine Voraussetzung für die thermodynamische Auswertung der Daten. Die isolierte Prodomäne wies eine Gibbs'sche freie Entfaltungsenthalpie von $\Delta G_D (H_2O) = 26,8 \pm 1,1$ kJ/mol auf. Der Übergang zeigte eine Kooperativität von $m = 5,7 \pm 0,2$ kJ/mol M bei einem Übergangsmittelpunkt von $[D]_{1/2} = 4,7$ M (Abb. 3.7). Die thermodynamischen Daten der chemisch induzierten Denaturierung und Renaturierung sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Der Vergleich mit der Prodomäne im Kontext des Proproteins war in diesem Experiment nicht möglich, da die chemisch-induzierten Denaturierungsübergänge von proGDF5 keine auswertbaren Daten ergaben. Zum einen führte die Entfaltung der Prodomäne zu einer Abnahme des Fluoreszenzsignals, wohingegen sich bei GDF5 die Intensität der Emission erhöhte. Zum anderen war in den thermisch-induzierten Denaturierungsübergängen wie im Folgenden beschrieben zu beobachten, dass GDF5 nur unwesentlich stabiler als die Prodomäne war, wodurch sich die Signale bei der Entfaltung der beiden Domänen gegenseitig überlagerten (Abb. 3.8). Die Dokumentation der chemisch-induzierten Entfaltung von reifem GDF5 war durch die hohe Aggregationsneigung des Proteins bei niedrigen Konzentrationen an Denaturierungsmittel nicht möglich.

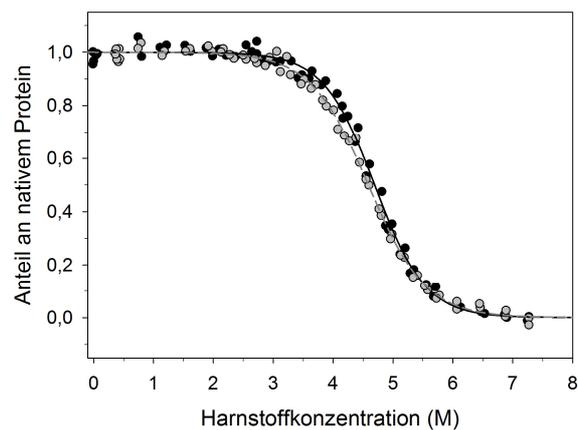


Abbildung 3.7: Harnstoff-induzierte Übergänge der Prodomäne von GDF5. Denaturierungsübergang (schwarze Kreise) und nicht-linearer Regression (schwarze Linie), Renaturierungsübergang (graue Kreise) und nicht-linearer Regression (graue, gestrichelte Linie). Detaillierte Beschreibung siehe Abschnitt 2.2.4.4.

Tabelle 3.1: Thermodynamische Daten der chemisch-induzierten Übergänge der Prodomäne

	Denaturierung	Renaturierung
$\Delta G (H_2O)$ in kJ/mol	$26,8 \pm 1,1$	$-23,2 \pm 0,8$
m -Wert in kJ/mol M	$5,7 \pm 0,2$	$5,1 \pm 0,2$
$[D]_{1/2}$ in M	4,7	4,6

Zur weiteren thermodynamischen Untersuchung der Prodomäne wurden thermisch-induzierte Denaturierungsübergänge mithilfe der dynamischen Differenzkalorimetrie aufgezeichnet. Sowohl für die Prodomäne als auch für proGDF5 konnte gezeigt werden, dass die Denaturierung vollständig reversibel war. Wie bereits in vorangegangenen Arbeiten belegt werden konnte, kam es bei der thermischen Denaturierung von proGDF5 zu einer partiellen Überlagerung der Signale bei den Entfaltungen der beiden Domänen (Thieme 2009, Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg). Im Gegensatz zur chemischen Denaturierung waren die DSC-Daten von proGDF5 jedoch weitgehend auswertbar und ermöglichten somit den Vergleich der Stabilität der Prodomäne im Kontext des Proproteins mit der isolierten Prodomäne. Mittels GDF5 als Referenz konnte bereits bewiesen werden, dass im Denaturierungsübergang von proGDF5 die bei ca. 340 K gelegene Schulter der Entfaltung der reifen Domäne entsprach (Thieme 2009, Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg). Demzufolge ist davon auszugehen, dass es sich beim Hauptpeak um die Entfaltung der Prodomäne handelte (Abb. 3.8).

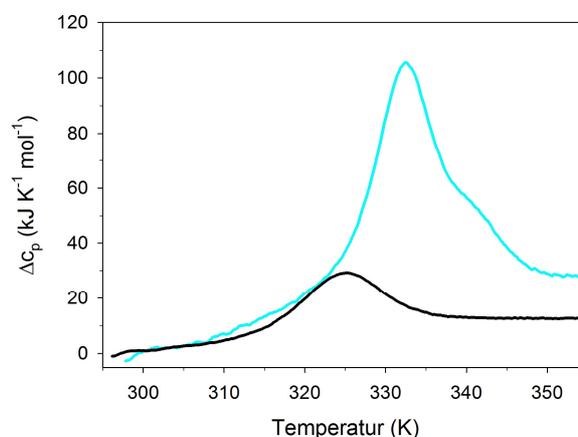


Abbildung 3.8: Thermisch-induzierte Denaturierungsübergänge der isolierten Prodomäne (schwarze Linie) und von proGDF5 (türkise Linie, Thieme 2009, Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg). Beschreibung zur Methode siehe Abschnitt 2.2.4.6.

Beim Vergleich der beiden Messkurven fällt auf, dass die Übergangstemperatur der isolierten Prodomäne bei $T_m = 325,2$ K, die der Prodomäne im Kontext des Proproteins bei $T_m = 332,5$ K lag. Die Differenz von $\Delta T_m = 7,3$ K führte zu der Annahme, dass das reife GDF5 die gebundene Prodomäne stabilisiert. Mithilfe des unter Punkt 2.2.4.6 beschriebenen Anpassungsverfahrens konnte die Entfaltungsenthalpie bei der Übergangstemperatur für die isolierte Prodomäne auf $\Delta H_D(T_m) = 258,4 \pm 0,4$ kJ/mol bestimmt werden. Die Entfaltungsenthalpie für die Prodomäne im Kontext des Proproteins lag bei $\Delta H_D(T_m) = 340,5 \pm 1,3$ kJ/mol (Thieme 2009, Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg), entsprechend einer Stabilisierung von $\Delta\Delta H_D(T_m) = 82,1$ kJ/mol. Allerdings muss in diesem Zusammenhang beachtet werden, dass durch die Überlagerung der Übergänge von Prodomäne und GDF5 die exakte Bestimmung der jeweiligen Entfaltungsenthalpien beeinträchtigt ist. Aufgrund der Größe des Unterschieds in der Entfaltungsenthalpie scheint es jedoch zu starken stabilisierenden Wechselwirkungen zwischen GDF5 und dessen Prodomäne zu kommen.

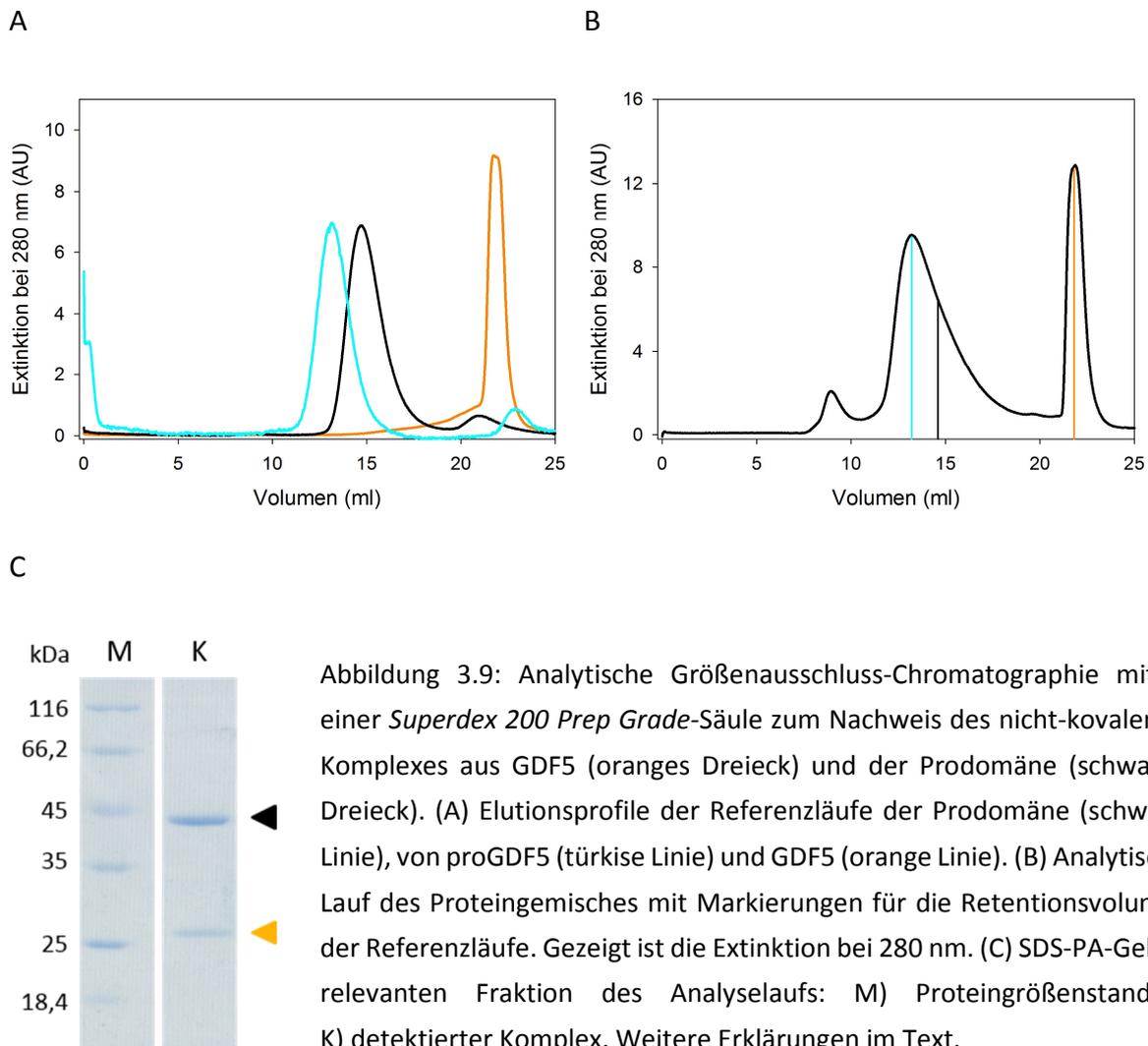
Weiterhin wurde versucht, die Prodomäne *in trans* durch gemeinsame Inkubation mit GDF5 zu stabilisieren. Jedoch führte das Experiment nicht zu einer ausreichenden Datenqualität um klare Aussagen über eine eventuelle Stabilisierung zu treffen.

3.1.5 Die Prodomäne bindet nicht-kovalent an GDF5

Von vielen Vertretern der TGF- β -Superfamilie wie z.B. BMP7 ist bekannt, dass die Prodomäne *in vivo* auch nach der proteolytischen Prozessierung nicht-kovalent mit der reifen Domäne assoziiert bleibt (Jones *et al.*, 1994). Die Konsequenz ist im Fall von TGF- β 1 die transiente Inaktivierung des reifen Wachstumsfaktors durch die assoziierte Prodomäne (Böttlinger *et al.*, 1996). Für GDF5 aus der Maus konnte ein derartiger Komplex *in vitro* bereits nachgewiesen werden (Sengle *et al.*, 2008a). Die Klärung der Frage, ob auch humanes GDF5 in der Lage ist, *in vitro* einen nicht-kovalenten Komplex mit der Prodomäne auszubilden und, falls das der Fall ist, wie stabil dieser Komplex ist, könnte Hinweise auf eine ähnliche Funktion liefern.

Die Assoziation zwischen dem reifen GDF5-Dimer und der isoliert hergestellten Prodomäne sollte zunächst für das humane Protein mithilfe der analytischen Größenausschluss-Chromatographie untersucht werden. Durch Inkubation der beiden Domänen mit einem molaren Überschuss der Prodomäne von 2:1 sollte dieser nicht-kovalente Komplex im korrekten stöchiometrischen Verhältnis gebildet werden. Der Chromatographielauf des

Proteingemisches zeigte zwei Hauptpeaks bei Retentionsvolumina von 13,2 ml und 21,9 ml (Abb. 3.9B). Referenzläufe mit der isolierten Prodomäne, GDF5 und proGDF5 (Abb. 3.9A) dienten der Identifizierung dieser Peaks. GDF5 wies ein Retentionsvolumen von 21,8 ml auf, weshalb der entsprechende Peak im Lauf des Proteingemisches nicht-komplexiertem GDF5 zugeordnet werden konnte. Die Prodomäne zeigte ein Retentionsvolumen von 14,6 ml, wobei der Peak von proGDF5 sein Maximum bei 13,2 ml erreichte. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass das Gemisch aus GDF5 und der Prodomäne einen nicht-kovalenten Komplex ausbildet, der im zugehörigen Chromatographielauf zu dem Peak bei 13,2 ml führte. Das *tailing* des Peaks des Gemisches wäre dementsprechend durch nicht-komplezierte Prodomäne zu erklären.



Auf einem SDS-PA-Gel der entsprechenden Fraktionen kann man erkennen, dass in dem Peak, der dem nicht-kovalenten Komplex zugeordnet wurde, sowohl die Prodomäne (schwarzer Pfeil) als auch das GDF5-Dimer (oranger Pfeil) zusammen eluierten (Abb. 3.9C). Eine densitometrische Analyse ergab ein Verhältnis von 1:1,93 mit der Prodomäne im Überschuss. Dieses Ergebnis bestätigte die Annahme, dass zwei Moleküle der Prodomäne nicht-kovalent an ein GDF5-Dimer binden.

Um die Bildung des nicht-kovalenten Komplexes zu bestätigen und Aussagen zur Affinität der Bindung zu erhalten, wurden SPR-Messungen durchgeführt. Dazu wurde GDF5 immobilisiert und die Prodomäne als Analyt eingesetzt. Bei der Analyse der aufgenommenen Sensogramme fiel auf, dass deren Verlauf deutlich von einer 1:1-Interaktion nach dem Langmuir'schen Bindungsmodell abwich. Sowohl die Assoziations- als auch die Dissoziationskurven setzten sich aus mehreren Phasen mit unterschiedlichen kinetischen Parametern zusammen (Abb. 3.10A). Aus diesem Grund war es nicht möglich, die Sensogramme nach den unter Punkt 2.2.4.7 beschriebenen Gleichungen 20 und 21 anzupassen. Stattdessen wurden die Amplituden der Assoziationskurven gegen die jeweils verwendeten Konzentrationen der Prodomäne aufgetragen, woraus sich eine Bindungskurve ergab (Abb. 3.10B).

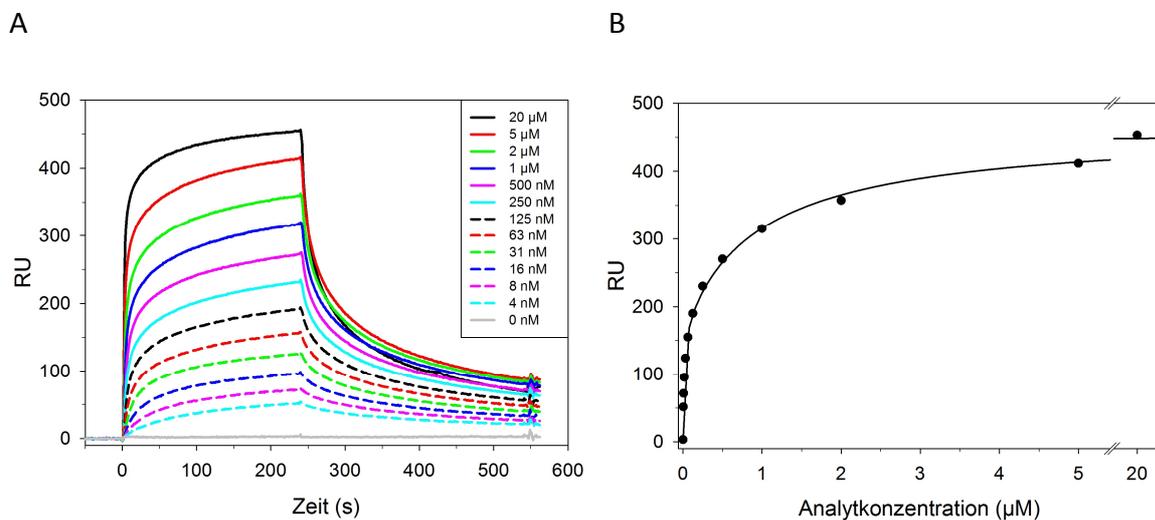


Abbildung 3.10: SPR-Messungen der Prodomäne auf immobilisiertem GDF5. (A) Sensogramme bei verschiedenen Analytkonzentrationen. (B) Auftragung der Amplituden der Assoziationskurven gegen die Analytkonzentration (schwarze Kreise) und nicht-lineare Regression (schwarze Linie). Informationen zum Vorgehen siehe Abschnitt 2.2.4.7.

Aufgrund der Ergebnisse der analytischen Größenausschluss-Chromatographie und dem Verlauf der Sensogramme wurde angenommen, dass sich jeweils zwei Prodomänenmoleküle mit unterschiedlicher Affinität an ein GDF5-Dimer anlagern. Entsprechend dieser Annahme wurde die Bindungskurve nach Gleichung 22 angepasst. Daraus ergab sich für die Bindung der ersten Prodomäne eine Dissoziationskonstante von $K_{D1} = 15,1 \pm 2,8$ nM und für die der zweiten ein Wert von $K_{D2} = 911 \pm 139$ nM. Aufgrund dieser Werte und dem „pseudo-hyperbolen“ Verlauf der Bindungskurve scheint die untersuchte Interaktion einer negativen Kooperativität zu unterliegen.

Es muss in diesem Zusammenhang erwähnt werden, dass im zur Datenerfassung verwendeten Bereich des Sensogramms kein Plateau erreicht wurde. Das lässt auf eine noch nicht im Gleichgewicht befindliche Assoziationsreaktion schließen. Ein eingestelltes Gleichgewicht wäre jedoch Voraussetzung für diese Art der Auswertung. Die für die Einstellung des Gleichgewichts nötige Verlängerung der Assoziationsreaktion war jedoch aus gerätetechnischen Gründen nicht möglich. Deshalb sind die hier ermittelten Daten unter Vorbehalt zu betrachten, wobei insbesondere der K_D -Wert für die Bindung der zweiten Prodomäne fehlerbehaftet sein könnte.

Der Versuch, die Ergebnisse durch ELISA-Experimente zu bestätigen, war aufgrund sehr starker Hintergrundsignale nicht möglich

3.1.6 Die Prodomäne beeinflusst vermutlich die Rezeptorbindung von GDF5

In vitro-Bindungsstudien mit der Proform von BMP2 haben dokumentiert, dass auch das Proprotein in der Lage ist, an den BMP-Rezeptortyp 1 zu binden (Hauburger *et al.*, 2009). Im Folgenden sollte geklärt werden, welche Rolle die Prodomäne von GDF5 bei der Rezeptorbindung spielt.

Das Bindeepitop des GDF5-Dimers für den BMP-Rezeptortyp 1 ist bekannt (Kotzsch *et al.*, 2009). Anhand röntgenkristallographischer Analyse des Komplexes von GDF5 mit dem BMP-Rezeptor 1B wurden 22 AS ermittelt, die sich sowohl in den zwei als „Finger“ bezeichneten β -Faltblättern als auch in der sogenannten „wrist“-Region rund um die α -Helix befinden. Weiterhin ist bekannt, dass GDF5 auf die gleiche Weise, jedoch mit verringerter Affinität auch an den BMP-Rezeptor 1A bindet (Nickel *et al.*, 2005). Mithilfe eines Peptid-Microarray, auf

dem die gesamte Sequenz von pre-proGDF5 in Form von sich überlappenden Polypeptiden einer Länge von 15 AS immobilisiert war, konnten nach Inkubation mit der Ektodomäne von BMPR1A mehrere Peptide erkannt werden, die insgesamt 16 der an der Bildung des Bindepitops beteiligten AS-Reste enthielten (Abb. 3.11). Bei den nicht nachgewiesenen AS handelte es sich zum Teil um in der AS-Sequenz verstreut gelegene Reste, die nur durch die Ausbildung der Tertiärstruktur von GDF5 in die räumliche Nähe des Bindepitops gelangen würden. Zusätzlich war es möglich, neben den Peptiden des Bindepitops im reifen Teil auch Interaktionen in verschiedenen Bereichen der Prodomäne zu identifizieren. Welche der in diesen Bereichen gelegenen AS tatsächlich für eine Bindung an die Rezeptorektodomäne verantwortlich sind, kann auf diese Weise nicht endgültig geklärt werden. Allerdings weisen die Daten darauf hin, dass die Prodomäne einen Einfluss auf die Bindung von GDF5 an den BMP-Rezeptortyp 1 ausübt oder selbst an den Rezeptor bindet.

```

1  MRLPKLLTFL LWYLAWLDLE FICTVLGAPD LGQRPOGTRP GLAKAEAKER PPLARNVFRP
61  GGHSYGGGAT NANARAKGGT GQTGGLTQPK KDEPKKLPPR PGGPEPKPGH PPQTRQATAR
121 TVTPKGQLPG GKAPPKAGSV PSSFLLKKAR EPGPPREPKE PFRPPPITPH EYMLSLYRTL
181 SDADRKGGNS SVKLEAGLAN TITSFIDKGQ DDRGPVVRKQ RYVFDISALE KDGLLGAELR
241 ILRKKPSDTA KPAAPGGGRA AQLKLSSCPS GRQPASLLDV RSVPGLDGSG WEVFDIWKLF
301 RNFKNSAQLC LELEAWERGR AVDLRGLGFD RAARQVHEKA LFLVFGRTTK RDLFFNEIKA
361 RSGQDDKTVY EYLFSQRRKR RAPLATRQGK RPSKNLKARC SRKALHVNFK DMGWDDWIIA
421 PLEYEAFHCE GLCEFPLRSH LEPTNHAVIQ TLMNSMDPES TPPTCCVPTR LSPISILFID
481 SANNVVYKQY EDMVVESCGC R

```

Abbildung 3.11: Darstellung der Ergebnisse des Peptid-Microarrays. Gezeigt ist die Sequenz von pre-proGDF5 mit hervorgehobener Prodomäne (grau hinterlegt). Die im Experiment detektierten Bindungsereignisse sind fett gedruckt, die AS des Bindepitops des BMP-Rezeptortyps 1 (Kotzsch *et al.*, 2009) sind rot dargestellt. Detaillierte Beschreibung siehe Abschnitt 2.2.4.8, Originaldaten sind im Anhang dargestellt.

Um Erkenntnisse zu erlangen, wie die Prodomäne von GDF5 auf die Rezeptorbindung einwirkt, wurden SPR-Messungen mit GDF5 und proGDF5 als Analyt durchgeführt. Beide Proteine zeigten eine Bindung an die immobilisierte BMPR1A-Ektodomäne, die einem Langmuir'schen Bindungsmodell entsprach (Abb. 3.12).

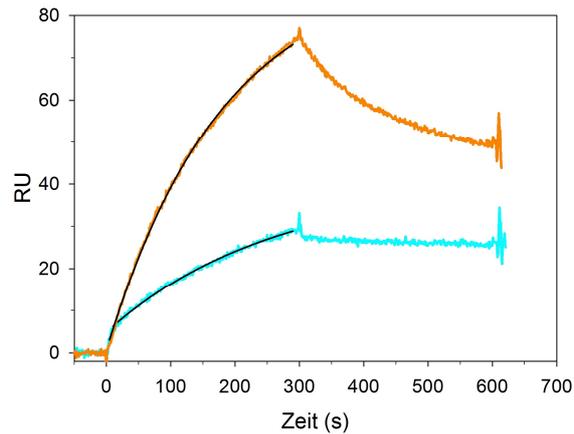


Abbildung 3.12: SPR-Messungen von proGDF5 (türkise Linie, $c = 300 \text{ nM}$) und GDF5 (orange Linie, $c = 100 \text{ nM}$) auf immobilisierte BMPR1A-Ektodomäne. Gezeigt sind Sensogramme und dazugehörige nicht-lineare Regression der Assoziationsphase (schwarze Linien). Informationen zum Vorgehen siehe Abschnitt 2.2.4.7.

Im Allgemeinen schien GDF5 mit einer höheren Affinität an den BMP-Rezeptor 1A zu binden als proGDF5. Dies spricht dafür, dass die Prodomäne die Interaktion von GDF5 mit dem Rezeptortyp 1 beeinträchtigt. Allerdings konnten bei Experimenten mit verschiedenen Analytkonzentrationen Unterschiede in der errechneten Dissoziationskonstante festgestellt werden. Je höher die eingesetzte Konzentration war, desto mehr sank die Affinität der Rezeptorbindung. Aufgrund dieses Umstandes wurde auf eine genaue Bestimmung der Bindungskonstanten verzichtet.

Versuche, die Affinität mittels ELISA zu bestimmen, lieferten aufgrund mangelnder Antikörperspezifität keine auswertbaren Ergebnisse. Eine Quantifizierung der Effekte der Prodomäne auf die Rezeptor-Interaktion der reifen Domäne konnte deshalb nicht erhalten werden.

3.2 Vergleichende Charakterisierung krankheitsassoziierter Prodomänenvarianten

Im Zuge genetischer Analysen von Patienten mit erheblichen Knochen- und Gelenkfehlbildungen wurden Mutationen im Gen für proGDF5 entdeckt, die zu AS Austauschen im Bereich der Prodomäne führten (Everman *et al.*, 2002; Schwabe *et al.*, 2004; Farooq *et al.*, 2013) (siehe Einleitung, Abb. 1.3). In früheren Arbeiten konnte mit Hilfe

von DSC-Messungen belegt werden, dass die in dieser Arbeit analysierten Austausche G319V und T201P zu einer Verringerung der thermodynamischen Stabilität der Prodomänen im Kontext der Proproteine führten. Des Weiteren wurden durch eine limitierte Proteolyse Hinweise auf strukturelle Unterschiede zwischen den einzelnen Varianten erhalten (Thieme 2009, Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg; Job 2011, Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg) (siehe Anhang, Abb. 6.2).

Um einen Einblick in die mutationsbedingten Veränderungen der Prodomäne zu erlangen, wurden analog zum Wildtyp auch die beiden Varianten G319V und T201P hergestellt. Produktion, Renaturierung und Reinigung der beiden Proteine erfolgte nach dem für den Wildtyp etablierten Protokoll (siehe 3.1.1). Der einzige Unterschied lag in einer verminderten Ausbeute an renaturiertem Protein, die sich für die Prodomänenvariante G319V auf 20 % und für T201P auf 15 % des zur Renaturierung eingesetzten Proteins belief.

3.2.1 Die Varianten weisen strukturelle Unterschiede auf

Im Folgenden wurden die beiden Varianten G319V und T201P spektroskopisch charakterisiert, um deren Faltungszustand zu überprüfen. Weiterhin sollte der Vergleich mit dem Wildtyp im Idealfall erste Hinweise auf den Pathogenesemechanismus ergeben.

Die Fluoreszenzspektren der beiden Varianten zeigten kaum Abweichungen zum Wildtyp. Bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 280 nm wies die Variante G39V unter nativen Bedingungen ein Emissionsmaximum bei $\lambda_{max} = 347,5$ nm auf, während die Variante T201P das Maximum bei $\lambda_{max} = 349$ nm erreichte. In denaturierender Umgebung ergaben sich zum Wildtyp identische Emissionsmaxima von $\lambda_{max} = 359,5$ nm. Bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm waren ebenfalls nur minimale Unterschiede in den Emissionsmaxima festzustellen (Abb. 3.13). Diese Ergebnisse legen nahe, dass wie beim Wildtyp auch die beiden Varianten vergleichbare Tertiärkontakte besitzen und sich die aromatischen AS dadurch in einer ähnlich hydrophoben Umgebung befanden. Am Emissionsspektrum der nativen T201P-Variante konnte eine Abnahme der Fluoreszenzintensität um 7 % im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden. Bereits bei Untersuchungen zum Proprotein mit dem Austausch T201P wurde diese spektroskopische Eigenschaft beschrieben, allerdings war in diesem Fall die Fluoreszenzintensität um ca. 20 % verringert (Job 2011, Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg). Dies könnte ein Hinweis auf geringe strukturelle Unterschiede sein. Da die Emissionsmaxima

in beiden Fällen denen des Wildtyps entsprachen, könnten eine oder mehrere aromatische AS bei gleicher Hydrophobizität ihrer Umgebung durch eine geringfügige strukturelle Umlagerung in die Nähe eines intramolekularen Quenchers wie z.B. eines Histidinrestes oder einer Disulfidbrücke gelangen, was die Reduktion des Fluoreszenzsignals bewirkt (Demchenko, 1986).

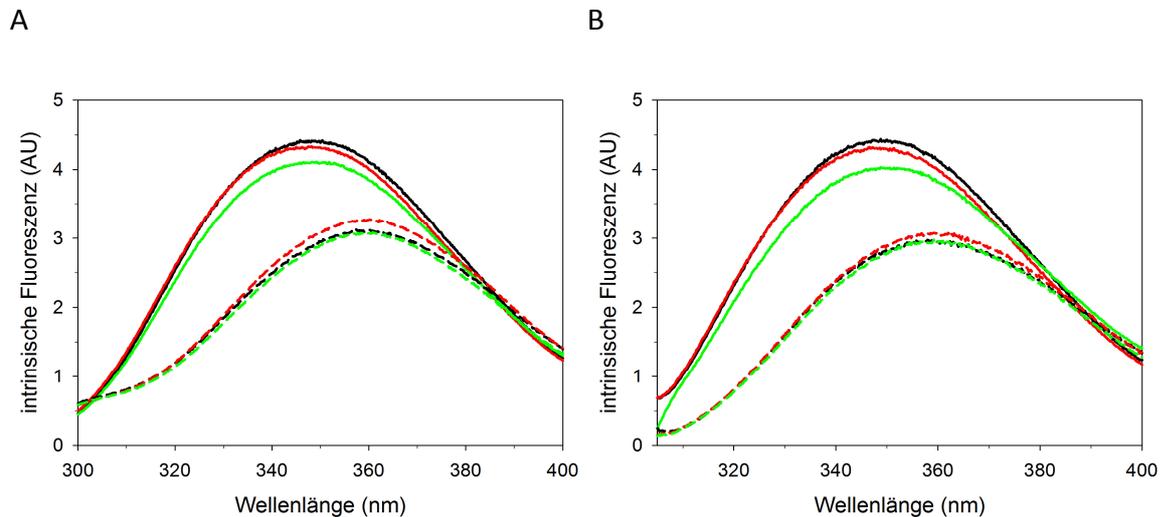


Abbildung 3.13: Intrinsische Fluoreszenz der Prodomänen des Wildtyps (schwarz), von G319V (rot) und T201P (grün). Spektren wurden unter nativen (durchgezogene Linie) und denaturierenden Bedingungen (gestrichelte Linie) nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 280 nm (A) und 295 nm (B) gemessen. Details zur Methode siehe Abschnitt 2.2.4.3.

Um Unterschiede in den vorhandenen Sekundärstrukturanteilen der beiden Varianten erkennen zu können und die Tertiärstruktur besser vergleichen zu können, wurden sowohl Fern- als auch Nah-UV-CD-Spektren der veränderten Prodomänen aufgezeichnet und mit denen des Wildtyps verglichen.

Wie erwartet, waren im Fern-UV-Bereich die bereits für den Wildtyp (siehe 3.1.2) beschriebenen deutlichen Abweichungen der Spektren unter nativen von denen unter denaturierenden Bedingungen zu erkennen (Abb. 3.14A). Beim direkten Vergleich der Spektren der entfalteten Proteine waren erwartungsgemäß keinerlei Unterschiede festzustellen. Die Prodomänenvarianten wiesen unter nativen Bedingungen ebenfalls ähnliche Spektren auf. Der einzige detektierbare Unterschied war im Bereich zwischen 190 nm und 203 nm bei der G319V-Variante zu erkennen. Das Minimum war von 201 nm auf 203 nm verschoben und erreichte nicht die volle Signalamplitude. Dies und der daraus resultierend

ebenfalls verschobene Signalanstieg von diesem Minimum hin zu 190 nm deuten auf einen geringfügig geringeren Anteil an *random coil*-Strukturen hin.

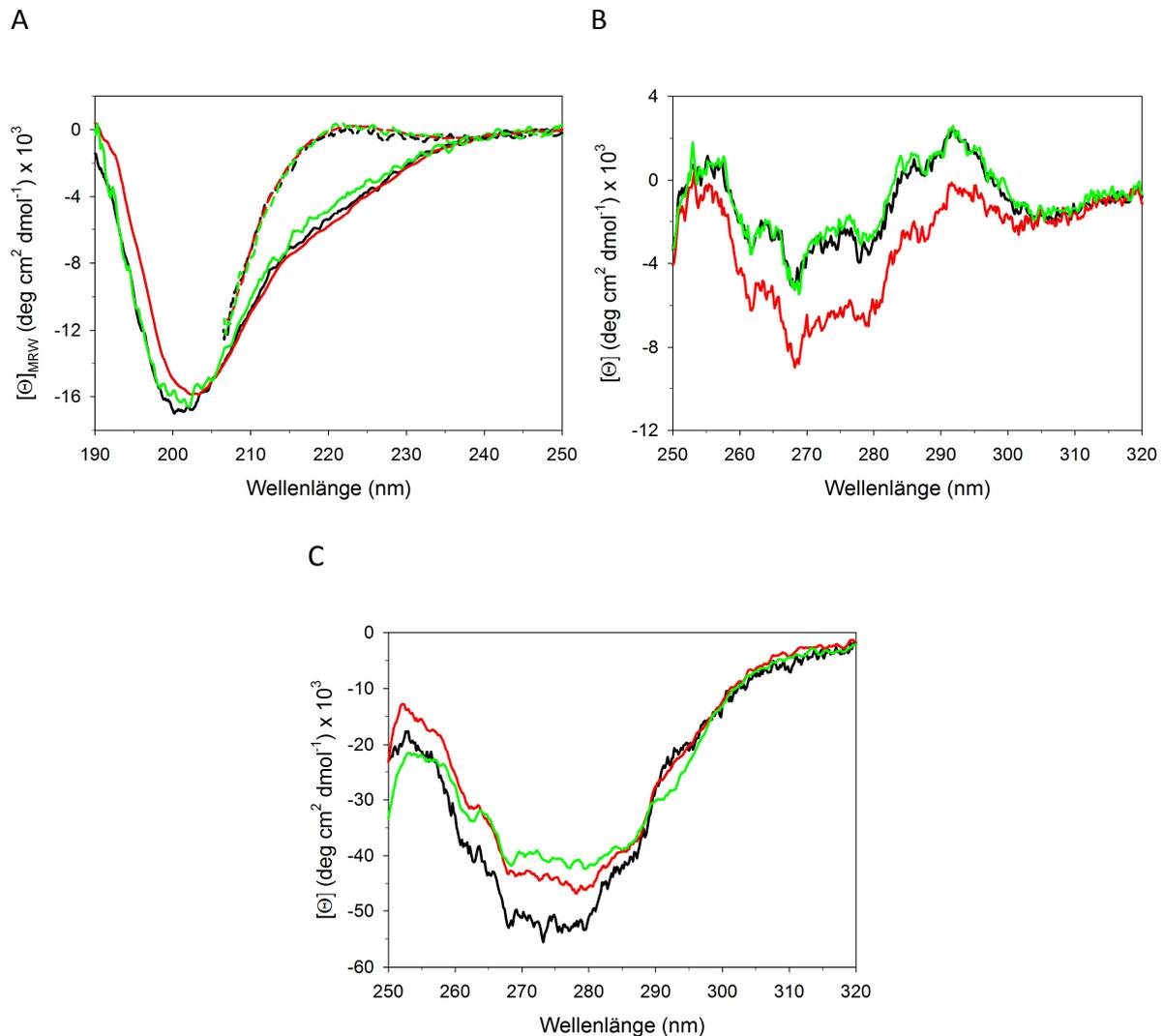


Abbildung 3.14: CD-Spektren der Proteinvarianten Wildtyp (schwarz), G319V (rot) und T201P (grün). (A) Spektren der verschiedenen Prodomänen unter nativen (durchgezogene Linie) und denaturierenden Bedingungen (gestrichelte Linie) im Fern-UV-Bereich. Spektren der verschiedenen (B) Prodomänen und (C) Propeptide unter nativen Bedingungen im Nah-UV-Bereich. Ähnliche Daten für proGDF5 T201P wurden bereits bei der Charakterisierung durch Florian Job gezeigt (Job 2011, Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg), die Versuche mussten aber aufgrund experimenteller Streuung wiederholt werden. Experimentelle Details siehe Abschnitt 2.2.4.5.

Wie in Abbildung 3.14B zu erkennen ist, sind die Nah-UV-Spektren der Wildtypprodomäne und der T201P-Variante nahezu identisch. Beide wiesen unter anderem ein charakteristisches Minimum bei 268 nm sowie Maxima bei 253 nm und 292 nm mit vergleichbaren Intensitäten auf. Ein deutlicher Unterschied besteht allerdings zwischen den Spektren des Wildtyps und

der G319V-Variante. Während die genannten Extrema alle jeweils bei den gleichen Wellenlängen lagen, verlief das Spektrum der G319V-Variante im Bereich von 254 - 303 nm bei einer deutlich negativeren Elliptizität als das des Wildtyps. Obwohl im Fluoreszenzspektrum lediglich eine hypsochrome Verschiebung des Emissionsmaximums um 1 nm erkennbar ist, sprechen die Differenzen im Nah-UV-Spektrum für strukturelle Veränderungen innerhalb der G319V-Prodomäne.

Um die strukturellen Auswirkungen der AS-Austausche im Kontext der Proproteine zu untersuchen, wurden von den drei proGDF5-Varianten Nah-UV-Spektren aufgenommen (Abb. 3.14C). Ein erster Vergleich von proGDF5 T201P mit dem Wildtyp durch CD-Spektroskopie erfolgte bereits im Rahmen einer Diplomarbeit durch Florian Job (Job 2011, Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg). Der Datensatz wurde mit höherer Qualität erneut erstellt und durch die Variante G319V erweitert. Wie bereits bei den Prodomänen zu beobachten war, ähneln sich die einzelnen Spektren im ausgebildeten Maximum um 253 nm und einem breiten Minimum zwischen 268 nm und 279 nm. Das Spektrum von proGDF5 G319V wich in der Signalamplitude zwischen 250 nm und 288 nm von dem des Wildtyps ab, allerdings zeigte es im Gegensatz zu den Prodomänenspektren eine geringere Signalintensität als das des Wildtyps. Der T201P-Austausch führte im Kontext des Proproteins anders als bei der isolierten Prodomäne zu deutlichen Veränderungen im Spektrum. Während der Austausch keine Auswirkungen auf das Spektrum der Prodomäne hatte, wich das Spektrum des Proproteins sehr deutlich vom Referenzspektrum des Wildtyps ab. So wiesen die Messwerte im Bereich von 257 nm bis 290 nm eine deutlich geringere Signalamplitude als das Referenzspektrum auf. Auch die Werte im Bereich zwischen 250 nm und 257 nm bzw. von 289 - 298 nm waren stärker ausgeprägt als beim Spektrum des Wildtyps. Demnach ist davon auszugehen, dass der AS-Austausch T201P im Kontext des Proproteins deutliche Veränderungen in der Tertiärstruktur hervorruft, während in der isolierten Prodomäne kaum Unterschiede zur Wildtypprodomäne vorhanden sind.

3.2.2 Limitierte Proteolyse bestätigt die strukturellen Unterschiede

Aus früheren Arbeiten war bereits bekannt, dass die verschiedenen Varianten des Proproteins von GDF5 in der limitierten Proteolyse teils deutliche Unterschiede aufweisen (Thieme 2009, Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg; Job 2011, Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg) (siehe

Anhang, Abb. 6.2). Da die Nah-UV-CD-Daten auf unterschiedlich stark ausgeprägte strukturelle Veränderungen in Proprotein und Prodomäne hinwiesen, wurden die Effekte der Austausche auch auf Ebene der Prodomänen verglichen. Experimentell kam limitierte Proteolyse mit Trypsin zum Einsatz (Abb. 3.15).

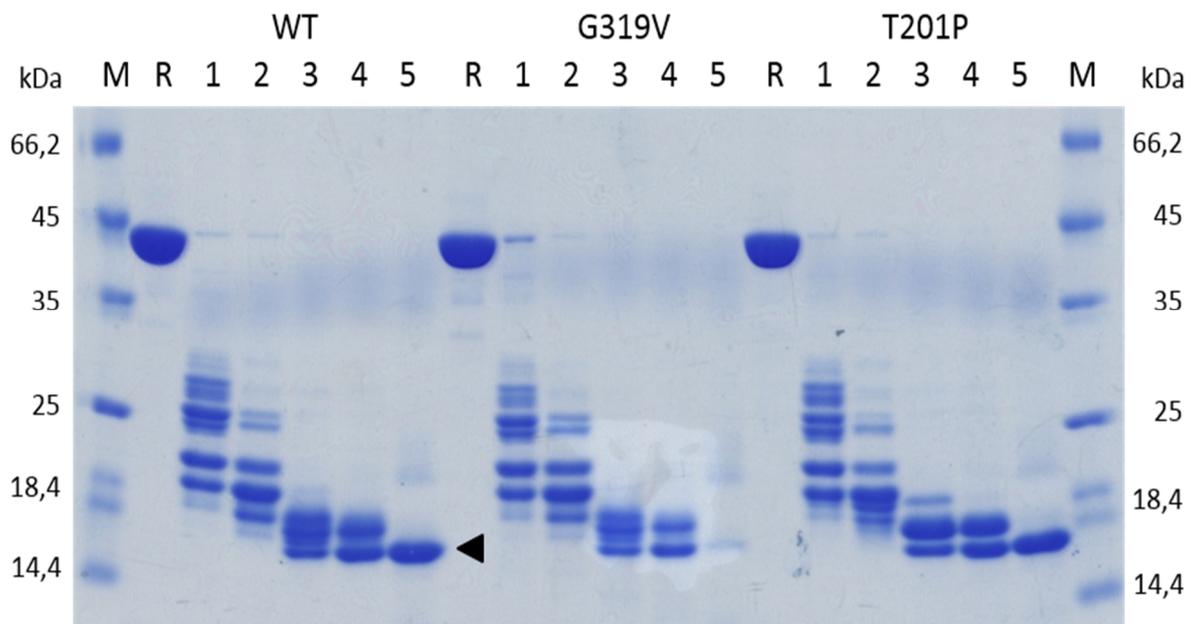


Abbildung 3.15: SDS-PA-Gel der limitierten Proteolyse der Prodomänen des Wildtyps, von G319V und T201P: M) Proteingrößenstandard, R) Referenz ohne Trypsin, ansteigende Trypsinkonzentrationen (Massenverhältnisse, Trypsin im Unterschuss) sind durch 1)1:1000, 2) 1:500, 3) 1:100, 4) 1:50 und 5) 1:10 gekennzeichnet. Das schwarze Dreieck markiert das 17 kDa-Fragment. Beschreibung zur Methode siehe Abschnitt 2.2.4.2.

Der Vergleich der Proteolysemuster der drei Varianten ergab nur geringe Unterschiede. Dies bestätigt die Ergebnisse der Fluoreszenzspektroskopie und Fern-UV-CD-Spektroskopie, die keine Hinweise auf signifikante Strukturunterschiede erbrachten. Es waren nur minimale Abweichungen in der Intensität einzelner Banden, im Speziellen bei der zweit- und dritthöchsten Trypsinkonzentration zu erkennen. Der deutlichste Unterschied zeigte sich bei der höchsten Trypsinkonzentration: Bei der Proteolyse des Wildtyps war eine dominante Proteinbande bei einer Molekülmasse von ca. 17 kDa zu erkennen (schwarzes Dreieck), die bereits in den Versuchen mit dem Proprotein beobachtet und mittels massenspektrometrischer Analyse als Fragment der Prodomäne identifiziert worden war (Thieme 2009, Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg). Anhand der Intensität der Gelbanden erkennt man, dass dieses Fragment mit steigender Proteasekonzentration nicht weiter

abgebaut wurde. Bei der Proteolyse der Variante T201P konnte dieses Fragment ebenfalls beobachtet werden. Bei der G319V-Variante fällt hingegen auf, dass es bei der gleichen Trypsinkonzentration nahezu vollständig abgebaut wurde. Dieses Ergebnis stimmt mit dem der Proteolyse der Proproteine überein (siehe Anhang, Abb. 6.2).

Im Allgemeinen wird deutlich, dass die Unterschiede im Proteolysemuster der Prodomänenvarianten geringer ausfallen als bei den Proproteinen. Dies bestätigt die Beobachtungen aus der CD-Spektroskopie, dass sich die Prodomänenvarianten untereinander scheinbar strukturell deutlich ähnlicher sind als die verschiedenen Proproteine.

3.2.3 Beide krankheitsassoziierte AS-Austausche führen zu einer Veränderung der thermodynamischen Stabilität

Nachdem durch Spektroskopie und limitierte Proteolyse Hinweise erhalten worden waren, dass die Austausche zu strukturellen Veränderungen führen, sollte auch die Frage nach dem Einfluss auf die thermodynamische Stabilität der Prodomäne geklärt werden. Dazu wurden die Prodomänenvarianten analog zum Wildtyp mittels Denaturierungsübergängen untersucht.

Wie durch chemisch-induzierte Denaturierungsübergänge gezeigt werden konnte, weisen die Varianten G319V und T201P eine mit der des Wildtyps vergleichbare Kooperativität auf (Abb. 3.16). Weiterhin wurde mittels Renaturierungsübergängen eine volle Reversibilität der Entfaltung bestätigt (Daten nicht gezeigt). Der AS-Austausch G319V führte zu einer leicht reduzierten Kooperativität und einen bei geringerer Harnstoffkonzentration liegenden Übergangsmittelpunkt. Das resultierte in einer Verringerung der Gibbs'schen freie Entfaltungsenthalpie um $\Delta\Delta G_D (H_2O) = 8,2 \text{ kJ/mol}$. Die Entfaltung der T201P-Variante erfolgte ebenfalls bei einer verminderten Harnstoffkonzentration, allerdings wurde dies durch eine erhöhte Kooperativität kompensiert. Dadurch war die thermodynamische Stabilität mit der des Wildtyps vergleichbar. Die thermodynamischen Daten sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

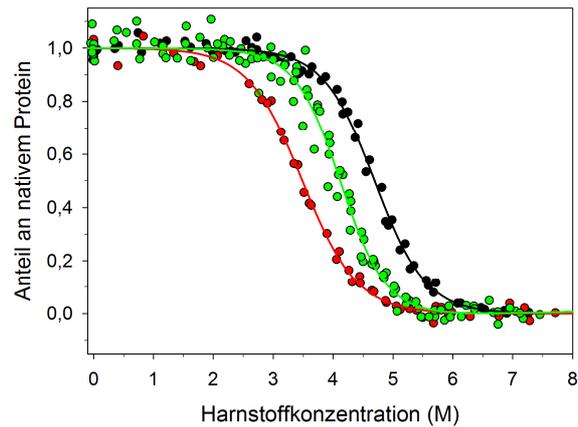


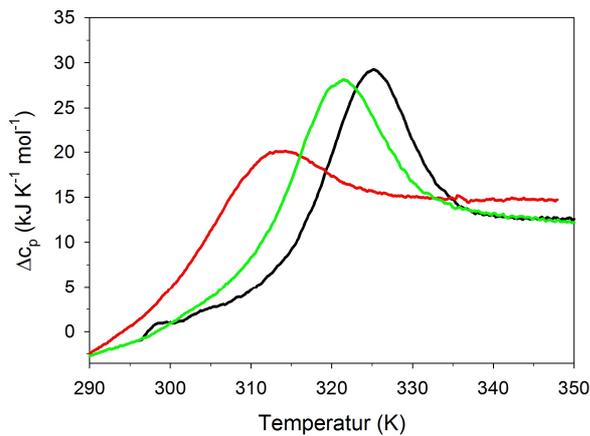
Abbildung 3.16: Harnstoff-induzierte Denaturierungsübergänge der Prodomänen des Wildtyps (schwarz), von G319V (rot) und T201P (grün). Gezeigt sind Denaturierungsübergänge (Kreise) und dazugehörige nicht-lineare Regressionen (Linie). Detaillierte Beschreibung siehe Abschnitt 2.2.4.4.

Die Ergebnisse der thermisch-induzierten Denaturierungsübergänge fielen sehr ähnlich zu den chemisch-induzierten aus (Abb. 3.17A). Sowohl die Übergangstemperatur T_m als auch die Entfaltungsenthalpie bei der Übergangstemperatur $\Delta H_D(T_m)$ waren für die G319V-Variante deutlich herabgesetzt. Die thermodynamische Stabilität war hier um $\Delta\Delta H_D(T_m) = 96,8 \text{ kJ/mol}$ verringert. Die Daten der T201P-Variante zeigten im Vergleich zum Wildtyp hingegen nur leicht veränderte Werte (Tab. 3.2).

Tabelle 3.2: Thermodynamische Daten der verschiedenen Prodomänenvarianten

	WT	G319V	T201P
$\Delta G_D(H_2O)$ in kJ/mol	$26,8 \pm 1,1$	$18,6 \pm 0,9$	$26,5 \pm 2,4$
m-Wert in kJ/mol M	$5,7 \pm 0,2$	$5,3 \pm 0,2$	$6,4 \pm 0,6$
$[D]_{1/2}$ in M	4,7	3,5	4,1
$\Delta H_D(T_m)$ der isolierten Prodomäne in kJ/mol	$258,4 \pm 0,4$	$161,6 \pm 1,3$	$239,5 \pm 0,8$
T_m der isolierten Prodomäne in K	325,2	313,5	321,5
T_m der Prodomäne im Proprotein in K	332,5	322,8	314,2

A



B

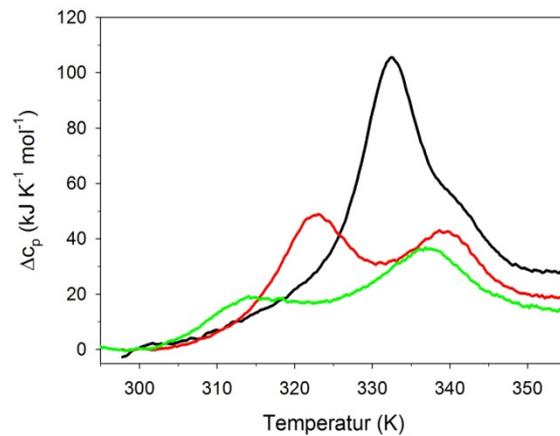


Abbildung 3.17: Thermisch-induzierte Denaturierungsübergänge der Prodomänen (A) und Proproteine (B) des Wildtyps (schwarz), von G319V (rot) und T201P (grün). Ähnliche Daten für die T201P-Varianten wurden bereits bei der Charakterisierung durch Florian Job gezeigt (Job 2011, Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg), die Versuche mussten aber aufgrund experimenteller Streuung wiederholt werden. Beschreibung zur Methode siehe Abschnitt 2.2.4.6.

Zum Vergleich dieser Ergebnisse mit denen der jeweiligen Proproteine werden auch die aus vorangegangenen Arbeiten stammenden thermisch-induzierten Übergänge der proGDF5-Varianten gezeigt (Thieme 2009, Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg; Job 2011, Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg) (Abb. 3.17B; Tab. 3.2). Die durch den Austausch G319V destabilisierte Prodomäne wurde im Proprotein in ähnlichem Ausmaß durch die Wechselwirkung mit GDF5 stabilisiert wie es für den Wildtyp der Fall ist. Die Übergangstemperatur der isolierten Prodomäne war um $\Delta T_m = 9,3$ K geringer als die der Prodomäne im Kontext des Proproteins. Bei der T201P-Variante war der Einfluss der Substitution völlig gegensätzlich ausgeprägt. So zeigte die DSC-Messung des Proproteins eine im Vergleich zum Wildtyp erheblich reduzierte Übergangstemperatur der Prodomäne, während die isolierte Prodomäne nur in geringem Maß destabilisiert zu sein schien. Die isolierte Prodomäne denaturierte bei einer Übergangstemperatur von $T_m = 321,5$ K, die Prodomäne im Kontext des Proproteins bereits bei $T_m = 314,2$ K.

Zusammenfassend erlauben die Ergebnisse die Aussage, dass der AS-Austausch G319V die Prodomäne destabilisiert, jedoch nur geringen Einfluss auf die Interaktion mit reifem GDF5 hat. Der Austausch T201P führt hingegen zu einer Aufhebung des stabilisierenden Effekts durch reifes GDF5. Die starke Destabilisierung der Prodomäne im Kontext des Proproteins

lässt den Schluss zu, dass die durch den Austausch T201P bedingten Veränderungen die Interaktion mit reifem GDF5 stören.

3.2.4 Der Austausch T201P reduziert die Affinität der Prodomäne zu GDF5

Für den Wildtyp wurde bereits dokumentiert, dass die Prodomäne in der Lage ist, nicht-kovalent an reifes GDF5 zu binden (siehe 3.1.5). Um den Einfluss der krankheitsassoziierten Mutationen auf diese Interaktion zu untersuchen, wurden die mit der Wildtypprodomäne durchgeführten SPR-Messungen mit den beiden Varianten erweitert. Auch hier konnte jeweils eine vergleichbare Abweichung vom Langmuir'schen Bindungsmodell wie beim Wildtyp beobachtet werden (siehe Anhang, Abb. 6.3), weshalb die Amplituden der Assoziationsreaktionen erneut gegen die jeweilige Analytkonzentration aufgetragen und mit Hilfe der Gleichung 22 ausgewertet wurden (Abb. 3.18). Wie bereits beim Wildtyp beobachtet werden konnte, reichte auch bei den beiden Varianten die maximal mögliche Dauer der Assoziationsreaktion nicht aus, um das für eine korrekte Auswertung nötige Gleichgewicht einzustellen. Demnach sind insbesondere die K_D -Werte der Bindung der zweiten Prodomäne nur eingeschränkt gültig.

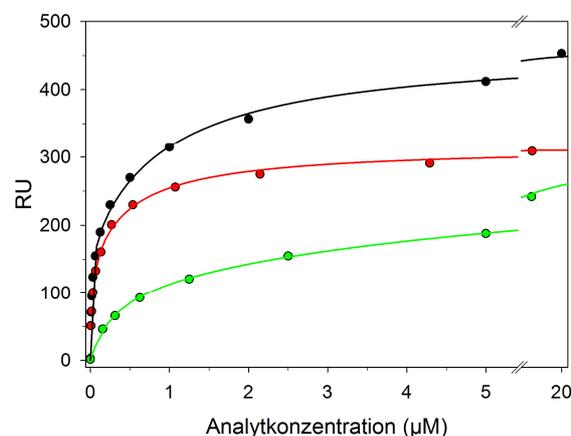


Abbildung 3.18: SPR-Messungen der Prodomänen des Wildtyps (schwarz), von G319V (rot) und T201P (grün) auf immobilisiertem GDF5. Gezeigt sind die Auftragungen der Amplituden der Assoziationskurven gegen die Analytkonzentration (Kreise) und dazugehörige nicht-lineare Regressionen (Linien). Informationen zum Vorgehen siehe Abschnitt 2.2.4.7.

Analog zur Wildtypprodomäne ist bei den Varianten zu erkennen, dass die Bindung der ersten Prodomäne an GDF5 eine deutlich höhere Affinität besaß als die der zweiten. Im Fall der G319V-Variante war die Dissoziationskonstante der Bindung der ersten Prodomäne mit $K_{D1} = 17,3 \pm 3,0$ nM mit der des Wildtyps vergleichbar. Weiterhin war die Bindung der zweiten Prodomäne mit $K_{D2} = 577 \pm 91$ nM sogar geringer beeinträchtigt. Damit bestätigte sich die Annahme, dass der Austausch G319V keinen negativen Einfluss auf die Interaktion zum reifen GDF5 hat. Die Prodomäne mit dem T201P-Austausch wurde hingegen stark in ihrer Fähigkeit, an das reife GDF5 zu binden, beeinflusst. Die berechnete Dissoziationskonstante für die Bindung der ersten Prodomäne lag mit $K_{D1} = 303 \pm 106$ nM um das 20-fache höher als die des Wildtyps. Die Affinität der zweiten Prodomäne war mit $K_{D2} = 7,18 \pm 3,48$ μ M ebenfalls um eine Größenordnung geringer.

Die Bindungsstudien bestätigten somit die Ergebnisse der thermodynamischen Untersuchungen dahingehend, dass der Austausch G319V keinen Einfluss auf die Wechselwirkung der Prodomäne mit GDF5 hat, während die Interaktion mit der reifen Domäne durch den AS-Austausch T201P stark gestört wird.

3.3 Die Charakterisierung des Kernfragments der GDF5-Prodomäne

Zu Beginn dieser Arbeit lagen keine Daten zur Struktur einer Prodomäne der TGF- β -Superfamilie vor. Trotz zahlreicher Versuche in Kooperation mit anderen Arbeitsgruppen gelang es nicht, Kristalle des Proproteins bzw. der isolierten Prodomäne zur Strukturaufklärung zu erhalten. Als Alternative dazu bietet sich die NMR-Spektroskopie an. Allerdings sind die Prodomänen der TGF- β -Superfamilie aufgrund ihrer hohen Molekülmassen für NMR-Versuche ungeeignet. Deshalb sollten mittels limitierter Proteolyse Subdomänen innerhalb der Prodomäne von GDF5 identifiziert werden, die sich aufgrund einer geringeren Molekülmasse für NMR-Untersuchungen eigneten. Bei der limitierten Proteolyse von proGDF5 konnte eine derartige Subdomäne identifiziert werden, die aufgrund ihrer apparenten Molekülmasse von 16,9 kDa für NMR-Untersuchungen geeignet schien (Thieme 2009, Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg). Wie bereits unter Punkt 3.2.2 beschrieben, wurde dieses Kernfragment auch bei Proteolyseexperimenten mit der isolierten Prodomäne beobachtet. Eine massenspektrometrische Analyse ergab, dass es sich in beiden Fällen um die gleiche Region in der C-terminalen Hälfte der Prodomäne (AS 194 - 347 des Präproproteins)

handelte (Abb. 3.19). Da auch bei anderen Vertretern der TGF- β -Superfamilie ähnliche proteolysestabile Bereiche in der Prodomäne gefunden werden konnten, sollte das Kernfragment näher untersucht und auf seine Eignung für NMR-Experimente getestet werden (Kuhfahl *et al.*, 2011).



Abbildung 3.19: Schema von humanem pre-proGDF5 mit Kernfragment. Gezeigt sind Signalpeptid (SP; gelb), Prodomäne (dunkelblau), Kernfragment (hellblau) und reifes GDF5 (grün), Zahlen geben jeweilige Begrenzung bzw. Länge der Abschnitte an.

3.3.1 Herstellung des Kernfragments

Zur biochemischen und biophysikalischen Untersuchung des Proteolysefragments wurde es rekombinant hergestellt und gereinigt. Die Isolierung und Amplifizierung des für die entsprechenden 154 AS kodierenden Abschnitts aus der cDNA-Sequenz der Prodomäne gelang durch eine Polymerase-Kettenreaktion unter Verwendung der in Tabelle 5 (siehe Material & Methoden) aufgeführten Primer *core for* und *core rev*. Das aus 501 Nukleotiden bestehende DNA-Fragment wurde im Rahmen der Bachelorarbeit von Maria-Teresa Weichler zunächst mittels *NdeI* und *BamHI* in den Vektor pET-15b kloniert (Weichler 2010, Bachelorarbeit, MLU Halle-Wittenberg). Die Grundlagen der Expression, Renaturierung und Reinigung wurden während der Diplomarbeit von Dorit Bennmann erarbeitet (Bennmann 2011, Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg) und nachträglich weiterentwickelt. Die rekombinante Expression des Konstrukts in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen führte zu einer Ablagerung des Proteins in Form von IBs. Die Präparation der IBs ergab eine Ausbeute von 6 mg solubiliertem Protein pro Gramm Zellfeuchtmasse. Da die IBs, wie bereits bei der Herstellung der Prodomäne, durch ein Membranprotein verunreinigt waren, wurden sie zunächst chromatographisch gereinigt. Der durch Dorit Bennmann etablierte erste Reinigungsschritt in Form einer IMAC wurde durch eine Heparin *Sepharose*TM-Chromatographie ersetzt. Die Renaturierung des Prodomänenfragments erfolgte nach dem gleichen Verfahren wie die der gesamten Prodomäne, jedoch wurde zur Steigerung der Ausbeute Renaturierungspuffer II verwendet (Bennmann 2011, Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg). In der abschließenden

*SP-Sepharose*TM-Chromatographie eluierte das Kernfragment als symmetrischer Peak bei der erwarteten Konzentration an Elutionsmittel. Während der Analyse der entsprechenden Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE konnten weder die bei der Prodomäne auftretenden Abbauprodukte noch andere Verunreinigungen beobachtet werden. Ein weiterer Reinigungsschritt war deshalb nicht nötig (Abb. 3.20). Die Ausbeute an nativem Protein in Bezug auf die zur Renaturierung eingesetzte Menge betrug 25 %.

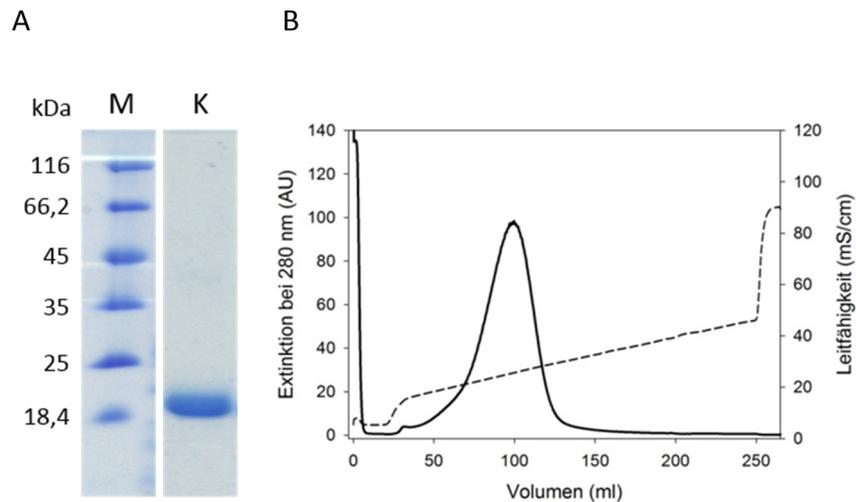


Abbildung 3.20: Reinigung des Kernfragments. (A) SDS-PAGE-Gel des gereinigten Proteins: M) Proteingrößenstandard, K) gereinigtes Kernfragment. (B) Elutionsprofil der *SP-Sepharose*TM-Chromatographie des renaturierten Kernfragments. Gezeigt sind die Extinktion bei 280 nm (durchgezogene Linie) und die Leitfähigkeit (gestrichelte Linie).

3.3.2 Das Kernfragment zeigt definierte Sekundär- und Tertiärkontakte

Mittels spektroskopischer Untersuchungen des Kernfragments sollte Aufschluss über vorhandene Sekundär- und Tertiärstrukturen erhalten werden.

Wie bereits für die gesamte Prodomäne belegt war, wiesen auch die Fluoreszenzspektren des Kernfragments auf definierte Tertiärkontakte hin. Eine Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 280 nm führte zu Emissionsspektren mit Maxima bei $\lambda_{max} = 349$ nm unter nativen und $\lambda_{max} = 360,5$ nm unter denaturierenden Bedingungen. Bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm war das Emissionsmaximum unter nativen Bedingungen geringfügig zu $\lambda_{max} = 350,5$ nm verschoben, während das Maximum unter denaturierenden Bedingungen ebenfalls bei $\lambda_{max} = 360,5$ nm lag (Abb. 3.21). Diese Ergebnisse stimmen mit denen für die gesamte Prodomäne weitgehend überein. Die drei in der Prodomäne enthaltenen

Tryptophane, welche das Fluoreszenzsignal maßgeblich prägen, liegen innerhalb des Kernfragments. Anhand der Daten ist davon auszugehen, dass deren Umgebung unter nativen Bedingungen eine ähnliche Struktur aufweist wie der entsprechende Bereich der Prodomäne.

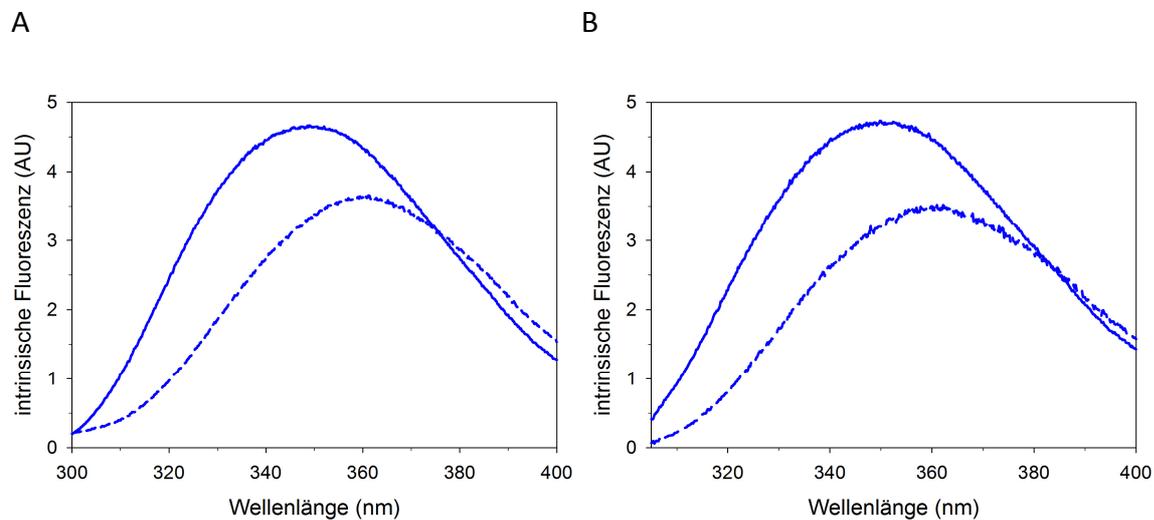


Abbildung 3.21: Intrinsische Fluoreszenz des Kernfragments. Spektren wurden unter nativen (durchgezogene Linie) und denaturierenden Bedingungen (gestrichelte Linie) nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 280 nm (A) und 295 nm (B) gemessen. Entsprechende Daten wurden bereits bei der Charakterisierung des Kernfragments durch Dorit Bennmann gezeigt (Bennmann 2011, Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg). Details zur Methode siehe Abschnitt 2.2.4.3.

Das Fern-UV-CD-Spektrum unter nativen Bedingungen zeigt, dass im Bereich von 209 - 227 nm eine höhere Amplitude erreicht wird als bei der gesamten Prodomäne. Außerdem war das Minimum um 2 nm auf 203 nm verschoben. Weiterhin fiel auf, dass der gesamte Bereich zwischen 190 nm und 209 nm eine weniger negative Elliptizität besaß. Das Maximum bei 191 nm lag deutlich im positiven Bereich (Abb. 3.22A). Diese Fakten sprechen alle dafür, dass im Kernfragment der Anteil an α -helikalen und β -Faltblatt-Strukturen im Vergleich zur gesamten Prodomäne deutlich erhöht war. Ein Differenzspektrum, das durch die Subtraktion des Spektrums des Kernfragments von dem der Prodomäne berechnet wurde (Differenzspektrum C), bestätigte diese Annahme. Die geringere Signalamplitude zwischen 209 nm und 227 nm, die negativeren Werte von 190 - 209 nm und ein Maximum bei 190 nm, das deutlich im negativen Bereich lag, wiesen auf erhöhte *random coil*-Anteile in dem Abschnitt der Prodomäne außerhalb des Kernfragments hin. Eine Dekonvolution mit diversen Berechnungsprogrammen führte zu dem Ergebnis, dass das Kernfragment einen *random coil*-

Anteil von durchschnittlich 44 % und damit 10 % weniger als die gesamte Prodomäne aufweist (Sreerama & Woody, 2000) (siehe Anhang, Tab. 6.1).

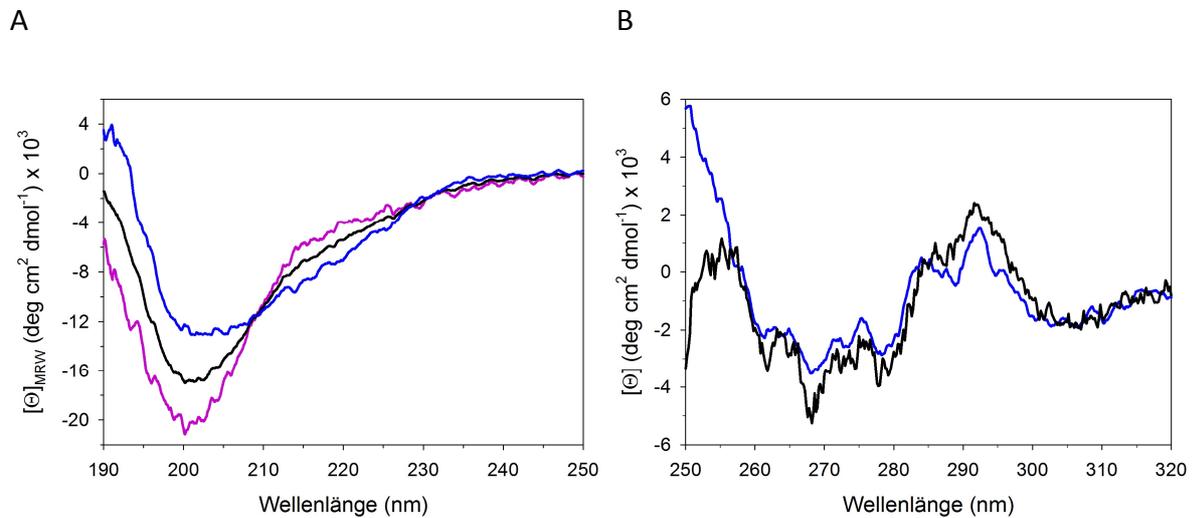


Abbildung 3.22: CD-Spektren der Prodomäne (schwarze Linie) und des Kernfragments (blaue Linie). (A) Spektren im Fern-UV-Bereich, Differenzspektrum C (Prodomäne – Kernfragment, violette Linie) (B) Spektren im Nah-UV-Bereich. Ähnliche Daten für das Kernfragment wurden bereits bei der Charakterisierung durch Dorit Bennmann gezeigt (Bennmann 2011, Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg), die Versuche mussten aber aufgrund experimenteller Streuung wiederholt werden. Experimentelle Details siehe Abschnitt 2.2.4.5.

Beim Vergleich der Nah-UV-Spektren der gesamten Prodomäne und des Kernfragments fällt auf, dass sich die Spektren im Bereich von 257 nm bis 320 nm ähneln. Die charakteristischen Extrema traten bei gleichen Wellenlängen auf, jedoch erreichten sie im Fall des Kernfragments nicht immer die Intensität des Spektrums der gesamten Prodomäne. Lediglich im Bereich zwischen 250 nm und 257 nm, der hauptsächlich durch die Absorption der Phenylalanine bestimmt wird, zeigten die Spektren einen grundsätzlich gegensätzlichen Verlauf (Abb. 3.22B). Die Spektren wurden auf die molare Elliptizität normiert und bilden somit die Tertiärstruktur des gesamten untersuchten Proteins ab. Demnach kann man davon ausgehen, dass sich ein großer Teil der detektierbaren Tertiärkontakte der gesamten Prodomäne im Bereich des Kernfragments befindet. In dem übrigen Bereich der Prodomäne, der hauptsächlich die N-terminale Hälfte umfasst, wären dieser Annahme zufolge nur wenige Tertiärkontakte vorhanden.

Sowohl die vergleichbare Tertiärstruktur als auch der erhöhte Sekundärstrukturanteil weisen darauf hin, dass es sich bei der untersuchten Subdomäne tatsächlich um die strukturelle Kerndomäne der Prodomäne handelte.

3.3.3 Das Kernfragment zeigt eine kooperative, reversible Denaturierung

Zur Untersuchung der thermodynamischen Stabilität des Kernfragments wurden wie bei der gesamten Prodomäne verschiedene Entfaltungsübergänge analysiert.

Die mittels Fluoreszenzspektroskopie detektierte, durch Harnstoff induzierte Denaturierung zeigte einen kooperativen Übergang mit einem Übergangsmittelpunkt von $[D]_{1/2} = 4,3 \text{ M}$ (Abb. 3.23). Nach der Bestätigung der vollen Reversibilität durch Aufnahme eines Renaturierungsübergangs ergab die Auswertung der Daten eine Gibbs'sche freie Entfaltungsenthalpie von $\Delta G_D (H_2O) = 20,5 \pm 1,1 \text{ kJ/mol}$ und eine Kooperativität von $m = 4,8 \pm 0,2 \text{ kJ/mol M}$. Damit weist das Kernfragment im Vergleich zur gesamten Prodomäne eine um $\Delta\Delta G_D (H_2O) = 6,3 \text{ kJ/mol}$ verringerte thermodynamische Stabilität auf. Die thermodynamischen Daten der chemisch-induzierten Denaturierung und Renaturierung sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass das Kernfragment lediglich 45 % der AS der Prodomäne umfasst, kann man jedoch davon ausgehen, dass dieser Abschnitt den maßgeblichen Anteil der für die Stabilität der Prodomäne verantwortlichen intramolekularen Wechselwirkungen beinhaltet.

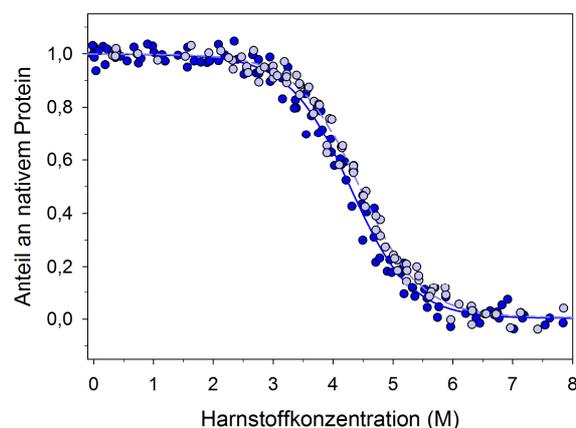


Abbildung 3.23: Harnstoff-induzierte Übergänge des Kernfragments. Denaturierungsübergang (blaue Kreise) und nicht-lineare Regression (blaue Linie), Renaturierungsübergang (hellblaue Kreise) und nicht-lineare Regression (hellblaue, gestrichelte Linie). Detaillierte Beschreibung siehe Abschnitt 2.2.4.4.

Tabelle 3.3: Thermodynamische Daten der chemisch-induzierten Übergänge des Kernfragments

	Denaturierung	Renaturierung
$\Delta G (H_2O)$ in kJ/mol	$20,5 \pm 1,1$	$-20,7 \pm 1,0$
m -Wert in kJ/mol M	$4,8 \pm 0,2$	$4,7 \pm 0,2$
$[D]_{1/2}$ in M	4,3	4,4

Die thermisch-induzierte Denaturierung bestätigte die Ergebnisse des Harnstoffübergangs. Auch hier zeigte sich eine vergleichbar verringerte Stabilität des Kernfragments gegenüber der gesamten Prodomäne (Abb. 3.24). Die Übergangstemperatur lag bei $T_m = 318,8$ K und somit um $\Delta T_m = 6,4$ K geringer als bei der Prodomäne. Die Entfaltungsenthalpie bei der Übergangstemperatur wurde für das Kernfragment zu $\Delta H_D(T_m) = 211,4 \pm 0,8$ kJ/mol bestimmt, wodurch sich eine Differenz von $\Delta\Delta H_D(T_m) = 47$ kJ/mol zur Prodomäne ergab.

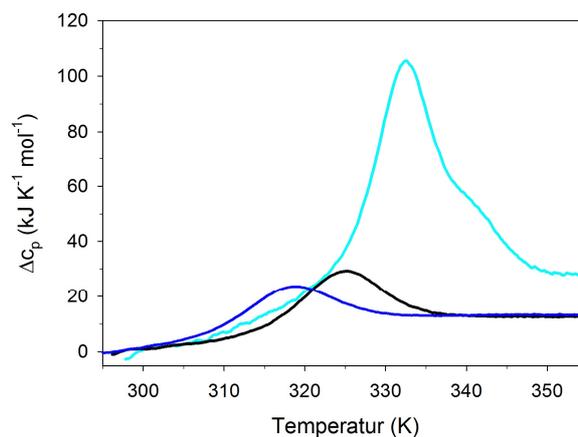


Abbildung 3.24: Thermisch-induzierte Denaturierungsübergänge der isolierten Prodomäne (schwarze Linie), des Kernfragments (blaue Linie) und proGDF5 (türkise Linie, Thieme 2009, Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg). Beschreibung zur Methode siehe Abschnitt 2.2.4.6.

3.3.4 Eine Wechselwirkung zwischen dem Kernfragment und GDF5 kann nicht eindeutig belegt werden

In weiteren Untersuchungen sollte geklärt werden, ob das Kernfragment an der Interaktion der Prodomäne mit GDF5 beteiligt ist. In früheren Studien konnte für den verwandten Wachstumsfaktor BMP2 bereits gezeigt werden, dass das entsprechende Kernfragment in dessen Prodomäne eine nicht-kovalente Interaktion mit dem reifen Teil eingeht. Dabei wurde

mittels Peptid-*Microarrays* nachgewiesen, dass ein Großteil der an der Interaktion der Prodomäne mit dem reifen Wachstumsfaktor beteiligten AS-Reste innerhalb des Kernfragments lokalisiert ist (Kuhfahl *et al.*, 2011).

Zur Untersuchung einer potentiellen Interaktion wurden SPR-Messungen mit dem Kernfragment als Analyt und immobilisiertem GDF5 durchgeführt. Wie auch schon bei der Untersuchung der Prodomäne fiel auf, dass die gemessenen Sensogramme kein Plateau ausbildeten, sondern das Messsignal während der gesamten Assoziationsphase anstieg. Jedoch war dieser Effekt bei den Messungen mit dem Kernfragment deutlich stärker ausgeprägt als bei denen mit der gesamten Prodomäne (Abb. 3.25A).

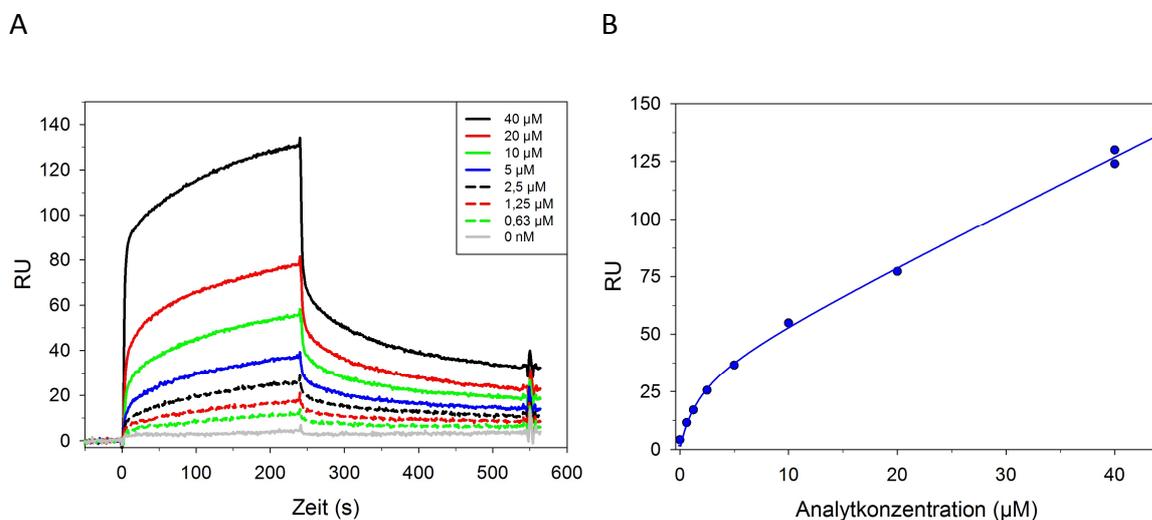


Abbildung 3.25: SPR-Messungen des Kernfragments auf immobilisiertem GDF5. (A) Sensogramme bei verschiedenen Analytkonzentrationen. (B) Auftragung der Amplituden der Assoziationskurven gegen die Konzentration (blaue Kreise) und nicht-lineare Regression (blaue Linie). Informationen zum Vorgehen siehe Abschnitt 2.2.4.7.

Aufgrund der Interaktion von zwei Prodomänen mit GDF5 wurde angenommen, dass bei der Assoziation mit dem GDF5-Dimer je zwei Moleküle des Kernfragments beteiligt sein würden. Die Auswertung der Daten erfolgte deshalb ebenfalls durch Auftragung der Amplituden der Assoziationskurven gegen die jeweilige Analytkonzentration und anschließender Anpassung nach Gleichung 22. Die sich daraus ergebende Bindungskurve stieg, nach einem kurzen hyperbolischen Verlauf, ab einer Konzentration von ca. 5 µM stetig und nahezu linear an (Abb. 3.25B). Die errechnete Dissoziationskonstante für die Bindung des ersten Kernfragments an GDF5 wäre mit $K_{D1} = 1,73 \pm 0,71 \mu\text{M}$ um den Faktor 100 höher als der für die Bindung der gesamten Prodomäne. Der K_D -Wert für die Bindung eines zweiten Moleküls läge bei

$K_{D2} = 9,5 \pm 0,2$ M und damit weit außerhalb des Bereichs, der für eine spezifische Komplexbildung relevant wäre. Diese Ergebnisse deuten auf eine unspezifische Wechselwirkung statt der Bindung eines zweiten Moleküls hin. Die dieser Annahme entsprechende Auswertung führte ebenfalls zu einer Dissoziationskonstante von $K_D = 1,7 \mu\text{M}$ für die potentielle Bindung des Kernfragments. Eine analytische Größenausschluss-Chromatographie des Kernfragments mit GDF5 zeigte keinerlei Anzeichen für eine Komplexbildung (Daten nicht gezeigt).

Der Versuch, weitere Erkenntnisse durch ELISA-Untersuchungen zu erhalten, scheiterte an den bereits bei den Messungen mit der Prodomäne beobachteten starken Hintergrundsignalen. Da es nicht gelang, einen nicht-kovalenten Komplex zwischen dem Kernfragment und GDF5 nachzuweisen, wurde angenommen, dass das Kernfragment keine oder nur sehr wenige Segmente des mit GDF5 interagierenden Bereiches der Prodomäne umfasst.

3.3.5 Vorbereitende Arbeiten zur Strukturaufklärung des Kernfragments

Eines der Hauptziele dieser Arbeit lag in der Aufklärung der zu Beginn der Experimente unbekanntes Struktur einer Prodomäne aus der TGF- β -Superfamilie. Der bisher einzige Vertreter der Proteinfamilie, dessen Strukturaufklärung mittels kristallographischer Methoden 2011 gelang, war proTGF- β 1, dessen Prodomänen durch mehrere intramolekulare Disulfidbrücken stabilisiert sind (Shi *et al.*, 2011). Trotz wiederholter Versuche gelang weder die Kristallisation der gesamten Prodomäne noch des darin enthaltenen Kernfragments. Die geringere Molekülmasse des Kernfragments ermöglichte es jedoch, strukturelle Daten mittels NMR-Spektroskopie zu erhalten.

Die für NMR-Untersuchungen nötige Markierung des Kernfragments mit stabilen Isotopen wurde durch die rekombinante Genexpression in Minimalmedium und die Verwendung von ^{13}C -markierter Glukose als Kohlenstoffquelle bzw. ^{15}N -markiertem Ammoniumchlorid als Stickstoffquelle erreicht. Es wurde sowohl ^{15}N -markiertes Protein als auch mit beiden Isotopen markiertes Protein hergestellt. Aufgrund des sehr geringen Expressionsniveaus des pET-15b/GDF5-Kernfragment-Konstrukts in M9-Minimalmedium wurde hierfür das Konstrukt pET-11a/GDF5-NFLAG-Kernfragment genutzt. Das daraus entstehende Protein besaß einen N-terminalen *FLAG-Tag*[®] statt des im pET-15b-Konstrukt üblichen *His-Tag*[®] und wies im

unmarkierten Zustand keinerlei biophysikalisch feststellbare Unterschiede zur bisher untersuchten Variante auf (Deicke 2012, Masterarbeit, MLU Halle-Wittenberg). Die Ausbeute der IB-Präparation lag bei 23 mg solubilisiertem Protein pro Gramm Zellfeuchtmasse. Das gesteigerte Expressionsniveau des verwendeten Gen-Konstrukts führte zu einem höheren Anteil an Kernfragment in den isolierten IBs. Demnach konnte auf den Heparin *Sepharose*TM-Chromatographieschritt verzichtet werden und das IB-Solubilisat direkt zur Renaturierung eingesetzt werden. Die Renaturierung selbst erfolgte wie für das Kernfragment beschrieben (siehe 3.3.1). Zusätzlich zur Reinigung des nativ gefalteten Proteins mittels *SP-Sepharose*TM-Chromatographie wurde eine Größenausschluss-Chromatographie als letzter Reinigungsschritt durchgeführt. Im zugehörigen Elutionsprofil ist ein symmetrischer Peak bei einem Retentionsvolumen von 66,3 ml zu erkennen, was auf eine homogene Proteinspezies hinwies (Abb. 3.26). In Bezug auf die zur Renaturierung eingesetzte Proteinmenge wurde eine Ausbeute an nativem Protein von ca. 8 % erreicht.

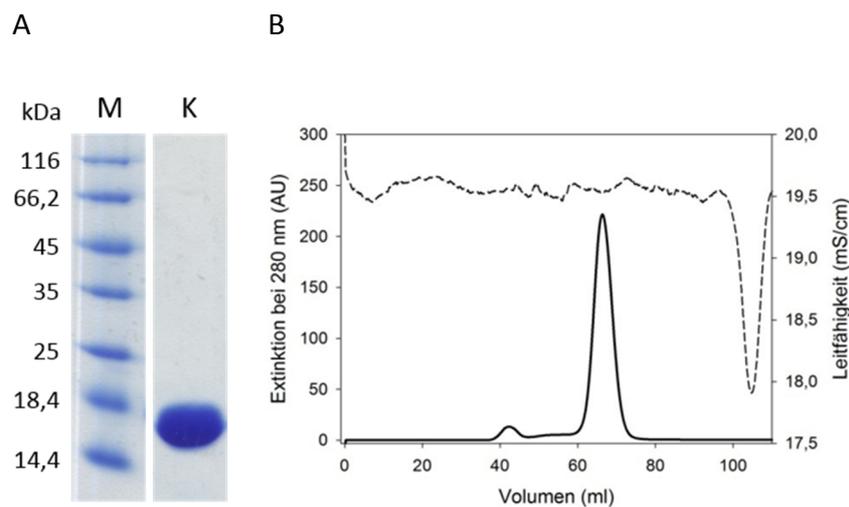


Abbildung 3.26: Reinigung des isotopenmarkierten Kernfragments. (A) SDS-PA-Gel des gereinigten Proteins: M) Proteingrößenstandard, K) gereinigtes Kernfragment. (B) Elutionsprofil der Größenausschluss-Chromatographie mittels einer *HiLoad 16/600 Superdex*-Säule des renaturierten Kernfragments. Gezeigt sind die Extinktion bei 280 nm (durchgezogene Linie) und die Leitfähigkeit (gestrichelte Linie).

Um auszuschließen, dass die Isotopenmarkierung des Kernfragments zu strukturellen Veränderungen führt, wurden Fern-UV-CD-Spektren aufgenommen und mit dem des unmarkierten Proteins verglichen (Abb. 3.27). Da keinerlei Unterschiede zwischen den

Spektren festgestellt werden konnten, kann man davon ausgehen, dass das markierte Kernfragment in der nativen Struktur vorlag.

Zur Bestimmung der Effektivität der Isotopenmarkierung wurde eine massenspektrometrische Analyse durchgeführt. Diese ergab einen Anstieg der Molekülmasse um 1066 Da im Vergleich zum unmarkierten NFLAG-Kernfragment. Bei 800 enthaltenen Kohlenstoffatomen und 234 Stickstoffatomen scheint demnach eine vollständige Isotopenmarkierung erreicht worden zu sein. Die Erhöhung der Molekülmasse um weitere 32 Da ist wahrscheinlich auf eine doppelte Oxidation des Startmethionins zurückzuführen.

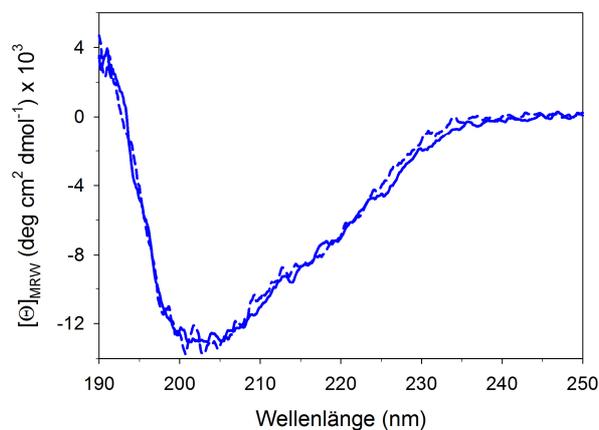


Abbildung 3.27: CD-Spektren des Kernfragments im Fern-UV-Bereich ohne (durchgezogene Linie) und mit ¹³C- und ¹⁵N-Isotopenmarkierung (gestrichelte Linie). Experimentelle Details siehe Abschnitt 2.2.4.5.

3.3.6 NMR-Untersuchungen

Zunächst sollte mittels 1D-¹H-Protonen-Spektren (nicht gezeigt) die strukturelle Integrität des Proteins unter NMR-experimentellen Bedingungen abgeschätzt werden. Durch Dialyse gegen NMR-Puffer konnte eine bei einer Proteinkonzentration von 650 μM und einer Temperatur von 20 °C über die Messzeit stabile Proteinlösung erreicht werden. Für weiterführende strukturelle Untersuchungen mit Hilfe mehrdimensionaler NMR-Experimente wurde ein FHSQC-Spektrum des ¹⁵N-markierten Kernfragments aufgenommen (Abb. 3.28).

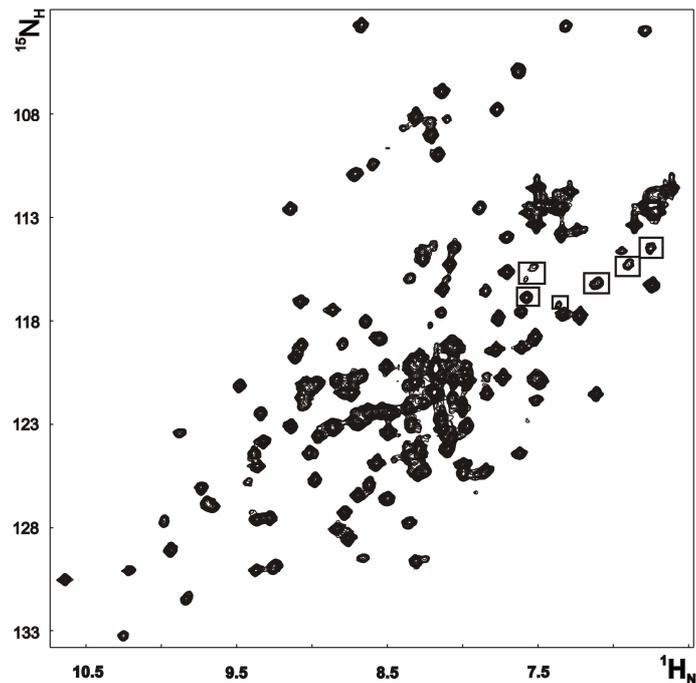


Abbildung 3.28: $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ FHSQC-Spektrum des ^{15}N -markierten Kernfragments. Bei den mit einer Box versehenen Kreuzsignalen handelt es sich um in das Spektrum gefaltete Signale, die außerhalb der aufgenommenen spektralen Weite lagen. Detaillierte Beschreibung siehe Abschnitt 2.2.4.11. Die gezeigten Daten wurden von Rica Patzschke (MLU Halle-Wittenberg, Institut für Physik) erhalten.

Das Spektrum weist eine gute Dispersion der Kreuzsignale (6,7 - 10,5 ppm) mit zum größten Teil gleichmäßiger Intensitätsverteilung auf. Auffällig sind lediglich ein paar sehr intensive Signale um 8 ppm, die für möglicherweise vorhandene, ungefaltete *loop*-Regionen sprechen. Im Allgemeinen weisen die Daten auf gefaltete Proteinmoleküle mit definierter Sekundär- und Tertiärstruktur hin. Zudem ist ein hoher Anteil an β -Faltblattstrukturen zu erwarten. Die Anzahl der Kreuzsignale spiegelt die Anzahl der AS-Reste des Kernfragmentes wider. Die Proteinlösung wies keine sichtbaren Verunreinigungen auf. Daher wurde das doppelt isotopenmarkierte (^{15}N , ^{13}C) Konstrukt für weiterführende Experimente für eine Zuordnung aller Resonanzen zu den einzelnen AS-Resten der AG Schwalbe (Goethe-Universität Frankfurt/Main) zur Verfügung gestellt.

Zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit war die Zuordnung der AS-Reste zu den jeweiligen Resonanzen weitgehend abgeschlossen. Mit einem Strukturmodell wird in Kürze gerechnet.

4 Diskussion

Die Proteine der TGF- β -Superfamilie sind durch ihre umfangreichen Prodomänen gekennzeichnet, die den Hauptanteil des Vorläuferproteins darstellen. Diese Domänen übernehmen wichtige Funktionen in der Biogenese der Proteine, deren Sekretion und der Regulation der Aktivität des reifen Wachstumsfaktors. Bisher konnte nur die Gesamtstruktur des Proproteins von TGF- β 1 gelöst und ein Einblick in die Funktionsmechanismen der Prodomäne erhalten werden (Shi *et al.*, 2011). Obwohl GDF5 einen potentiellen Kandidaten für die therapeutische Anwendung darstellt, sind bislang kaum Informationen über die biologische Funktion und keine strukturellen Kenntnisse der Prodomäne verfügbar.

4.1 Die isolierte Prodomäne

Zur proteinchemischen Charakterisierung wurde die Prodomäne von GDF5 isoliert hergestellt und zunächst einer biophysikalischen Charakterisierung unterzogen. Der Herstellungsprozess lehnte sich dabei an die in der Arbeitsgruppe etablierte Produktion von proGDF5 an und wurde für die GDF5-Prodomäne optimiert, wodurch homogenes Protein erhalten wurde.

Die Charakterisierung der Prodomäne mit spektroskopischen und thermodynamischen Methoden belegte die native Faltung des Proteins. Die Fluoreszenzspektroskopie wies auf eine hydrophobe Umgebung der aromatischen AS hin und in den CD-Spektren waren definierte Sekundär- und Tertiärstrukturen erkennbar. Die sowohl chemisch- als auch thermisch-induzierten Entfaltungen zeigten kooperative und reversible Übergänge, die auf eine hohe Stabilität des Proteins schließen ließen. Diese Ergebnisse belegen, dass die Prodomäne von GDF5 auch ohne den Kontakt zum eigentlichen Wachstumsfaktor eine definierte, kompakte Struktur einnimmt, die der nativen Faltung entspricht. Die Tatsache, dass die Prodomäne mit hoher Affinität an GDF5 band, unterstützte diese Annahme.

Das Fern-UV-CD-Spektrum der Prodomäne wies eine hohe Ähnlichkeit mit dem der Prodomäne von TGF- β 1, dem β 1-LAP, auf (McMahon *et al.*, 1996). Weiterhin zeigte es Charakteristika eines Spektrums von β _{II}-Proteinen (Sreerama & Woody, 2003). Beide Vergleiche bestätigen die Annahme, dass die Struktur der Prodomäne von β -Faltblättern geprägt ist, jedoch auch einen hohen Anteil an *random coil*-Strukturen oder geordneten *loop*-Strukturen aufweist. Dies steht in keinerlei Widerspruch zur Annahme der nativen Faltung, da auch in der Kristallstruktur von β 1-LAP ca. 50% der Primärstruktur weder α -helikale noch β -Faltblatt-Strukturen ausbilden (Shi *et al.*, 2011). Einer der Gründe für einen hohen *random coil*-Anteil könnte der überdurchschnittlich hohe Prolin-Gehalt von ca. 10 % sein, der im Bereich der ersten 144 AS sogar 25 % übersteigt (siehe Anhang, Abb. 6.4). Es ist auch möglich,

dass die Prolin-reichsten Segmente Poly-Prolin-Helices ausbilden, die sich im CD-Spektrum kaum von ungeordneten Bereichen unterscheiden lassen (Sreerama & Woody, 1994).

Der Vergleich der Fern-UV-CD-Spektren der isolierten Prodomäne und der Prodomäne im Kontext des Proproteins zeigte eine durch die Interaktion mit GDF5 hervorgerufene Erhöhung des Sekundärstrukturanteils. Diese Beobachtung konnte auch bei der Untersuchung der Prodomänen von TGF- β 1 und BMP2 gemacht werden und ist höchstwahrscheinlich in der intensiven Interaktion der Prodomäne mit dem Wachstumsfaktor begründet (McMahon *et al.*, 1996; Hillger *et al.*, 2005). Wie die Nah-UV-CD-Spektren belegen, gibt es zahlreiche Tertiärkontakte zwischen der Prodomäne und GDF5, wodurch weitere Sekundärstrukturen innerhalb der Prodomäne induziert werden könnten. Vom BMP-Rezeptortyp 1 ist ein *induced fit*-Mechanismus mit einer *disorder-to-order*-Umlagerung während der Bindung des Wachstumsfaktors bekannt (Klages *et al.*, 2008), die dem Mechanismus bei der Prodomänenbindung ähnlich sein könnte. Es ist anzunehmen, dass nach Komplexierung der Prodomäne durch den reifen Wachstumsfaktor die sonst in der isolierten Prodomäne flexiblen oder unstrukturierten Bereiche über Tertiärkontakte positioniert und stabilisiert werden.

Die Kooperativität und Reversibilität der Entfaltungsübergänge belegen die Annahme eines definierten Faltungszustandes der isolierten Prodomäne. Sie ist mit $\Delta G_D (H_2O) = 26,8$ kJ/mol thermodynamisch um ein Vielfaches stabiler als die Prodomäne von BMP2 mit $\Delta G_D (H_2O) = 5,1$ kJ/mol (Hillger *et al.*, 2005). Die gesteigerte Stabilität ist allerdings nur teilweise mit der höheren AS-Anzahl (259 AS bei BMP2; 354 AS bei GDF5) und der dadurch erwartungsgemäß höheren Kooperativität des Übergangs der GDF5-Prodomäne zu erklären (Myers *et al.*, 1995). Möglicherweise ist die Prodomäne von GDF5 deutlich kompakter gefaltet und damit widerstandsfähiger gegenüber denaturierenden Agenzien. Die Stabilisierung der Prodomäne durch Komplexierung mit dem reifen Wachstumsfaktor, wie sie in den DSC-Experimenten für GDF5 gezeigt werden konnte, wurde bereits bei anderen Cystinknoten-Wachstumsfaktoren beobachtet. Auch die Prodomäne von BMP2 wird durch die Bindung an den reifen Teil um $\Delta \Delta G_D (H_2O) = 13,5$ kJ/mol stabilisiert (Hillger *et al.*, 2005). Bei dem Neurotrophin NGF ist die isolierte Prodomäne so instabil, dass sie kaum tertiäre Kontakte aufweist. Erst im Komplex mit reifem NGF zeigt sie einen kooperativen Übergang, aus dem sich eine Stabilität von $\Delta G_D (H_2O) = 7,8$ kJ/mol berechnen ließ (Kliemann *et al.*, 2004). Diese Ergebnisse legen die Annahme nahe, dass unter den Cystinknoten-Proteinen mit Prodomänen eine enge thermodynamische Kopplung zwischen den einzelnen Domänen verbreitet ist. Der stabilisierende Effekt wird höchstwahrscheinlich durch die in der Prodomäne durch GDF5-Bindung induzierten Sekundärstrukturen und die Wechselwirkungen mit GDF5 selbst hervorgerufen.

Ein exakter Vergleich der thermodynamischen Stabilität der isolierten Prodomäne mit der der Prodomäne im Kontext des Proproteins war in den DSC-Messungen nur eingeschränkt möglich, da bei der Entfaltung von proGDF5 die Übergänge von Prodomäne und reifem GDF5 nicht durch eine Basislinie getrennt waren und somit die Berechnung der Entfaltungsenthalpie beeinträchtigt war. Somit müssten für eine präzisere Messung die Pufferbedingungen derart angepasst werden, dass die Entfaltungsübergänge der beiden Domänen getrennt voneinander erfolgen. Der Intensitätsunterschied der Signale der beiden Übergänge war in der Zusammensetzung der gemessenen Proteine begründet. Während die Messkurve der isolierten Prodomäne durch die Entfaltung der monomeren Spezies entsteht, entspricht der Prodomänen-Peak der proGDF5-Kurve der simultanen Denaturierung beider im Homodimer vorhandenen Prodomänen. Die angegebenen Daten für die Entfaltungsenthalpie wurden auf ein Prodomänen-Monomer normiert. Weiterhin geben die DSC-Messungen Aufschluss über den Entfaltungsmechanismus der Prodomäne. Da in der entsprechenden Entfaltungskurve ein homogener Peak zu sehen ist, kann von einer intermediatfreien Entfaltung nach einem Zweizustandsmodell ausgegangen werden.

Wie bereits erwähnt, wurde die Kristallstruktur von proTGF- β 1 während der Anfertigung dieser Arbeit veröffentlicht und bietet somit erste Erkenntnisse zum Aufbau einer Prodomäne der TGF- β -Superfamilie. In der Veröffentlichung ist ein Sequenzalignment aller 37 Vertreter dieser Proteinfamilie enthalten, aus welchem laut den Autoren hervorgeht, dass ein Großteil der Sekundärstrukturelemente aus β 1-LAP auch in allen anderen Prodomänen konserviert und die Prodomänen selbst dadurch vergleichbar gefaltet sind (Shi *et al.*, 2011). Auf dieser Grundlage wurde im Rahmen der in der AG durchgeführten Masterarbeit von Felix Neumann ein Strukturvorschlag für proGDF5 erstellt (Thieme *et al.*, 2014) (Abb. 4.1). In diesem Modell bildet proGDF5 eine zu proTGF- β 1 vergleichbare Ringstruktur aus und die Prodomänen umschließen das reife GDF5 von mehreren Seiten, resultierend in der Abschirmung beider Rezeptorbindeepitope. Die Sekundärstruktur der Prodomäne ist durch zwei viersträngige β -Faltblätter und weitläufige *loop*-Strukturen gekennzeichnet. Die Ergebnisse der Fern-UV-CD-Spektroskopie bestätigen diese Annahme. Allerdings beinhaltet der Strukturvorschlag auch mehrere kurze α -Helices, die ebenfalls eine Auswirkung auf das Spektrum haben sollten. Möglicherweise sind einige der gezeigten Helices Teil der durch die GDF5-Bindung induzierten Strukturbereiche und demnach in der isolierten Prodomäne nicht ausgebildet. Der gesteigerte Anteil an α -helikalen Strukturen würde den Unterschied zwischen dem Fern-UV-CD-Spektrum der isolierten Prodomäne und dem Differenzspektrum, welches sich aus dem Spektrum von proGDF5 abzüglich des Spektrums von GDF5 ergibt, erklären.

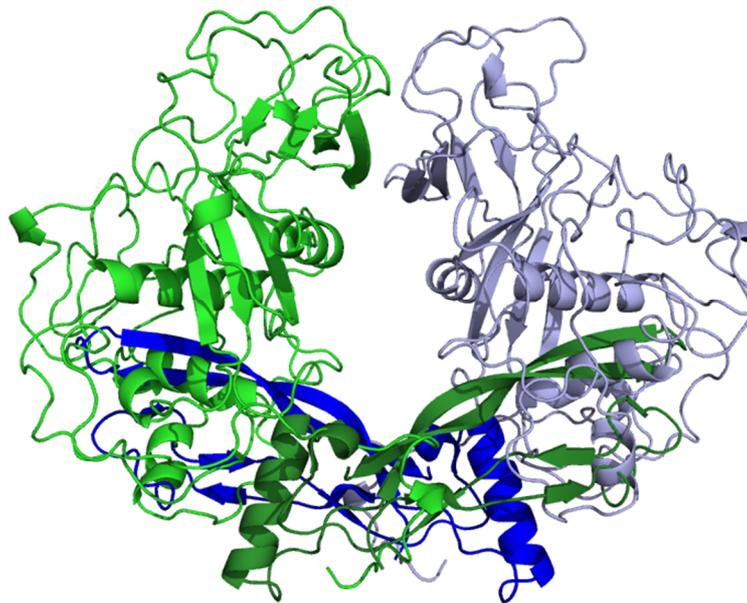


Abbildung 4.1: Strukturvorschlag für das proGDF5-Dimer in der *cartoon*-Darstellung (Thieme *et al.*, 2014). Die GDF5-Monomere sind in blau und grün dargestellt, die jeweils zugehörigen Prodomänen in hellblau und hellgrün.

Der Strukturvorschlag für proGDF5 sollte grundsätzlich mit Vorbehalt betrachtet werden. Ein Sequenzalignment zum direkten Vergleich der beiden Prodomänen von GDF5 und TGF- β 1 ergibt 64 identische und 72 ähnliche AS-Reste bei einer Gesamtanzahl von 354 (GDF5) bzw. 249 (TGF- β 1) Resten (siehe Anhang, Abb. 6.4). Dies spricht für ähnliche Strukturen der beiden Prodomänen. Die beschriebenen hydrophoben Reste im strukturellen Kern von β 1-LAP sind in der GDF5-Prodomäne konserviert bzw. durch andere hydrophobe Reste ersetzt (Shi *et al.*, 2011). Der bereits beschriebene hohe Prolin-Gehalt in der N-terminalen Hälfte der GDF5-Prodomäne ist in β 1-LAP im Bereich des sogenannten "*latency lasso*" zu finden und könnte ein Hinweis auf die Existenz einer ähnlichen Struktur sein. Allerdings ist der prolinreiche Abschnitt in der GDF5-Prodomäne deutlich größer als bei β 1-LAP und umfasst auch den zur N-terminalen Helix α 1 äquivalenten Bereich (siehe Einleitung, Abb. 1.2). Dies macht eine α -Helix an dieser Stelle der GDF5-Prodomäne eher unwahrscheinlich. In der GDF5-Prodomäne finden sich im Vergleich zu β 1-LAP 95 zusätzliche AS, die dem Alignment zufolge hauptsächlich im N-terminalen Bereich zu finden sind. Da sich das Modell stark auf die Struktur von proTGF- β 1 bezieht, gibt es für diese Reste keine strukturellen Vorgaben, wodurch in diesem Abschnitt von proGDF5 keine zuverlässige Modellierung möglich war. Folglich bietet der Strukturvorschlag nur in bestimmten Bereichen aussagekräftige Anhaltspunkte zur Position bestimmter Teilstrukturen.

In dem Strukturvorschlag liegen die zwei in der Prodomäne enthaltenen Cysteine in räumlicher Nähe zueinander. Sie sind allerdings nicht verbunden und wären in der gezeigten Konformation auch zu weit voneinander entfernt, um eine Disulfidbrücke auszubilden (Abb. 4.2A). Jedoch sind sie in flexiblen *loops* positioniert, die die zur Ausbildung eines Disulfids nötige räumliche Annäherung ermöglichen. Die Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrücken, wie sie in β 1-LAP vorliegen, würde auf Basis dieses Strukturvorschlags erhebliche Umlagerungen der Kernstruktur voraussetzen. Die auf eine intramolekulare Verbrückung der Cysteine innerhalb der Prodomäne hindeutenden Daten werden somit durch das Modell bestätigt. Die Ausbildung des intramolekularen Disulfids würde das benachbarte β -Faltblatt in eine deutlich kompaktere Position bringen. Ein an das Faltblatt angrenzender und im Modell lösungsmittlexponierter hydrophober Cluster befindet sich in unmittelbarer Nähe zum identischen Bereich der anderen Prodomäne und könnte somit eine potentielle Interaktionsfläche darstellen (Abb. 4.2A). Daraus folgt die Annahme, dass eine Dimerisierung der Prodomäne aufgrund der lokal hohen Konzentration innerhalb des Proproteins über hydrophobe Wechselwirkungen prinzipiell möglich ist, obwohl ein solches Dimer für die isolierte Prodomäne weder in der analytischen Größenausschluss-Chromatographie noch in der analytischen Ultrazentrifugation nachweisbar war.

Die Abweichung der Daten der analytischen Größenausschluss-Chromatographie und der analytischen Ultrazentrifugation von den erwarteten Werten für ein globuläres Protein mit einer Molekülmasse von 41 kDa ist mit dem hohen *random coil*-Anteil der Prodomäne zu erklären. Die beweglichen Bereiche verändern den hydrodynamischen Radius und das Sedimentationsverhalten des Proteins. Falls die GDF5-Prodomäne analog zu β 1-LAP eine N-terminale α -Helix ausbilden würde, wäre die dadurch entstehende gestreckte Form des Proteins eine weitere Erklärung für die Abweichungen. Auch durch ausgedehnte exponierte hydrophobe Oberflächen, wie sie durch die Interaktionsfläche zu GDF5 und zur anderen Prodomäne entstehen könnten, würde sich das Sedimentationsverhalten verändern.

4.2 Potentielle Funktionen der Prodomäne

Die Prodomänen der einzelnen Vertreter der TGF- β -Superfamilie besitzen vielfältige Funktionen. Eine davon liegt in der Regulation der Aktivität des Wachstumsfaktors. Für die Prodomänen von TGF- β 1, 2 und 3, Myostatin und GDF11 ist bekannt, dass sie im nicht-kovalent verbundenen Proproteinkomplex den Wachstumsfaktor inaktivieren (Böttinger *et al.*, 1996; Thies *et al.*, 2001; Ge *et al.*, 2005). Der zugrunde liegende Mechanismus beruht in den meisten Fällen auf der Abschirmung der Rezeptorbindeepitope. BMP7 bildet ebenfalls einen nicht-kovalenten Komplex aus, ist aber unvermindert aktiv, da die Affinität des Wachstumsfaktors zum Rezeptor höher ist als zur Prodomäne (Sengle *et al.*, 2008b).

Bindungsexperimente haben gezeigt, dass die GDF5-Prodomäne in der Lage ist, mit hoher Affinität an GDF5 zu binden. Die Dissoziationskonstante dieser Interaktion liegt bei $K_D = 15,1$ nM. Die um den Faktor 60 erhöhte Dissoziationskonstante der zweiten Prodomänenbindung lässt vermuten, dass diese einer negativen Kooperativität unterliegt. Der Grund dafür könnte in einer sterischen Behinderung durch die räumliche Nähe der beiden Prodomänen im Proproteinkomplex liegen.

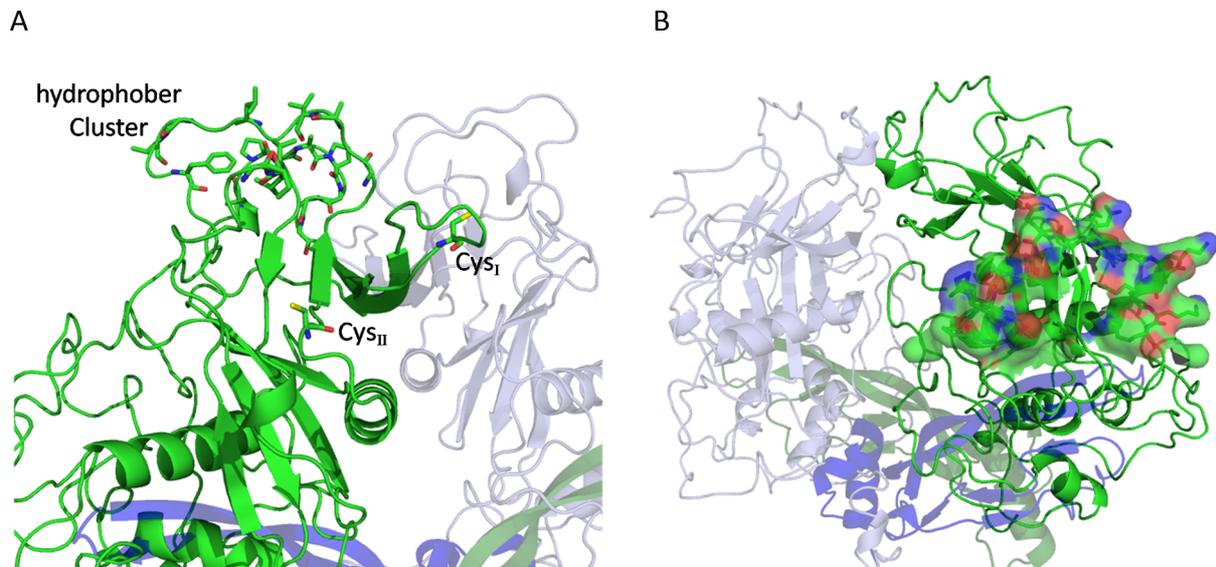


Abbildung 4.2: Detailldarstellungen des Strukturvorschlags für proGDF5 in der *cartoon*-Darstellung (Thieme *et al.*, 2014). Eine Prodomäne ist in hellgrün dargestellt, im Hintergrund sind die andere Prodomäne (hellblau) und die GDF5-Monomere (blau und grün) transparent angedeutet. Gezeigt sind die in der Prodomäne enthaltenen Cysteine, der hydrophobe Cluster der potentiellen Interaktionsfläche (A) und die AS-Reste des potentiellen Rezeptorbindeepitops der Prodomäne mit zugehöriger Oberfläche (B) in der Stabdarstellung. Kohlenstoffatome sind in grün, Stickstoffatome in blau, Sauerstoff in rot und Schwefel in gelb dargestellt.

Unklar ist, ob die Freisetzung des reifen Wachstumsfaktors aus dem nicht-kovalenten Komplex wie bei TGF- β 1 über einen mehrstufigen Mechanismus verläuft oder ob ausschließlich die Affinität der Interaktion zur Prodomäne entscheidend ist. Die Bindung der Prodomäne an Fibrillin und LTBP5 (Sengle *et al.*, 2008a; Farooq *et al.*, 2013) deutet auf einen zu TGF- β 1 ähnlichen Freisetzungsmechanismus hin (Shi *et al.*, 2011). Die Interaktion mit Fibrillin könnte aber auch nur der Lokalisierung in der extrazellulären Matrix dienen. Außerdem würde der für TGF- β 1 beschriebene Mechanismus ein RGD-Motiv zur Bindung an Integrin erfordern, welches in der GDF5-Prodomäne nicht zu finden ist. Für BMP7 wurde ein Wettbewerbsmechanismus beschrieben, bei dem die Prodomäne und der Typ 2-Rezeptor um das gleiche Bindeepitop im Wachstumsfaktor konkurrieren (Sengle *et al.*, 2008b). Im gezeigten Strukturvorschlag für proGDF5 deckt die Prodomäne die Bindeepitope beider Rezeptortypen ab. Während der

Typ 1-Rezeptor BMPR1B mit einer Dissoziationskonstante von $K_D = 1,3$ nM an GDF5 bindet, ist die Affinität von BMPR1A für GDF5 mit $K_D = 19$ nM in einem ähnlichen Bereich wie die Affinität der Bindung der Prodomäne an GDF5 (Heinecke *et al.*, 2009). Auf dieser Grundlage wäre eine selektive Inaktivierung von GDF5 durch die Prodomäne denkbar, wobei der hochaffine BMPR1B die Prodomäne aus dem nicht-kovalenten Komplex verdrängen und GDF5 binden könnte, während die Prodomäne in Gegenwart von BMPR1A mit dem Rezeptor um GDF5 konkurrieren und somit die Rezeptoraktivierung inhibieren würde. Ähnliche molekulare Mechanismen könnten bei der Bindung der verschiedenen Typ 2-Rezeptoren ablaufen, deren Dissoziationskonstanten über einen Bereich von 4 - 36 nM verteilt sind (Heinecke *et al.*, 2009). BMPR1A wird in der Embryonalentwicklung in den Gelenkinterzonen exprimiert, während BMPR1B in den flankierenden Knorpelregionen zu finden ist (Zou *et al.*, 1997; Baur *et al.*, 2000). Da BMPR1A auch die BMP2-induzierte Apoptose in den Fingerzwischenräumen vermittelt (Yokouchi *et al.*, 1996), wäre es möglich, dass die GDF5-induzierte Bildung des Gelenkspalts durch die Prodomäne reguliert wird.

Die vergleichenden Bindungsstudien von GDF5 und proGDF5 an die BMPR1A-Ektodomäne verliefen ohne klares Ergebnis. Bei den SPR-Messungen lagen die bestimmten Dissoziationskonstanten der Rezeptorbindung von GDF5 zwar im zweistelligen nanomolaren Bereich und entsprachen damit annähernd der Literatur (Heinecke *et al.*, 2009), allerdings sank die Affinität mit steigender GDF5-Konzentration ab; eine Beobachtung, die die Messung unzuverlässig erscheinen ließ. Bei den Messungen mit proGDF5 trat der gleiche Effekt auf, die bestimmten Dissoziationskonstanten waren aber insgesamt etwas höher. Eine Inhibierung der Rezeptorbindung durch die Prodomäne konnte nicht eindeutig festgestellt werden.

In den Peptid-*Microarray*-Experimenten mit der Ektodomäne von BMPR1A als Analyt wurden neben dem Rezeptorbindeepitop des reifen Wachstumsfaktors auch einige Interaktionen im Bereich der Prodomäne nachgewiesen. Die beiden größten zusammenhängend detektierten Bereiche bilden im Strukturvorschlag für proGDF5 ein auf der Oberfläche der Prodomäne exponiertes Bindeepitop (Abb. 4.2B; siehe Anhang, Abb. 6.5), welches für die in den SPR-Messungen detektierte Bindung von proGDF5 an BMPR1A verantwortlich sein könnte. Eine Bindung des Proproteins an BMPR1A und eine dadurch erheblich reduzierte Signaltransduktion wurde bereits für BMP2 beschrieben (Hauburger *et al.*, 2009). ProBMP2 konkurriert mit dem reifen Wachstumsfaktor um die Rezeptorbindung und hemmt dadurch die BMP2-Aktivität. Für BMP7 ist die Bindung des nicht-kovalenten Proproteinkomplexes an BMPR1A ohne Verdrängung der Prodomäne durch den Rezeptor belegt (Sengle *et al.*, 2008b). Ein Typ 2-Rezeptor ist jedoch in der Lage, die Prodomäne aus dem Komplex freizusetzen. Die große strukturelle Variabilität der Ektodomäne von BMPR1A bei der Ligandenbindung könnte die Interaktion mit verschiedenen Epitopen ermöglichen (Klages *et al.*, 2008). Demnach wäre ein Mechanismus denkbar, in dem der nicht-kovalent verbundene, inaktive

Proteinkomplex von GDF5 über die Prodomäne an den Typ 1-Rezeptor bindet, der rekrutierte Typ 2-Rezeptor die Prodomäne verdrängt und das dadurch aktivierte GDF5 an dem entstandenen Rezeptorkomplex die Signalweiterleitung induziert. Die transiente Bindung des nicht-kovalenten Proteinkomplexes könnte eine weitere Regulationsebene oder einen Lokalisierungsmechanismus darstellen.

Neben Peptid-*Microarray* und SPR-Messungen wurden auch ELISA-Experimente durchgeführt, um Informationen über die Interaktion von GDF5 zur Prodomäne bzw. zu BMPRI1A zu erhalten. Jedoch ergaben diese Untersuchungen keine auswertbaren Daten. Bei den ELISA-Experimenten zur Prodomäneninteraktion gelang es trotz des Einsatzes verschiedener *blocking*-Methoden nicht, die hohen Hintergrundsignale zu reduzieren. Die auftretenden unspezifischen Wechselwirkungen von BMP-Prodomänen waren der Arbeitsgruppe bereits aus früheren Experimenten bekannt. Eine Immobilisierung der Prodomäne und der Einsatz von GDF5 als Analyt waren wegen der geringen Löslichkeit von GDF5 bei physiologischem pH nicht möglich. Die Interaktionsstudien zwischen GDF5 und der BMPRI1A-Ektodomäne erlaubten aufgrund unzureichender Antikörperspezifität keine Aussagen.

4.3 Biochemische Konsequenzen der krankheitsassoziierten Varianten

Die meisten bekannten krankheitsassoziierten Mutationen im *gdf5*-Gen führen zu einer Leserahmenverschiebung innerhalb der Nukleotidsequenz und dadurch zu einer veränderten Peptidsequenz, häufig mit vorzeitigen Kettenabbrüchen. Ein weiterer Teil der Mutationen hat den Austausch stark konservierter Reste des reifen Wachstumsfaktors, wie die strukturelevanten Cysteine, zur Folge. Darüber hinaus sind Mutationen bekannt, die zu AS-Austauschen in der Prodomäne führen und über deren genaue Auswirkungen nur wenige Informationen vorliegen. In dieser Arbeit wurden die zwei krankheitsassoziierten Austausche T201P und G319V auf ihren Einfluss auf die Prodomäne hin untersucht. Die veränderten Proteine wurden analog zum Wildtyp hergestellt. Die verminderte Produktionsausbeute der Varianten ist wahrscheinlich auf vermehrte Fehlfaltung während der Renaturierung zurückzuführen.

Im Strukturvorschlag für proGDF5 ist der Austausch T201P im strukturell bedeutenden ersten β -Strang positioniert (Abb. 4.3A). Dieser bildet zusammen mit den Strängen β 10, β 3 und β 6 eines der beiden antiparallelen Faltblätter, die in der TGF- β 1-Prodomäne die als "*arm domain*" bezeichnete Kernstruktur prägen (Shi *et al.*, 2011). Ein anderer krankheitsassoziiertes AS-Austausch (L176P) befindet sich in einer direkt angrenzenden α -Helix (Farooq *et al.*, 2013). Dieser Bereich wird als sehr dicht gepackter hydrophober Cluster beschrieben, in dem es durch die Anwesenheit einer starren Prolin-Seitenkette zu sterischen Problemen kommen

sollte. Die geringen Abweichungen vom Wildtyp in den spektroskopischen Untersuchungen und der limitierten Proteolyse der isolierten Prodomänen zeigen aber, dass die mutationsbedingten strukturellen Veränderungen nicht sehr groß sein können. Während die Nah-UV-CD-Spektren der Prodomänen unbeeinflusst waren, zeigten sich in den Spektren der Proproteine deutliche Unterschiede. Der Intensitätsunterschied in den Fluoreszenzspektren von Wildtyp und T201P-Variante, der vermutlich durch eine strukturelle Umlagerung im Bereich der aromatischen AS ohne Veränderung der Hydrophobizität dieses Bereichs bewirkt wird, war bei den Proproteinen größer (Job 2011, Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg). Dies deutet auf eine stärkere strukturelle Umlagerung in proGDF5 hin. Der unterschiedlich starke Einfluss des Austausches auf die Ergebnisse der limitierten Proteolyse bestätigt diese Vermutung. Während bei den isolierten Prodomänen keinerlei Unterschiede zwischen T201P-Variante und Wildtyp erkennbar waren, zeigten sich bei den Proproteinen deutlich sichtbare Veränderungen einzelner Banden (siehe Anhang, Abb. 6.2). Es ist davon auszugehen, dass sich die strukturellen Auswirkungen des T201P-Austausches hauptsächlich auf das Proprotein beschränken, während die isolierte Prodomäne kaum beeinträchtigt ist.

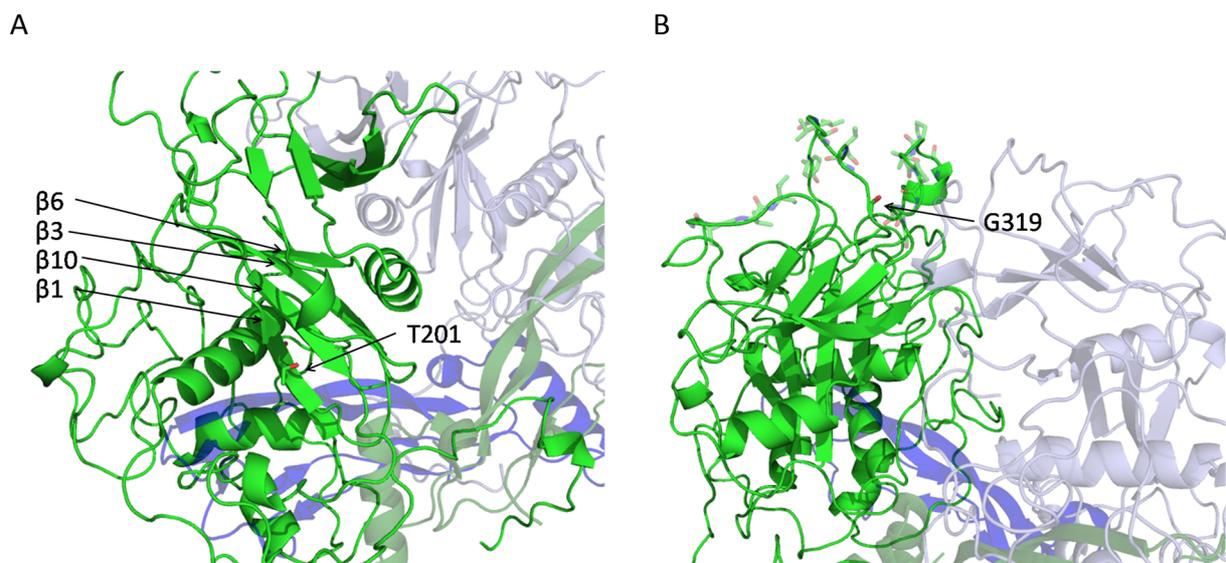


Abbildung 3: Detaildarstellungen des Strukturvorschlags für proGDF5 in der *cartoon*-Darstellung (Thieme *et al.*, 2014). In hellgrün ist eine der Prodomänen zu sehen, die andere Prodomäne (hellblau) und die GDF5-Monomere (blau und grün) sind im Hintergrund transparent angedeutet. Die AS-Reste T201 (A) und G319 mit umliegenden hydrophoben Resten (B) sind in der Stabdarstellung gezeigt. Kohlenstoffatome sind in grün, Stickstoffatome in blau und Sauerstoff in rot dargestellt.

Der Austausch G319V liegt in einem Bereich zahlreicher hydrophober Reste (Abb. 4.3B). Die entsprechende Region in β 1-LAP bildet das aus den Strängen β 8 und β 9 bestehende "bow tie"-Motiv und ist an der Dimerisierung der Prodomänen beteiligt (Shi *et al.*, 2011). Im Strukturvorschlag für proGDF5 wird kein vergleichbares β -Faltblatt ausgebildet, stattdessen

wird dieses Segment der Prodomäne von *loop*-Strukturen dominiert. Die durch den G319V-Austausch verursachten strukturellen Veränderungen hatten keinerlei Einfluss auf die das Fluoreszenzsignal dominierenden Tryptophan-Reste und deren Umgebung. Das Proteolysemuster der isolierten Prodomänen legt nahe, dass sich die Umlagerungen auf den Bereich des Kernfragments beschränken. Die anderen Proteolysefragmente waren unverändert. Der Bereich, in dem sich der Rest G319 befindet, ist wegen der vielen hydrophoben Reste wahrscheinlich deutlich kompakter gefaltet als es im Strukturvorschlag erscheint. Durch die Anwesenheit der im Vergleich zu Glycin voluminöseren Valin-Seitenkette könnte es zu geringfügigen Konformationsänderungen kommen, wodurch eines der beiden benachbarten Arginine für die eingesetzte Protease Trypsin zugänglich werden könnte und das Kernfragment abgebaut würde.

Die thermodynamischen Untersuchungen haben eine deutliche Destabilisierung der isolierten Prodomäne durch den G319V-Austausch gezeigt. In den DSC-Messungen wurde deutlich, dass die Prodomäne in der G319V-Variante wie beim Wildtyp durch die Bindung an GDF5 stabilisiert wird. Da der Effekt der thermodynamischen Kopplung der einzelnen Domänen nicht beeinträchtigt war, kann davon ausgegangen werden, dass sich die hervorgerufenen destabilisierenden Veränderungen auf den Bereich des Austausches beschränken. Das Bindepitop zu GDF5 sollte unverändert sein. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse der SPR-Messungen bestätigt, da die Bindung der ersten Prodomäne an GDF5 trotz des G319V-Austausches eine zum Wildtyp vergleichbare Affinität aufwies. Die im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Affinität der zweiten Bindung zeigt, dass der für die negative Kooperativität verantwortliche Effekt in der G319V-Variante weniger stark ausgeprägt ist. Möglicherweise bewirkt eine erhöhte Flexibilität in der Umgebung des G319V-Austausches eine geringere sterische Hinderung der Anlagerung einer zweiten Prodomäne.

Für die TGF- β 1-Prodomäne wurde beschrieben, dass die "*arm domain*" durch zwei antiparallele β -Faltblätter eine sehr stabile Struktur darstellt (Shi *et al.*, 2011). Da sich der T201P-Austausch in einem dieser Faltblätter befindet, sollte sich die Veränderung in den thermodynamischen Daten bemerkbar machen. Entgegen den Erwartungen besitzt die T201P-Variante der isolierten Prodomäne annähernd die gleiche Stabilität wie der Wildtyp und sollte entsprechend ein weitgehend intaktes β -Faltblatt besitzen. Durch die Anwesenheit des Prolins im ersten Strang des Faltblatts könnte dieser lediglich etwas verkürzt sein, dies scheint sich in der isolierten Prodomäne nur geringfügig auszuwirken. Allerdings ist im Kontext des Proproteins bei der thermischen Entfaltung eine starke Destabilisierung der Prodomäne durch den AS-Austausch zu beobachten. Zudem konnte eine geringe Destabilisierung von GDF5 festgestellt werden (Thieme *et al.*, 2014). Die bei den SPR-Messungen detektierte Dissoziationskonstante der Bindung der Prodomäne an GDF5 ist im Vergleich zum Wildtyp um den Faktor 20 erhöht. Der β 1-Strang hat in der Struktur von proTGF- β 1 direkten Kontakt zu

dem reifen Wachstumsfaktor und interagiert mit dem der Prodomäne zugewandten β -Faltblatt des jeweiligen Monomers. Auch im Strukturvorschlag für proGDF5 ist der Abstand zwischen dem β -Strang und dem Wachstumsfaktor gering. Wahrscheinlich verändert der Austausch T201P den Verlauf des Peptidrückgrats durch den definierten Bindungswinkel der X-Pro-Bindung. Dadurch könnte es an der Kontaktfläche zwischen der Prodomäne und dem Wachstumsfaktor zu einer sterischen Behinderung kommen.

Über den zur Krankheit führenden Mechanismus der AS-Austausche lässt sich ohne ausreichende Strukturkenntnisse zur Prodomäne nur spekulieren. Eine schwerwiegende Proteinmissfaltung der Prodomäne kann nahezu sicher ausgeschlossen werden, da beide Varianten nur geringe spektroskopische Unterschiede zum Wildtyp und eine definierte, reversibel faltende Prodomänenstruktur aufweisen. Die nicht-kovalente Bindung der Prodomäne an den Wachstumsfaktor könnte eine entscheidende Rolle bei der Inaktivierung von GDF5 gegenüber bestimmten Rezeptoren spielen. Entsprechend würde die in der T201P-Variante reduzierte Affinität dieser Bindung zu einer Verstärkung des GDF5-Signals führen. Da die T201P-Variante allerdings eine geringere biologische Aktivität als der Wildtyp zeigte (Stange *et al.*, 2014) und der hervorgerufene Phänotyp mit dem mehrerer *frameshift*-Mutationen übereinstimmte (Everman *et al.*, 2002), erscheint diese Möglichkeit unwahrscheinlich. Falls der Freisetzungsmechanismus von GDF5 aus dem nicht-kovalenten Proproteinkomplex eine, wie für TGF- β 1 vermutete, Zugkraftübertragung in der Prodomäne erfordert (Annes *et al.*, 2004), könnte die bei beiden Varianten auftretende Destabilisierung der Prodomänen im Kontext des Proproteins zu einer unzureichenden Menge an reifem GDF5 führen. Bei der T201P-Variante kann ein Einfluss auf die Faltung des reifen Wachstumsfaktors nicht ausgeschlossen werden. Bei der limitierten Proteolyse der Proproteine wurde bei beiden Varianten reifes GDF5 detektiert, jedoch war die Menge bei der T201P-Variante im Vergleich zum Wildtyp deutlich herabgesetzt (Thieme 2009, Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg; Job 2011, Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg) (siehe Anhang, Abb. 6.2). Während also bei der G319V-Variante die native Struktur von GDF5 erhalten bleiben sollte, könnte die veränderte Interaktion der T201P-Prodomäne mit GDF5 eine Fehlfaltung des Wachstumsfaktors bewirken und somit die Menge an wirksamem GDF5 verringern. In der G319V-Variante könnte eine Veränderung des Bereichs, der bei β 1-LAP an der Dimerisierung beteiligt ist, zu einer Beeinträchtigung der Interaktion der Prodomänen untereinander und der damit verbundenen Funktionen führen. Außerdem könnte bei beiden Varianten die Sekretion von GDF5 gestört sein, wie es bereits bei einer anderen Substitutionsmutation festgestellt wurde (Farooq *et al.*, 2013). Möglicherweise erlaubt nur die korrekte Faltung der Prodomäne eine Interaktion mit den - bislang noch nicht identifizierten - Komponenten, die zur Sekretion notwendig sind.

4.4 Das Kernfragment, eine Subdomäne der Prodomäne

Das Kernfragment der GDF5-Prodomäne entspricht, ausgehend von proTGF- β 1, exakt dem Bereich von β -Strang 1 bis β -Strang 10 und damit nahezu der gesamten "arm domain" von β 1-LAP (Thieme 2009, Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg; Shi et al. 2011) (Abb. 4.4). Vergleichbare Fragmente wurden auch in BMP2 und dem BMP2/4-Ortholog Decapentaplegic aus *Drosophila* entdeckt (Kuhfahl et al., 2011; Kuhfahl & Schwarz, 2014).

Bei der Untersuchung des Kernfragments mittels CD-Spektroskopie zeigte sich, dass die jeweiligen Hauptcharakteristika der Spektren der gesamten Prodomäne erhalten blieben, obwohl das Kernfragment nur ungefähr 40 % der AS-Reste der Prodomänensequenz besitzt. Das Fern-UV-CD-Spektrum wies wie bei der Prodomäne Merkmale der Spektren von β_{II} -Proteinen auf. Dies lässt auf einen großen Anteil an β -Faltblättern schließen (Sreerama & Woody, 2003). Der direkte Vergleich mit dem Spektrum der Prodomäne deutet auf einen verringerten Anteil an *random coil*-Regionen hin. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da sich das Kernfragment als äußerst proteolysestabil erwiesen hatte und *loop*-Strukturen für Proteasen bessere Substrate als kompakte Sekundärelemente darstellen. Das aus den Fern-UV-CD-Spektren von Prodomäne und Kernfragment berechnete Differenzspektrum zeigt, dass die Prodomäne außerhalb des Kernfragments nicht ausschließlich aus *random coil*-Strukturen besteht, sondern auch einen geringen Sekundärstrukturanteil besitzt. Der bereits beschriebene Strukturvorschlag für proGDF5 weist in diesem Abschnitt mehrere α -Helices auf, die in dem Differenzspektrum gut sichtbar sein sollten. Anhand dieser Tatsache wird deutlich, dass der Strukturvorschlag wie bereits erwähnt im Bereich außerhalb des Kernfragments nur bedingt verlässlich ist.

Das Nah-UV-CD-Spektrum des Kernfragments, das sich aus der Absorption der aromatischen AS ergibt, unterscheidet sich kaum von dem der gesamten Prodomäne. Bei Wellenlängen zwischen 280 und 300 nm war dies zu erwarten, da dort hauptsächlich Tryptophan-Reste absorbieren und alle drei in der Prodomäne vorhandenen Tryptophane im Kernfragment lokalisiert sind. Entsprechend sind auch die bei Prodomäne und Kernfragment übereinstimmenden Ergebnisse der Fluoreszenzspektroskopie nicht überraschend. Nur eines von den sechs in der Prodomäne enthaltenen Tyrosinen ist im Kernfragment lokalisiert und auch der den Tyrosinen entsprechende Absorptionsbereich zwischen 270 und 290 nm zeigt kaum Unterschiede. Die einzige eindeutige Abweichung zwischen den beiden Spektren ist zu Beginn der Spanne von 250 - 270 nm zu erkennen. Dort prägen hauptsächlich die acht im Kernfragment vorhandenen Phenylalanine den Verlauf des Spektrums. Im Nah-UV-Spektrum von proGDF5 ist im Bereich von 255 - 290 nm eine sehr hohe Signalintensität erkennbar, weshalb davon auszugehen ist, dass die nicht im Kernfragment enthaltenen Tyrosine und Phenylalanine der Prodomäne nahezu ausschließlich Tertiärkontakte mit GDF5 ausbilden.

Diese Beobachtung und die durch die Proteolysestabilität vermutete kompakte Struktur des Kernfragments lassen vermuten, dass die durch die GDF5-Bindung induzierten strukturellen Veränderungen der Prodomäne außerhalb des Kernfragments und damit in der N-terminalen Hälfte stattfinden.

Bei BMP2 wurde beobachtet, dass das Kernfragment deutlich stabiler ist als die Prodomäne (Kuhfahl *et al.*, 2011). Die thermodynamischen Untersuchungen des Kernfragments von GDF5 ergaben jedoch eine um $\Delta\Delta G_D (H_2O) = 6,3$ kJ/mol geringere Stabilität im Vergleich zur gesamten Prodomäne. Dies scheint vorrangig an der relativ hohen Stabilität der GDF5-Prodomäne zu liegen, da das GDF5-Kernfragment und der entsprechende Abschnitt der BMP2-Prodomäne nahezu identische ΔG_D -Werte aufweisen (Kuhfahl & Schwarz, 2014). Demnach trägt der Prodomänenbereich außerhalb des Kernfragments zur Stabilisierung der gesamten Prodomäne bei. Dies weist auf vorhandene Tertiärkontakte in diesem Abschnitt hin, die in der CD-Spektroskopie nicht detektiert werden konnten. Da der Abschnitt außerhalb des Kernfragments nahezu 60 % der gesamten Prodomäne ausmacht, ist dieser Beitrag jedoch verhältnismäßig klein. Dadurch wird die Vermutung unterstützt, dass die das Kernfragment flankierenden Segmente flexibel sind und sich durch die Bindung an GDF5 verändern könnten. Die hohe Stabilität des Kernfragments bestätigt die Annahme, dass es sich bei der Region zwischen den β -Strängen 1 und 10 um eine in der TGF- β -Superfamilie konservierte, hochstrukturierte Einheit innerhalb der Prodomäne handeln könnte (Shi *et al.*, 2011).

Die Experimente zur Bindung des Kernfragments an GDF5 waren nicht auswertbar. Da die Assoziationskurve des beschriebenen Experimentes ab einer Konzentration von ca. 5 μ M an Kernfragment linear anstieg, wurde von einer Sättigung der spezifischen Bindungsreaktion bei dieser Konzentration ausgegangen. Der weitere Signalanstieg wurde auf eine unspezifische Bindung zurückgeführt. Eine alternative Auswertung bestätigte diese Annahme. Die Dissoziationskonstante der Bindung des Kernfragments an reifes GDF5 war im Verhältnis zu der der Prodomäne um den Faktor 100 erhöht. Wenn man den Strukturvorschlag für proGDF5 betrachtet, besitzt das Kernfragment nur sehr wenige Interaktionsflächen mit reifem GDF5 (Abb. 4.4). Die stark verringerte Affinität ist demnach nicht überraschend. Diese Daten weisen darauf hin, dass die an der Interaktion mit reifem GDF5 beteiligten Bereiche der Prodomäne hauptsächlich im N-terminalen Bereich gelegen sind. Dadurch wird die Hypothese der durch GDF5-Bindung induzierten strukturellen Veränderung dieses Abschnitts weiter bekräftigt.

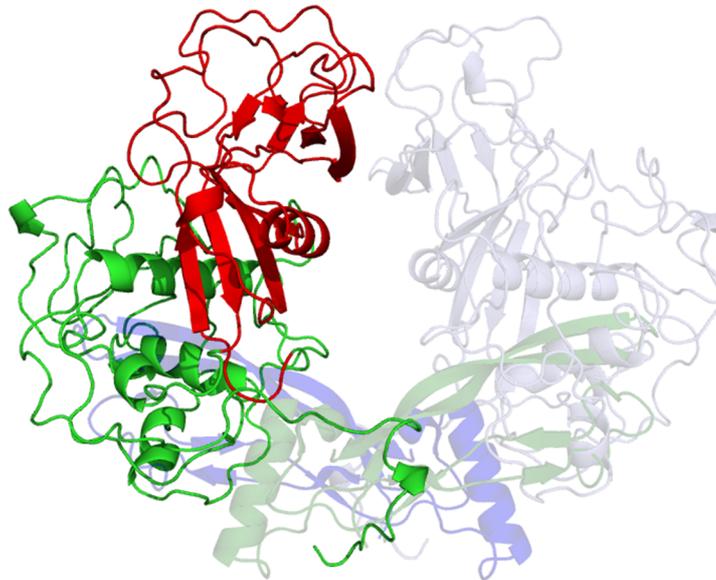


Abbildung 4.4: Strukturvorschlag für das proGDF5-Dimer in der *cartoon*-Darstellung (Thieme *et al.*, 2014). Das Kernfragment ist in rot dargestellt, die übrigen Reste der zugehörigen Prodomäne in hellgrün. Die andere Prodomäne (hellblau) und die GDF5-Monomere (blau und grün) sind transparent angedeutet.

Der gegenwärtige Stand der Strukturaufklärung mittels NMR-Untersuchungen deutet auf einen hohen Anteil an β -Faltblattstrukturen innerhalb des Kernfragments hin. Dieses Ergebnis deckt sich mit der für diesen Bereich modellierten Struktur. Bei den nach den NMR-Ergebnissen vermuteten *loop*-Regionen könnte es sich um den N-terminalen *FLAG-Tag*[®] oder die Termini des Kernfragments handeln, die über die β -Stränge 1 und 10 hinausragen. Es wäre auch möglich, dass diese Signale durch die *loop*-Bereiche zwischen den beiden β -Faltblättern erzeugt werden. Die in der AG Balbach erzeugten NMR-Spektren wiesen eine gute Signaldispersion auf und führten zur Zuordnung eines Großteils der AS-Reste. Da die Resonanzfrequenz von 800 MHz des in der AG Balbach zur Verfügung stehenden NMR-Spektrometers nicht ausreichte, um alle Reste zweifelsfrei zuzuordnen, waren weiterführende Untersuchungen in der AG Schwalbe (Goethe-Universität Frankfurt/Main) mit einem 950 MHz-Spektrometer nötig.

Bei Betrachtung der verschiedenen Ansätze, wie eine Domäne innerhalb eines Proteins definiert ist, kann das Kernfragment ebenfalls als Domäne oder Subdomäne bezeichnet werden. Es weist unabhängig von der gesamten Prodomäne eine stabile und reversible Faltung auf (Taylor, 1999). Außerdem besitzt es die für Domänen geforderte kompakte Struktur, die zur Gesamtstruktur beiträgt (Rose, 1979). Die Frage, ob die Kerndomäne die Funktionen der Prodomäne hinsichtlich Biogenese und Sekretion ersetzen kann, wie es beispielsweise für den vergleichbaren Abschnitt in der Prodomäne von BMP2 gezeigt wurde

(Kuhfahl & Schwarz, 2014), bleibt zu klären. Aufgrund der kompakten und stabilen Sekundär- und Tertiärstruktur könnte das Kernfragment als Faltungskern der gesamten Prodomäne agieren. Falls die Prodomäne von GDF5 wie bei anderen Vertretern in der Lage ist, als intramolekulares Chaperon zu wirken, würde das Kernfragment sogar die erste gefaltete Subdomäne während der Faltung des gesamten Proproteins darstellen. Allein die Tatsache, dass die krankheitsassoziierten AS-Austausche in der Prodomäne gehäuft innerhalb bzw. in direkter Umgebung des Kernfragments liegen, zeigt die große Bedeutung des Kernfragments auf die korrekte Funktion von GDF5.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden Erkenntnisse zur Struktur und Thermodynamik der Prodomäne von GDF5 gewonnen, indem sowohl die Prodomäne selbst, als auch ein proteolysestabiles Fragment eingehend untersucht wurden. Weiterhin konnten durch die Analyse krankheitsassoziierter Proteinvarianten erste Hinweise in die durch die Mutationen verursachten Veränderungen der Prodomäne erhalten werden. Die einzelnen Ergebnisse sind im Folgenden aufgeführt.

5.1 Die Charakterisierung der Prodomäne von GDF5

Durch Einfügen eines Stoppcodons C-terminal der Prodomäne in die cDNA von proGDF5 wurde ein Expressionsplasmid hergestellt. Ausgehend von IB-Material wurde eine Renaturierungs- und Reinigungsstrategie für das Protein etabliert, die zu einer homogenen Proteinspezies führte. Die isolierte Prodomäne wies definierte Sekundär- und Tertiärkontakte auf. Der Vergleich mit der Prodomäne im Kontext des Proproteins zeigte einen erhöhten *random coil*-Anteil in der isolierten Prodomäne. Dies deutete darauf hin, dass Teile der nativen Struktur der Prodomäne durch die Bindung an GDF5 induziert werden. Analytische Ultrazentrifugation belegte, dass die Prodomäne in Lösung als Monomer vorliegt. Die beiden Cysteine der Prodomäne liegen in einer intramolekularen Disulfidbrücke vor. Die Prodomäne entfaltet kooperativ und reversibel und zeigte eine Gibbs'sche freie Entfaltungsenthalpie von $\Delta G_D (H_2O) = 26,8 \pm 1,1$ kJ/mol. Weiterhin wurde eine Stabilisierung der Prodomäne durch die Komplexbildung mit GDF5 festgestellt. Für die Bindung der Prodomäne an GDF5 im nicht-kovalenten Proproteinkomplex wurde eine Dissoziationskonstante von $K_{D1} = 15,1 \pm 2,8$ nM ermittelt. Darüber hinaus wurden Hinweise für einen möglichen Einfluss der Prodomäne auf die Rezeptorbindung von GDF5 erhalten.

5.2 Vergleichende Charakterisierung krankheitsassoziierter Prodomänenvarianten

Die Prodomänenvarianten T201P und G319V wurden analog zum Wildtyp-Protein hergestellt. In den isolierten Prodomänen wurden nur geringe strukturelle Unterschiede zwischen den verschiedenen Varianten beobachtet. Im Kontext der Proform zeigten sich bei der T201P-Variante jedoch deutliche Veränderungen. Die isolierte Prodomäne wurde durch den G319V-Austausch um $\Delta\Delta G_D (H_2O) = 8,2$ kJ/mol destabilisiert. Die T201P-Variante war kaum beeinträchtigt, allerdings führte dieser Austausch im Kontext des Proproteins zu einer deutlichen Herabsetzung der thermodynamischen Stabilität der Prodomäne. Der vermutete

Einfluss des T201P-Austauschs auf die Bindung an GDF5 wurde durch eine um den Faktor 20 verringerte Affinität der Prodomäne zu GDF5 bestätigt. Die G319V-Variante blieb hinsichtlich der Bindung an den reifen Teil nahezu unbeeinflusst.

5.3 Die Charakterisierung des Kernfragments der GDF5-Prodomäne

Die Klonierung des Expressionsplasmids, die rekombinante Expression und die Etablierung der Proteinproduktion aus IB-Material erfolgten in von mir betreuten Bachelor- und Diplomarbeiten. Das Kernfragment wies eine definierte Sekundär- und Tertiärstruktur auf, wobei im Vergleich zur gesamten Prodomäne ein erhöhter Anteil an Sekundärstrukturen und ein Großteil aller in der Prodomäne nachgewiesenen Tertiärkontakte detektierbar war. Somit wurde die Annahme bestätigt, dass es sich bei dem Fragment um den strukturellen Kern der Prodomäne handelte. Mit sowohl kooperativen als auch reversiblen Denaturierungsübergängen wurde eine Gibbs'sche freie Entfaltungsenthalpie von $\Delta G_D (H_2O) = 20,5 \pm 1,1$ kJ/mol bestimmt. Das Kernfragment ist somit lediglich um $\Delta \Delta G_D (H_2O) = 6,3$ kJ/mol instabiler als die Prodomäne, obwohl es aus weniger als der Hälfte der AS besteht. Eine Interaktion zwischen dem Kernfragment und GDF5 konnte nicht nachgewiesen werden. Zur Strukturaufklärung wurde das Fragment durch Expression in Minimalmedium mit den stabilen Isotopen ^{13}C und ^{15}N markiert und an Kooperationspartner für NMR-Untersuchungen weitergeleitet. Die Daten wiesen durch eine hohe Signaldispersion auf einen hohen Anteil an Sekundär- und Tertiärstrukturen hin. Die Zuordnung der Signale ist weitgehend abgeschlossen, mit einem Strukturmodell ist in Kürze zu rechnen.

5.4 Ausblick

Zur Klärung der Funktion der Prodomäne und des Kernfragments im Biogeneseprozess sollte in Zellkulturstudien festgestellt werden, welche Segmente der Prodomäne für die korrekte Faltung des Proproteins und die Sekretion notwendig sind. Da die Prodomäne scheinbar die Bindung an BMPR1A beeinflusst, könnte durch Interaktionsstudien mit weiteren Rezeptorsubtypen und Inhibitoren die Funktion der Prodomäne in der Regulation der Wachstumsfaktoraktivität geklärt werden. Vergleichende Messungen mit den krankheitsassoziierten Varianten von proGDF5 sollten weitere Einblicke in die Auswirkungen der Mutationen auf die Funktion von GDF5 bieten. Sobald die NMR-Struktur des Kernfragments verfügbar ist, können durch Messung der Varianten strukturelle Veränderungen durch die krankheitsassoziierten AS-Austausche im Kontext des Kernfragments ermittelt werden. Mit genaueren Informationen zur Struktur des Kernfragments und einer potentiell darin enthaltenen Dimerisierungsstelle könnte durch das

gezielte Einfügen eines Cysteins ein intermolekulares Disulfid zwischen den Prodomänen in proGDF5 erzeugt und somit die Chance auf erfolgreiche kristallographische Untersuchungen des Proproteins erhöht werden.

6 Anhang

6.1 Herstellung von GDF5, proGDF5 und der BMPR1A-Ektodomäne

Das Expressionskonstrukt zur Herstellung von GDF5 entstand durch Isolierung des für die entsprechenden 120 AS kodierenden Abschnitts der cDNA-Sequenz von proGDF5. Das DNA-Fragment wurde durch PCR mithilfe der in Tabelle 2.5 (siehe Material & Methoden) aufgeführten Primer *mat for* und *mat rev* amplifiziert und anschließend in einen pET-11a-Leervektor kloniert. Die rekombinante Expression des Konstrukts erfolgte in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen in LB-Medium und führte zur Akkumulation des Proteins in Form von IBs. Die Präparation der IBs ergab eine Ausbeute von 10 mg solubilisiertem Protein pro Gramm Zellfeuchtmasse. Die in den IBs verbliebenen Verunreinigungen konnten mittels Heparin *Sepharose*TM-Chromatographie entfernt werden. Die Renaturierung wurde auf Grundlage des bereits etablierten Protokolls von proGDF5 in Renaturierungspuffer I über eine Dauer von zwei Wochen durchgeführt. Die Ausbildung der dimeren Proteinspezies wies, wie bereits für BMP2 beobachtet, stets auf eine korrekte Faltung des Proteins hin (Hillger *et al.*, 2005).

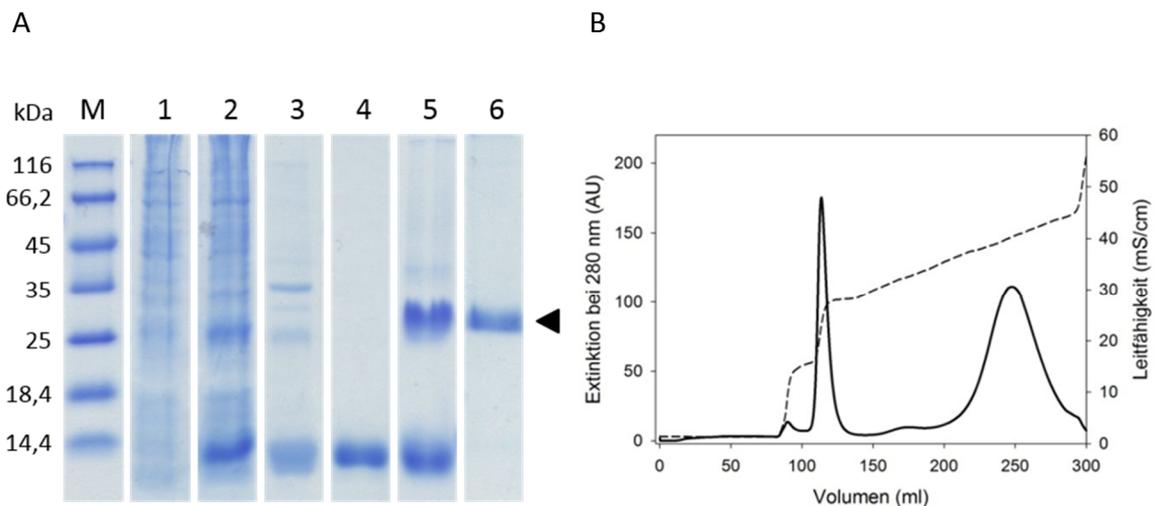


Abbildung 6.1: Rekombinante Genexpression und Reinigung von GDF5. (A) SDS-PA-Gel des Proteins nach dem jeweiligen Herstellungsschritt: M) Proteingrößenstandard, 1) Zellysate vor Induktion, 2) Zellysate nach Induktion, 3) IB-Solubilisat, 4) nach der ersten Heparin *Sepharose*TM-Chromatographie, 5) nach der Renaturierung, 6) nach der zweiten Heparin *Sepharose*TM-Chromatographie. Ein schwarzes Dreieck markiert das gereinigte Protein. (B) Elutionsprofil der Heparin *Sepharose*TM-Chromatographie des renaturierten GDF5: gezeigt sind die Absorption bei 280 nm (durchgezogene Linie) und die Leitfähigkeit (gestrichelte Linie).

Im Anschluss an die Renaturierung wurde das verbleibende Monomer und oligomere Spezies durch eine weitere Heparin *Sepharose*TM-Chromatographie abgetrennt (Abb. 6.1A). Das zugehörige Elutionsprofil zeigt einen symmetrischen Peak bei einer Leitfähigkeit von 37,8 - 43,7 mS/cm, entsprechend einer NaCl-Konzentration von 575 - 670 mM im eluierenden Puffer (Abb. 6.1B). Bezogen auf das zur Renaturierung eingesetzte Protein wurde eine Ausbeute an nativem Protein von ca. 22 % erreicht.

Die rekombinante Expression und Reinigung von proGDF5 wurde in vorangegangenen Arbeiten etabliert und erfolgte wie beschrieben (Thieme 2009, Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg). Die Ektodomäne von BMPR1A wurde ebenfalls nach einem bereits in der Arbeitsgruppe etablierten Protokoll hergestellt (Hauburger 2010, Dissertation, MLU Halle-Wittenberg).

6.2 Dekonvolution der Fern-UV-CD-Spektren

Die Dekonvolution von Fern-UV-CD-Spektren ermöglicht die Abschätzung der Sekundärstrukturanteile der untersuchten Proteine und erfolgte mithilfe der Programme CDSSTR, CONTINLL und SELCON3 (Sreerama & Woody, 2000). Da die Berechnungen mit den verschiedenen Programmen unterschiedliche Einzelwerte ergaben, wurde jeweils der Mittelwert gebildet. Die einzelnen Ergebnisse der Berechnungen sind in Tabelle 6.1 zusammengefasst.

Tabelle 6.1: Berechneter Anteil an *random coil*-Strukturen in den verschiedenen Proteinspektren

	CDSSTR	CONTINLL	SELCON3
isolierte Prodomäne	61,1 %	45,1 %	55,3 %
Differenzspektrum A	54,3 %	47,3 %	43,4 %
Kernfragment	40,7 %	44,8 %	46,7 %

6.3 Limitierte Proteolyse der proGDF5-Varianten

Die limitierte Proteolyse der verschiedenen Proproteine wurde bereits in früheren Arbeiten durchgeführt (Thieme 2009, Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg; Job 2011, Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg). Das Ergebnis ist in Abbildung 6.2 gezeigt.

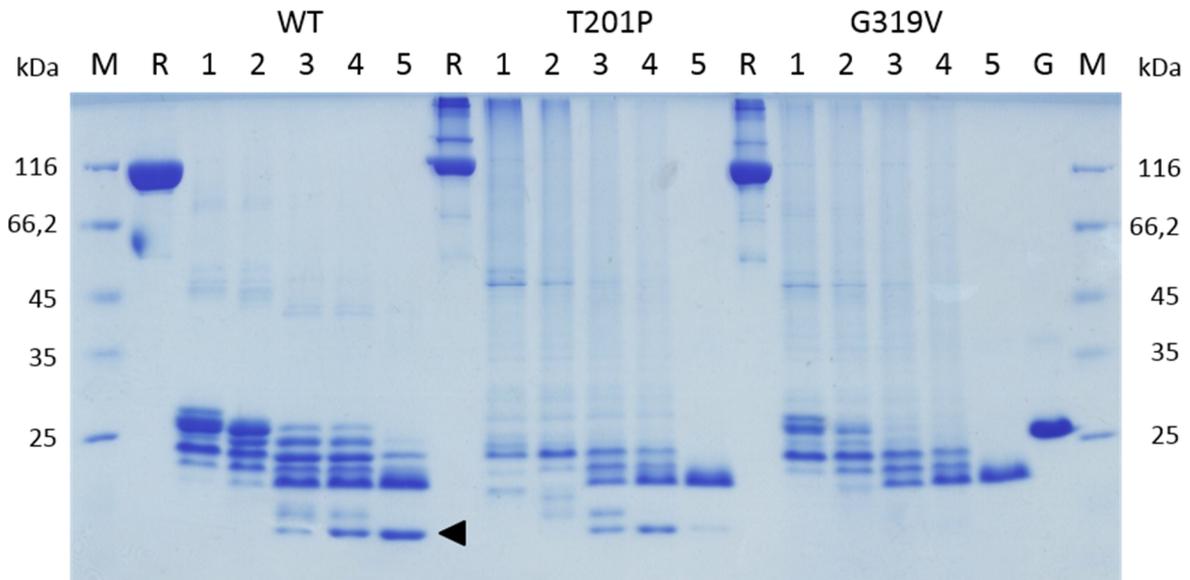


Abbildung 6.2: SDS-PA-Gel der limitierten Proteolyse der Proproteine des Wildtyps, von G319V und T201P: M) Proteingrößenstandard, R) Referenz ohne Trypsin, G) reifes GDF5, ansteigende Trypsinkonzentrationen (Massenverhältnisse, Trypsin im Unterschuss) sind durch 1)1:1000, 2) 1:500, 3) 1:100, 4) 1:50 und 5) 1:10 gekennzeichnet. Das schwarze Dreieck markiert das 17 kDa-Fragment.

6.4 SPR-Daten zu den Prodomänenvarianten

Im Folgenden sind die Sensogramme der Bindung der Prodomänenvarianten T201P und G319V an immobilisiertes GDF5 gezeigt (Abb. 6.3). Zur Auswertung der Daten wurden die Amplituden der Assoziationsreaktionen gegen die jeweilige Analytkonzentration aufgetragen. Die daraus entstandenen Bindungskurven wurden nach Gleichung 22 angepasst und sind im Ergebnisteil gezeigt.

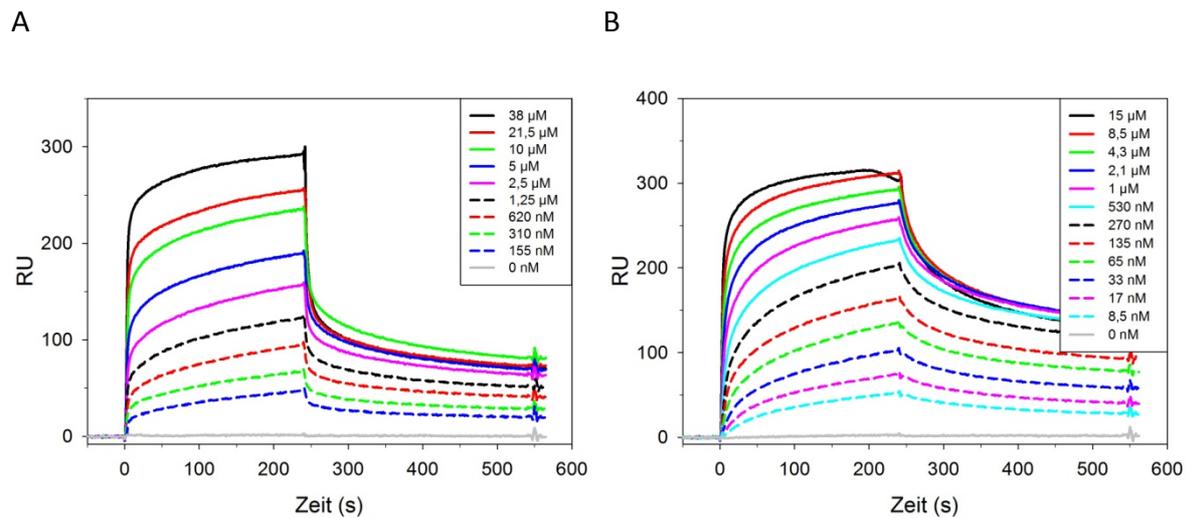


Abbildung 6.3: SPR-Messungen der Prodomänenvarianten auf immobilisiertem GDF5. Gezeigt sind die Sensogramme der Varianten T201P (A) und G319V (B) bei verschiedenen Analytkonzentrationen. Informationen zum Vorgehen siehe Abschnitt 2.2.4.7.

6.6 Originaldaten des Peptid-Microarrays

Die in Abbildung 6.5 dargestellten Originaldaten des Peptid-Microarrays zeigen die Interaktionen der BMPR1A-Ektodomäne mit den Abschnitten der AS-Sequenz von pre-proGDF5 und stellen die Grundlage der Abbildung 3.11 des Ergebnisteils dar. Die immobilisierten Polypeptide hatten eine Länge von 15 AS und waren jeweils um 3 AS versetzt. Jedes Polypeptid war in dreifacher Ausführung immobilisiert.

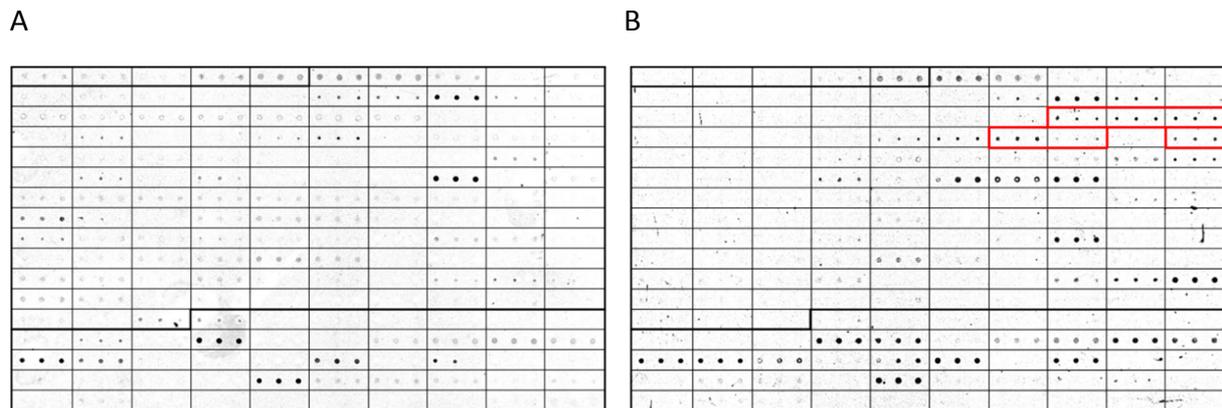


Abbildung 6.5: Peptid-Microarrays mit der BMPR1A-Ektodomäne als Analyt auf der AS-Sequenz von pre-proGDF5. Jedes Kästchen entspricht einem Polypeptid, die stärkeren Linien trennen Signalpeptid, Prodomäne und reifes GDF5. Gezeigt sind die Referenzmessung (A) und die Messung mit BMPR1A-Ektodomäne als Analyt (B). Die Signale des potentiellen Rezeptorbindeepitops der Prodomäne sind rot umrandet. Beschreibung der Methode siehe Abschnitt 2.2.4.8

7 Literaturverzeichnis

Allendorph, G.P., Vale, W.W. & Choe, S. (2006) Structure of the ternary signaling complex of a TGF-beta superfamily member. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 7643–7648.

Anderson, S.B., Goldberg, A.L. & Whitman, M. (2008) Identification of a novel pool of extracellular pro-myostatin in skeletal muscle. *The Journal of biological chemistry*, **283**, 7027–7035.

Annes, J.P., Chen, Y., Munger, J.S. & Rifkin, D.B. (2004) Integrin alphaVbeta6-mediated activation of latent TGF-beta requires the latent TGF-beta binding protein-1. *The Journal of cell biology*, **165**, 723–734.

Arnold, U. & Ulbrich-Hofmann, R. (1999) Quantitative protein precipitation from guanidine hydrochloride-containing solutions by sodium deoxycholate/trichloroacetic acid. *Analytical biochemistry*, **271**, 197–199.

Aspenberg, P. & Forslund, C. (1999) Enhanced tendon healing with GDF 5 and 6. *Acta orthopaedica Scandinavica*, **70**, 51–54.

Basit, S., Naqvi, S.K.-H., Wasif, N., Ali, G., Ansar, M. & Ahmad, W. (2008) A novel insertion mutation in the cartilage-derived morphogenetic protein-1 (CDMP1) gene underlies Grebe-type chondrodysplasia in a consanguineous Pakistani family. *BMC medical genetics*, **9**, 102.

Battaglia, T.C. (2005) GDF-5 deficiency alters stress-relaxation properties in mouse skin. *Journal of dermatological science*, **39**, 192–195.

Baur, S.T., Mai, J.J. & Dymecki, S.M. (2000) Combinatorial signaling through BMP receptor IB and GDF5 : shaping of the distal mouse limb and the genetics of distal limb diversity. *Development*, **619**, 605–619.

Bauskin, A.R., Zhang, H.P., Fairlie, W.D., He, X.Y., Russell, P.K., Moore, A.G., *et al.* (2000) The propeptide of macrophage inhibitory cytokine (MIC-1), a TGF-beta superfamily member, acts as a quality control determinant for correctly folded MIC-1. *The EMBO journal*, **19**, 2212–2220.

Beck, S., Good, J.A. Le, Guzman, M., Haim, N. Ben, Roy, K., Beermann, F., *et al.* (2002) Extraembryonic proteases regulate Nodal signalling during gastrulation. *Nature cell biology*, **4**, 981–985.

Benglis, D., Wang, M.Y. & Levi, A.D. (2008) A Comprehensive Review of the Safety Profile of Bone Morphogenetic Protein in Spine Surgery. *Operative Neurosurgery*, **62**, 5423–5431.

Bennmann, D. (2011) Rekombinante Herstellung und biophysikalische Charakterisierung eines proteolyse-resistenten Fragments der GDF-5-Prodomäne. *Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg*.

- Böttinger, E.P., Factor, V.M., Tsang, M.L.-S., Weatherbee, J.A., Kopp, J.B., Qian, S.W., *et al.* (1996) The recombinant proregion of transforming growth factor beta1 (latency-associated peptide) inhibits active transforming growth factor beta1 in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 5877–5882.
- Brinkmann, U., Mattes, R.E. & Buckel, P. (1989) High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the *dnaY* gene product. *Gene*, **85**, 109–114.
- Brown, M.A., Zhao, Q., Baker, K.A., Naik, C., Chen, C., Pukac, L., *et al.* (2005) Crystal structure of BMP-9 and functional interactions with pro-region and receptors. *The Journal of biological chemistry*, **280**, 25111–25118.
- Brunet, L.J., McMahon, J.A., McMahon, A.P. & Harland, R.M. (1998) Noggin, Cartilage Morphogenesis, and Joint Formation in the Mammalian Skeleton. *Science*, **280**, 1455–1457.
- Brunner, A.M., Marquardt, H., Malacko, A.R., Lioubin, M.N. & Purchio, A.F. (1989) Site-directed Mutagenesis of Cysteine Residues in the Pro Region of the Transforming Growth Factor β 1 Precursor. *The Journal of Biological Chemistry*, **264**, 13660–13664.
- Buxton, P., Edwards, C.J., Archer, C.W. & Francis-West, P.H. (2001) Growth/differentiation factor-5 (GDF-5) and skeletal development. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, **83-A Suppl**, S23–S30.
- Byrnes, A.M., Racacho, L., Nikkel, S.M., Xiao, F., MacDonald, H., Underhill, T.M., *et al.* (2010) Mutations in GDF5 presenting as semidominant brachydactyly A1. *Human mutation*, **31**, 1155–1162.
- Cantor, C.R. & Schimmel, P.R. (1980) *Biophysical Chemistry Part II: Techniques for the Study of Biological Structure and Education*. W.H. Freeman and Company, New York.
- Carlisle, E. & Fischgrund, J.S. (2005) Bone morphogenetic proteins for spinal fusion. *The spine journal*, **5**, 240S–249S.
- Chang, S.C., Hoang, B., Thomas, J.T., Vukicevic, S., Luyten, F.P., Ryball, N.J.P., *et al.* (1994) Cartilage-derived Morphogenetic Proteins. *The Journal of biological chemistry*, **269**, 28227–28234.
- Chen, C., Grzegorzewski, K.J., Barash, S., Zhao, Q., Schneider, H., Wang, Q., *et al.* (2003) An integrated functional genomics screening program reveals a role for BMP-9 in glucose homeostasis. *Nature biotechnology*, **21**, 1261–1264.
- Chen, H., Shi, S., Acosta, L., Li, W., Lu, J., Bao, S., *et al.* (2004) BMP10 is essential for maintaining cardiac growth during murine cardiogenesis. *Development (Cambridge, England)*, **131**, 2219–2231.
- Cheng, H., Jiang, W., Phillips, F.M., Haydon, R.C., Peng, Y., Zhou, L., *et al.* (2003) Osteogenic Activity of the Fourteen Types of Human Bone Morphogenetic Proteins (BMPs). *The Journal of bone and joint surgery.*, **85A**, 1544–1552.

- Chhabra, A., Tsou, D., Clark, R.T., Gaschen, V., Hunziker, E.B. & Mikic, B. (2003) GDF-5 deficiency in mice delays Achilles tendon healing. *Journal of orthopaedic research*, **21**, 826–835.
- Chhabra, A., Zijerdi, D., Zhang, J., Kline, A., Balian, G. & Hurwitz, S. (2005) BMP-14 Deficiency Inhibits Long Bone Fracture Healing. *Journal of Orthopaedic Trauma*, **19**, 629–634.
- Chujo, T., An, H.S., Akeda, K., Miyamoto, K., Muehleman, C., Attawia, M., *et al.* (2006) Effects of Growth Differentiation Factor-5 on the Intervertebral Disc - In Vitro Bovine Study and In Vivo Rabbit Disc Degeneration Model Study. *Spine*, **31**, 2909–2917.
- Constam, D.B. & Robertson, E.J. (1999) Regulation of bone morphogenetic protein activity by pro domains and proprotein convertases. *The Journal of cell biology*, **144**, 139–149.
- Crescenzo, G. De, Grothe, S., Zwaagstra, J., Tsang, M. & O'Connor-McCourt, M.D. (2001) Real-time monitoring of the interactions of transforming growth factor-beta (TGF-beta) isoforms with latency-associated protein and the ectodomains of the TGF-beta type II and III receptors reveals different kinetic models and stoichiometries of binding. *The Journal of biological chemistry*, **276**, 29632–29643.
- Cui, Y., Hackenmiller, R., Berg, L., Jean, F., Nakayama, T., Thomas, G., *et al.* (2001) The activity and signaling range of mature BMP-4 is regulated by sequential cleavage at two sites within the prodomain of the precursor. *Genes & development*, **15**, 2797–2802.
- Daluiski, A., Engstrand, T., Bahamonde, M.E., Gamer, L.W., Agius, E., Stevenson, S.L., *et al.* (2001) Bone morphogenetic protein-3 is a negative regulator of bone density. *Nature genetics*, **27**, 84–88.
- Daopin, S., Piez, K.A., Ogawa, Y. & Davies, D.R. (1992) Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily. *Science (New York, N.Y.)*, **257**, 369–373.
- Dawson, K., Seemann, P., Sebald, E., King, L., Edwards, M., Williams, J.I., *et al.* (2006) GDF5 Is a Second Locus for Multiple-Synostosis Syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, **78**, 708–712.
- Deicke, C. (2012) Rekombinante Herstellung und Reinigung verschiedener Varianten der Prodomäne des Growth and Differentiation Factor-5. *Masterarbeit, MLU Halle-Wittenberg*.
- Demchenko, A.P. (1986) *Ultraviolet Spectroscopy of Proteins*. Erweiterte. Springer-Verlag, Berlin.
- Dijke, P. ten. (2006) Bone morphogenetic protein signal transduction in bone. *Current Medical Research and Opinion*, **22**, 7–11.
- Dijke, P. ten, Fu, J., Schaap, P. & Roelen, B.A.J. (2003) Signal transduction of bone morphogenetic proteins in osteoblast differentiation. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, **85-A Suppl**, 34–38.

- Dijke, P. ten, Yamashita, H., Sampath, T.K., Reddi, A.H., Estevez, M., Riddle, D.L., *et al.* (1994) Identification of Type I Receptors for Osteogenic Protein-1 and Bone Morphogenetic Protein-4. *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 16985–16988.
- Douzgou, S., Lehmann, K., Mingarelli, R., Mundlos, S. & Dallapiccola, B. (2008) Compound heterozygosity for GDF5 in Du Pan type chondrodysplasia. *American journal of medical genetics. Part A*, **146A**, 2116–2121.
- Ducy, P. & Karsenty, G. (2000) The family of bone morphogenetic proteins. *Perspectives in Basic Science*, **57**, 2207–2214.
- Dudley, A.T., Lyons, K.M. & Robertson, E.J. (1995) A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes & Development*, **9**, 2795–2807.
- Ellman, G.L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics*, **82**, 70–77.
- Erlacher, L., McCartney, J., Piek, E., Dijke, P. ten, Yanagishita, M., Oppermann, H., *et al.* (1998) Cartilage-Derived Morphogenetic Proteins and Osteogenic Protein-1 Differentially Regulate Osteogenesis. *Journal of Bone and Mineral Research*, **13**, 383–392.
- Everman, D.B., Bartels, C.F., Yang, Y., Yanamandra, N., Goodman, F.R., Mendoza-Londono, J.R., *et al.* (2002) The mutational spectrum of brachydactyly type C. *American Journal of Medical Genetics*, **112**, 291–296.
- Faiyaz-Ul-Haque, M., Ahmad, W., Wahab, A., Haque, S., Azim, A.C., Zaidi, S.H.E., *et al.* (2002) Frameshift mutation in the cartilage-derived morphogenetic protein 1 (CDMP1) gene and severe acromesomelic chondrodysplasia resembling Grebe-type chondrodysplasia. *American Journal of Medical Genetics*, **111**, 31–37.
- Farooq, M., Nakai, H., Fujimoto, A., Fujikawa, H., Kjaer, K.W., Baig, S.M., *et al.* (2013) Characterization of a novel missense mutation in the prodomain of GDF5, which underlies brachydactyly type C and mild Grebe type chondrodysplasia in a large Pakistani family. *Human genetics*, **132**, 1253–1264.
- Freire, E. (1995) Differential Scanning Calorimetry. *Methods in Molecular Biology*, **40**, 191–218.
- Gandhi, N.S. & Mancera, R.L. (2012) Prediction of heparin binding sites in bone morphogenetic proteins (BMPs). *Biochimica et biophysica acta*, **1824**, 1374–1381.
- Ge, G., Hopkins, D.R., Ho, W.-B. & Greenspan, D.S. (2005) GDF11 Forms a Bone Morphogenetic Protein 1-Activated Latent Complex That Can Modulate Nerve Growth Factor-Induced Differentiation of PC12 Cells. *Molecular and Cellular Biology*, **25**, 5846–5858.
- Gentry, L.E. & Nash, B.W. (1990) The pro domain of pre-pro-transforming growth factor beta 1 when independently expressed is a functional binding protein for the mature growth factor. *Biochemistry*, **29**, 6851–6857.

- Gilboa, L., Nohe, A., Geissendörfer, T., Sebald, W., Henis, Y.I. & Knaus, P. (2000) Bone morphogenetic protein receptor complexes on the surface of live cells: a new oligomerization mode for serine/threonine kinase receptors. *Molecular biology of the cell*, **11**, 1023–1035.
- Gill, S.C. & Hippel, P.H. (1989) Calculation of Protein Extinction Coefficients from Amino Acid Sequence Data. *Analytical Biochemistry*, **182**, 319–326.
- Govender, S., Csimma, C., Genant, H.K. & Valentin-Opran, A. (2002) Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 for Treatment of Open Tibial Fractures. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, **84A**, 2123–2134.
- Gray, A.M. & Mason, A.J. (1990) Requirement for Activin A and Transforming Growth Factor- β Pro-Regions in Homodimer Assembly. *Science*, **247**, 1328–1330.
- Grebe, H. (1955) *Chondrodysplasie*. Istituto Gregorio Mendel, Rom.
- Gregory, K.E., Ono, R.N., Charbonneau, N.L., Kuo, C.-L., Keene, D.R., Bächinger, H.P., *et al.* (2005) The prodomain of BMP-7 targets the BMP-7 complex to the extracellular matrix. *The Journal of biological chemistry*, **280**, 27970–27980.
- Griffith, D.L., Keck, P.C., Sampath, T.K., Rueger, D.C. & Carlson, W.D. (1996) Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: structural paradigm for the transforming growth factor beta superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 878–883.
- Hachimi, H., Tahiri, L., Ghani, N., Ouldim, K. & Harzy, T. (2012) Multiple synostosis syndrome. *Joint, bone, spine*, **79**, 198.
- Hassel, S., Schmitt, S., Hartung, A., Roth, M., Nohe, A., Petersen, N., *et al.* (2003) Initiation of Smad-dependent and Smad-independent signaling via distinct BMP-receptor complexes. *The Journal of bone and joint surgery*, **85**, 44–51.
- Hauburger, A. (2010) Die Pro-Form des Knochenwachstumsfaktors BMP-2: Charakterisierung der Rezeptorbindung und Identifizierung einer Subdomäne. *Promotion, MLU Halle-Wittenberg*.
- Hauburger, A., Einem, S. von, Schwaerzer, G.K., Buttstedt, A., Zebisch, M., Schräml, M., *et al.* (2009) The pro-form of BMP-2 interferes with BMP-2 signalling by competing with BMP-2 for IA receptor binding. *The FEBS journal*, **276**, 6386–6398.
- Heinecke, K., Seher, A., Schmitz, W., Müller, T.D., Sebald, W. & Nickel, J. (2009) Receptor oligomerization and beyond: a case study in bone morphogenetic proteins. *BMC biology*, **7**, 1–20.
- Henn, R.F., Kuo, C.E., Kessler, M.W., Razzano, P., Grande, D.P. & Wolfe, S.W. (2010) Augmentation of zone II flexor tendon repair using growth differentiation factor 5 in a rabbit model. *The Journal of hand surgery*, **35**, 1825–1832.

- Hentunen, T.A., Lakkakorpi, P.T., Tuukkanen, J., Lehenkari, P.P., Sampath, T.K. & Väänänen, H.K. (1995) Effects of Recombinant Human Osteogenic Protein-1 on the Differentiation of Osteoclast-like Cells and Bone Resorption. *Biochemical and biophysical research communications*, **209**, 433–443.
- Hill, J.J., Davies, M. V., Pearson, A.A., Wang, J.H., Hewick, R.M., Wolfman, N.M., *et al.* (2002) The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. *The Journal of biological chemistry*, **277**, 40735–40741.
- Hillger, F., Herr, G., Rudolph, R. & Schwarz, E. (2005) Biophysical comparison of BMP-2, ProBMP-2, and the free pro-peptide reveals stabilization of the pro-peptide by the mature growth factor. *The Journal of biological chemistry*, **280**, 14974–14980.
- Hogan, B.L. (1996) Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes & Development*, **10**, 1580–1594.
- Hötten, G.C., Matsumoto, T., Kimura, M., Bechtold, R.F., Kron, R., Ohara, T., *et al.* (1996) Recombinant human growth/differentiation factor 5 stimulates mesenchyme aggregation and chondrogenesis responsible for the skeletal development of limbs. *Growth factors*, **13**, 65–74.
- Hunter, A.G.W. & Thompson, M.W. (1976) Acromesomelic Dwarfism : Description of a Patient and Comparison with Previously Reported Cases. *Human genetics*, **34**, 107–113.
- Iemura, S.-I., Yamamoto, T.S., Takagi, C., Uchiyama, H., Natsume, T., Shimasaki, S., *et al.* (1998) Direct binding of follistatin to a complex of bone-morphogenetic protein and its receptor inhibits ventral and epidermal cell fates in early *Xenopus* embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 9337–9342.
- Isaacs, N.W. (1995) Cystine knots. *Current opinion in structural biology*, **5**, 391–395.
- Itoh, F., Asao, H., Sugamura, K., Heldin, C.-H., Dijke, P. ten & Itoh, S. (2001) Promoting bone morphogenetic protein signaling through negative regulation of inhibitory Smads. *The EMBO journal*, **20**, 4132–4142.
- Iwasaki, S., Iguchi, M., Watanabe, K., Hoshino, R., Tsujimoto, M. & Kohno, M. (1999) Specific Activation of the p38 Mitogen-activated Protein Kinase Signaling Pathway and Induction of Neurite Outgrowth in PC12 Cells by Bone Morphogenetic Protein-2. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 26503–26510.
- Jin, H.-J., Dunn, M.A., Borthakur, D. & Kim, Y.S. (2004) Refolding and purification of unprocessed porcine myostatin expressed in *Escherichia coli*. *Protein expression and purification*, **35**, 1–10.
- Job, F. (2011) Die mit Skelettfehlbildung assoziierte Variante der Pro-Form von GDF-5 : Biochemische und biophysikalische Charakterisierung. *Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg*.

- Jones, W.K., Richmond, E.A., White, K., Sasak, H., Kusmik, W., Smart, J., *et al.* (1994) Osteogenic Protein-1 (OP-1) Expression and Processing in Chinese Hamster Ovary Cells: Isolation of a Soluble Complex Containing the Mature and Pro-Domains of OP-1. *Growth factors*, **11**, 215–225.
- Kain, M.S.H. & Einhorn, T.A. (2005) Recombinant human bone morphogenetic proteins in the treatment of fractures. *Foot and Ankle Clinics*, **10**, 639–650.
- Kaissi, A. Al, Zwettler, E., Ganger, R., Schreiner, S., Klaushofer, K. & Grill, F. (2013) Musculo-skeletal abnormalities in patients with Marfan syndrome. *Clinical medicine insights. Arthritis and musculoskeletal disorders*, **6**, 1–9.
- Kaneko, H., Arakawa, T., Mano, H., Kaneda, T., Ogasawara, A., Nakagawa, M., *et al.* (2000) Direct stimulation of osteoclastic bone resorption by bone morphogenetic protein (BMP)-2 and expression of BMP receptors in mature osteoclasts. *Bone*, **27**, 479–486.
- Kjaer, K.W., Eiberg, H., Hansen, L., Hagen, C.B. van der, Rosendahl, K., Tommerup, N., *et al.* (2006) A mutation in the receptor binding site of GDF5 causes Mohr-Wriedt brachydactyly type A2. *Journal of medical genetics*, **43**, 225–231.
- Klages, J., Kotsch, A., Coles, M., Sebald, W., Nickel, J., Müller, T.D., *et al.* (2008) The Solution Structure of BMPRII Reveals a Local Disorder-to-Order Transition upon BMP-2 Binding. *Biochemistry*, **47**, 11930–11939.
- Kliemann, M., Rattenholl, A., Golbik, R., Balbach, J., Lilie, H., Rudolph, R., *et al.* (2004) The mature part of proNGF induces the structure of its pro-peptide. *FEBS letters*, **566**, 207–212.
- Kohn, G., Veder, M., Schoenfeld, A. & Shawwa, R. El. (1989) New type of autosomal recessive short-limb dwarfism with absent fibulae, exceptionally short digits, and normal intelligence. *American journal of medical genetics*, **34**, 535–540.
- Kotsch, A., Nickel, J., Seher, A., Sebald, W. & Müller, T.D. (2009) Crystal structure analysis reveals a spring-loaded latch as molecular mechanism for GDF-5-type I receptor specificity. *The EMBO journal*, **28**, 937–947.
- Kriegelstein, K., Suter-Cazzolara, C., Hotten, G., Pohl, J. & Unsicker, K. (1995) Trophic and protective effects of growth/differentiation factor 5, a member of the transforming growth factor- β superfamily, on midbrain dopaminergic neurons. *Journal of Neuroscience Research*, **42**, 724–732.
- Kuhfahl, S., Hauburger, A., Thieme, T., Groppe, J.C., Ihling, C., Tomic, S., *et al.* (2011) Identification of a core domain within the proregion of bone morphogenetic proteins that interacts with the dimeric, mature domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **408**, 300–305.
- Kuhfahl, S. & Schwarz, E. (2014) A core domain of the BMP2 proregion is sufficient for the biogenesis of mature homodimeric growth factor. *Biological chemistry*, **im Druck**.

Kuo, M.M.-C., Kim, S., Tseng, C.-Y., Jeon, Y.-H., Choe, S. & Lee, D.K. (2014) BMP-9 as a potent brown adipogenic inducer with anti-obesity capacity. *Biomaterials*, **35**, 3172–3179.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685.

Langer, L.O., Cervenka, J. & Camargo, M. (1989) A severe autosomal recessive acromesomelic dysplasia, the Hunter-Thompson type, and comparison with the Grebe type. *Human genetics*, **81**, 323–328.

Lee, J. & Wikesjö, U.M.E. (2014) Growth/differentiation factor-5: pre-clinical and clinical evaluations of periodontal regeneration and alveolar augmentation - review. *Journal of clinical periodontology*, **41**, 797–805.

Lee, R., Kermani, P., Teng, K.K. & Hempstead, B.L. (2001) Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science (New York, N.Y.)*, **294**, 1945–1948.

Lee, S.-J. (2004) Regulation of muscle mass by myostatin. *Annual review of cell and developmental biology*, **20**, 61–86.

Li, R.H. & Wozney, J.M. (2001) Delivering on the promise of bone morphogenetic proteins. *Trends in Biotechnology*, **19**, 255–265.

Li, X., Leo, B.M., Beck, G., Balian, G. & Anderson, G.D. (2004) Collagen and Proteoglycan Abnormalities in the GDF-5-Deficient Mice and Molecular Changes When Treating Disk Cells With Recombinant Growth Factor. *Spine*, **29**, 2229–2234.

Liao, W.X., Moore, R.K., Otsuka, F. & Shimasaki, S. (2003) Effect of intracellular interactions on the processing and secretion of bone morphogenetic protein-15 (BMP-15) and growth and differentiation factor-9. Implication of the aberrant ovarian phenotype of BMP-15 mutant sheep. *The Journal of biological chemistry*, **278**, 3713–3719.

Liu, A. & Niswander, L.A. (2005) Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development. *Nature reviews. Neuroscience*, **6**, 945–954.

Lories, R.J.U., Derese, I., Ceuppens, J.L. & Luyten, F.P. (2003) Bone morphogenetic proteins 2 and 6, expressed in arthritic synovium, are regulated by proinflammatory cytokines and differentially modulate fibroblast-like synoviocyte apoptosis. *Arthritis and rheumatism*, **48**, 2807–2818.

Luo, G., Hofmann, C., Bronckers, A.L., Sohocki, M., Bradley, A. & Karsenty, G. (1995) BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes & Development*, **9**, 2808–2820.

Macias, D., Gañan, Y., Sampath, T.K., Piedra, M.E., Ros, M.A. & Hurler, J.M. (1997) Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development. *Development (Cambridge, England)*, **124**, 1109–1117.

- Mcdonald, N.Q. & Hendrickson, W.A. (1993) A Structural Superfamily of Growth Factors Containing a Cystine Knot Motif. *Cell*, **73**, 421–424.
- McMahon, G.A., Dignam, J.D. & Gentry, L.E. (1996) Structural characterization of the latent complex between transforming growth factor β 1 and β 1-lateny-associated peptide. *Biochemical Journal*, **313**, 343–351.
- Meulenbelt, I., Min, J.L., Duijn, C.M. van, Kloppenburg, M., Breedveld, F.C. & Slagboom, P.E. (2006) Strong linkage on 2q33.3 to familial early-onset generalized osteoarthritis and a consideration of two positional candidate genes. *European journal of human genetics*, **14**, 1280–1287.
- Mikic, B., Battaglia, T.C., Taylor, E.A. & Clark, R.T. (2002) The effect of growth/differentiation factor-5 deficiency on femoral composition and mechanical behavior in mice. *Bone*, **30**, 733–737.
- Mikic, B., Schalet, B.J., Clark, R.T., Gaschen, V. & Hunziker, E.B. (2001) GDF-5 deficiency in mice alters the ultrastructure, mechanical properties and composition of the Achilles tendon. *Journal of orthopaedic research*, **19**, 365–371.
- Miyamoto, Y., Mabuchi, A., Shi, D., Kubo, T., Takatori, Y., Saito, S., *et al.* (2007) A functional polymorphism in the 5' UTR of GDF5 is associated with susceptibility to osteoarthritis. *Nature Genetics*, **39**, 529–533.
- Miyazono, K., Olofsson, A., Colosetti, P. & Heldin, C.-H. (1991) A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1. *The EMBO journal*, **10**, 1091–1101.
- Mori, S., Abeygunawardana, C., Johnson, M.O. & Zijl, P.C. van. (1995) Improved sensitivity of HSQC spectra of exchanging protons at short interscan delays using a new fast HSQC (FHSQC) detection scheme that avoids water saturation. *J Magn Reson B*, **108**, 94–98.
- Müller, T.D. & Nickel, J. (2012) Promiscuity and specificity in BMP receptor activation. *FEBS letters*, **586**, 1846–1859.
- Myers, J.K., Pace, C.N. & Scholtz, J.M. (1995) Denaturant m values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. *Protein science : a publication of the Protein Society*, **4**, 2138–2148.
- Neuhaus, H., Rosen, V. & Thies, R.S. (1999) Heart specific expression of mouse BMP-10 a novel member of the TGF-beta superfamily. *Mechanisms of development*, **80**, 181–184.
- Neumann, F. (2014) Vergleichende Charakterisierung von Aminosäureaustauschen der Prodomäne des humanen Wachstumsfaktors GDF-5. *Masterarbeit, MLU Halle-Wittenberg*.
- Nickel, J., Kotsch, A., Sebald, W. & Müller, T.D. (2005) A single residue of GDF-5 defines binding specificity to BMP receptor IB. *Journal of Molecular Biology*, **349**, 933–947.

- Nishitoh, H., Ichijo, H., Kimura, M., Matsumoto, T., Makishima, F., Yamaguchi, A., *et al.* (1996) Identification of Type I and Type II Serine / Threonine Kinase Receptors for Growth / Differentiation Factor-5 *. *J Biol Chem*, **271**, 21345–21352.
- Nistala, H., Lee-Arteaga, S., Smaldone, S., Siciliano, G., Carta, L., Ono, R.N., *et al.* (2010) Fibrillin-1 and -2 differentially modulate endogenous TGF- β and BMP bioavailability during bone formation. *The Journal of cell biology*, **190**, 1107–1121.
- Nohe, A., Hassel, S., Ehrlich, M., Neubauer, F., Sebald, W., Henis, Y.I., *et al.* (2002) The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways. *The Journal of biological chemistry*, **277**, 5330–5338.
- Nykjaer, A., Lee, R., Teng, K.K., Jansen, P., Madsen, P., Nielsen, M.S., *et al.* (2004) Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature*, **427**, 843–848.
- Ohkawara, B., Iemura, S.-I., Dijke, P. ten & Ueno, N. (2002) Action range of BMP is defined by its N-terminal basic amino acid core. *Current biology*, **12**, 205–209.
- Onichtchouk, D., Chen, Y.-G., Dosch, R., Gawantka, V., Delius, H., Massagué, J., *et al.* (1999) Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature*, **401**, 480–485.
- Osório, C., Chacón, P.J., Kisiswa, L., White, M., Wyatt, S., Rodríguez-Tébar, A., *et al.* (2013) Growth differentiation factor 5 is a key physiological regulator of dendrite growth during development. *Development*, **140**, 4751–4762.
- Pace, C.N. (1986) Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods in enzymology*, **131**, 266–280.
- Pace, C.N. & Shaw, K.L. (2000) Linear Extrapolation Method of Analyzing Solvent Denaturation Curves. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, **Suppl 4**, 1–7.
- Pan, C.M. Du. (1924) Absence congenitale du perone sans deformation du tibia: curieuses deformations congenitales des mains. *Rev. Orthop.*, **11**, 227–234.
- Piccolo, S., Sasai, Y., Lu, B. & Robertis, E.M. De. (1996) Dorsoventral patterning in Xenopus: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell*, **86**, 589–598.
- Plöger, F., Seemann, P., Schmidt-von Kegler, M., Lehmann, K., Seidel, J., Kjaer, K.W., *et al.* (2008) Brachydactyly type A2 associated with a defect in proGDF5 processing. *Human Molecular Genetics*, **17**, 1222–1233.
- Polinkovsky, A., Robin, N.H., Thomas, J.T., Irons, M., Lynn, A., Goodman, F.R., *et al.* (1997) Mutations in CDMP1 cause autosomal dominant brachydactyly type C. *Nature Genetics*, **17**, 18–19.
- Quelle-Salgado, A. (1964) A New Type of Dwarfism with Various Bone Aplasias and Hypoplasias of the Extremities. *Human Heredity*, **14**, 63–66.

- Reddi, A.H. (1998) Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nature biotechnology*, **16**, 247–252.
- Rickert, M., Jung, M., Adiyaman, M., Richter, W. & Simank, H.-G. (2001) A growth and differentiation factor-5 (GDF-5)-coated suture stimulates tendon healing in an Achilles tendon model in rats. *Growth factors*, **19**, 115–126.
- Rider, C.C. & Mulloy, B. (2010) Bone morphogenetic protein and growth differentiation factor cytokine families and their protein antagonists. *The Biochemical journal*, **429**, 1–12.
- Rose, G.D. (1979) Hierarchic organization of domains in globular proteins. *Journal of Molecular Biology*, **134**, 447–470.
- Rountree, R.B., Schoor, M., Chen, H., Marks, M.E., Harley, V., Mishina, Y., *et al.* (2004) BMP receptor signaling is required for postnatal maintenance of articular cartilage. *PLoS biology*, **2**, 1815–1827.
- Rudolph, R., Böhm, G., Lilie, H. & Jaenicke, R. (1997) Folding Proteins. In *Protein Function: A Practical Approach* (ed. Creighton, T.E. & Hames, B.D.). Oxford University Press Inc., New York, pp. 57–99.
- Rudolph, R., Schwarz, E., Herr, G. & Hillger, F. (2008) Production of recombinant BMP-2.
- Ruppert, R., Hoffmann, E. & Sebald, W. (1996) Human bone morphogenetic protein 2 contains a heparin-binding site which modifies its biological activity. *European journal of biochemistry / FEBS*, **237**, 295–302.
- Sampath, T.K. & Reddi, A.H. (1981) Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **78**, 7599–7603.
- Santoro, M.M. & Bolen, D.W. (1988) Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry*, **27**, 8063–8068.
- Scheufler, C., Sebald, W. & Hülsmeier, M. (1999) Crystal Structure of Human Bone Morphogenetic Protein-2 at 2.7 Å. *Journal of Molecular Biology*, **287**, 103–115.
- Schiefer, J., Held, M., Rath, R., Petersen, W., Werner, J.-O., Schaller, H.-E., *et al.* (2014) GDF-5 leads to a better skin quality after full-thickness skin defects. In *32. Jahrestagung der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Verbrennungsbehandlung (DAV 2014)*.
- Schlunegger, M.P. & Grütter, M.G. (1992) An Unusual Feature Revealed by the Crystal Structure at 2.2 Å Resolution of Human Transforming Growth Factor Beta2. *Nature*, **358**, 430–434.
- Schmid, F.X. (1997) Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes. In *Protein Structure - A practical approach* (ed. Creighton, T.E. & Hames, B.D.). Oxford University Press Inc., pp. 261–297.

Schreuder, H., Liesum, A., Pohl, J.S., Kruse, M. & Koyama, M. (2005) Crystal structure of recombinant human growth and differentiation factor 5: Evidence for interaction of the type I and type II receptor-binding sites. *Biochemical and biophysical research communications*, **329**, 1076–1086.

Schuck, P. (1997) Use of Surface Plasmon Resonance to Probe the Equilibrium and Dynamic Aspects of Interactions between Biological Macromolecules. *Annual review of Biophysics and Biomolecular Structure*, **26**, 541–566.

Schwabe, G.C., Türkmen, S., Leschik, G., Palanduz, S., Stöver, B., Goecke, T.O., *et al.* (2004) Brachydactyly type C caused by a homozygous missense mutation in the prodomain of CDMP1. *American journal of medical genetics*, **124**, 356–363.

Sengle, G., Charbonneau, N.L., Ono, R.N., Sasaki, T., Alvarez, J., Keene, D.R., *et al.* (2008a) Targeting of bone morphogenetic protein growth factor complexes to fibrillin. *The Journal of biological chemistry*, **283**, 13874–13888.

Sengle, G., Ono, R.N., Lyons, K.M., Bächinger, H.P. & Sakai, L.Y. (2008b) A new model for growth factor activation: type II receptors compete with the prodomain for BMP-7. *Journal of molecular biology*, **381**, 1025–1039.

Sengle, G., Ono, R.N., Sasaki, T. & Sakai, L.Y. (2011) Prodomains of transforming growth factor beta (TGFβ) superfamily members specify different functions: extracellular matrix interactions and growth factor bioavailability. *The Journal of biological chemistry*, **286**, 5087–5099.

Shi, M., Zhu, J., Wang, R., Chen, X., Mi, L., Walz, T., *et al.* (2011) Latent TGF-β structure and activation. *Nature*, **474**, 343–349.

Shields, L.B.E., Raque, G.H., Glassman, S.D., Campbell, M., Vitaz, T., Harpring, J., *et al.* (2006) Adverse effects associated with high-dose recombinant human bone morphogenetic protein-2 use in anterior cervical spine fusion. *Spine*, **31**, 542–547.

Simank, H.-G., Sergi, C., Jung, M., Adolf, S., Eckhardt, C., Ehemann, V., *et al.* (2004) Effects of local application of growth and differentiation factor-5 (GDF-5) in a full-thickness cartilage defect model. *Growth factors*, **22**, 35–43.

Song, Q., Mehler, M.F. & Kessler, J.A. (1998) Bone morphogenetic proteins induce apoptosis and growth factor dependence of cultured sympathoadrenal progenitor cells. *Developmental biology*, **196**, 119–127.

Sopory, S., Nelsen, S.M., Degnin, C., Wong, C. & Christian, J.L. (2006) Regulation of bone morphogenetic protein-4 activity by sequence elements within the prodomain. *The Journal of biological chemistry*, **281**, 34021–34031.

Spiro, R.C., Thompson, A.Y. & Poser, J.W. (2001) Spinal fusion with recombinant human growth and differentiation factor-5 combined with a mineralized collagen matrix. *The Anatomical record*, **263**, 388–395.

Sreerama, N. & Woody, R.W. (1994) Poly(pro)II helices in globular proteins: identification and circular dichroic analysis. *Biochemistry*, **33**, 10022–10025.

Sreerama, N. & Woody, R.W. (2000) Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Analytical biochemistry*, **287**, 252–260.

Sreerama, N. & Woody, R.W. (2003) Structural composition of β I- and β II-proteins. *Protein Science*, **12**, 384–388.

Sreerama, N. & Woody, R.W. (2004) Computation and Analysis of Protein Circular Dichroism Spectra. *Methods in Enzymology*, **383**, 318–351.

Stange, K., Thieme, T., Hertel, K., Kuhfahl, S., Janecke, A.R., Piza-Katzer, H., *et al.* (2014) Molecular analysis of two novel missense mutations in the GDF5 proregion that reduce protein activity and are associated with brachydactyly type C. *Journal of molecular biology*, **426**, 3221–3231.

Storm, E.E., Huynh, T. V., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Kingsley, D.M. & Lee, S.-J. (1994) Limb alterations in brachypodism mice due to mutations in a new member of the TGF β -superfamily. *Nature*, **368**, 639–643.

Storm, E.E. & Kingsley, D.M. (1996) Joint patterning defects caused by single and double mutations in members of the bone morphogenetic protein (BMP) family. *Development*, **122**, 3969–3979.

Sullivan, A.M. & O’Keefe, G.W. (2005) The role of growth / differentiation factor 5 (GDF5) in the induction and survival of midbrain dopaminergic neurones : relevance to Parkinson ’ s disease treatment. *Journal of Anatomy*, **207**, 219–226.

Sun, P., Wang, J., Zheng, Y., Fan, Y. & Gu, Z. (2012) BMP2/7 heterodimer is a stronger inducer of bone regeneration in peri-implant bone defects model than BMP2 or BMP7 homodimer. *Dental Materials Journal*, **31**, 239–248.

Svedberg, T. & Pedersen, K.O. (1940) *The ultracentrifuge*. Oxford Press.

Takahashi, T., Takahashi, I., Komatsu, M., Sawaishi, Y., Higashi, K., Nishimura, G., *et al.* (2001) Mutations of the NOG gene in individuals with proximal symphalangism and multiple synostosis syndrome. *Clinical Genetics*, **60**, 447–451.

Tanford, C. (1968) Protein Denaturation. *Adv. Protein Chem.*, **23**, 121–282.

Tashiro, T., Fukui, N., Hiraoka, H., Tanaka, S., Oda, H., Nakamura, K., *et al.* (1999) GROWTH AND DIFFERENTIATION FACTOR-5 PROMOTES THE REPAIR PROCESS OF MEDIAL COLLATERAL. In *45th Annual Meeting, Orthopaedic Research Society*. p. 301.

Taylor, W.R. (1999) Protein structural domain identification. *Protein Engineering*, **12**, 203–216.

- Temtamy, S.A. & Aglan, M.S. (2008) Brachydactyly. *Orphanet journal of rare diseases*, **3**, 1–16.
- Thieme, T. (2009) Biophysikalische Charakterisierung der Pro-Form des Wachstumsfaktors GDF-5 und einer mutationsbedingten Variante, die zu Skelettfehlentwicklungen führt. *Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg*.
- Thieme, T., Patzschke, R., Job, F., Liebold, J., Seemann, P., Lilie, H., *et al.* (2014) Biophysical and structural characterization of a folded core domain within the proregion of growth and differentiation factor-5. *The FEBS journal*, **281**, 4866–4877.
- Thies, R.S., Chen, T., Davies, M. V., Tomkinson, K.N., Pearson, A.A., Shakey, Q.A., *et al.* (2001) GDF-8 propeptide binds to GDF-8 and antagonizes biological activity by inhibiting GDF-8 receptor binding. *Growth factors*, **18**, 251–259.
- Thomas, J.T., Lin, K., Nandedkar, M., Camargo, M., Cervenka, J. & Luyten, F.P. (1996) A human chondrodysplasia due to a mutation in a TGF- β superfamily member. *Nature Genetics*, **12**, 315–317.
- Thomas, J.T., Prakash, D., Weih, K. & Moos, M.J. (2006) CDMP1/GDF5 has specific processing requirements that restrict its action to joint surfaces. *The Journal of biological chemistry*, **281**, 26725–26733.
- Urist, M.R. (1965) Bone: formation by autoinduction. *Science*, **150**, 893–899.
- Urist, M.R., Sato, K., Brownell, A.G., Malinin, T.I., Lietze, A., Huo, Y.K., *et al.* (1983) Human bone morphogenetic protein (hBMP). *Proc Soc Exp Biol Med*, **173**, 194–199.
- Urist, M.R. & Strates, B.S. (1971) Bone Morphogenetic Protein. *Journal of Dental Research*, **50**, 1392–1406.
- Valera, E., Isaacs, M.J., Kawakami, Y., Izpisúa Belmonte, J.C. & Choe, S. (2010) BMP-2/6 heterodimer is more effective than BMP-2 or BMP-6 homodimers as inducer of differentiation of human embryonic stem cells. *PLoS one*, **5**, 1–14.
- Walsh, A.J.L., Bradford, D.S. & Lotz, J.C. (2004) In vivo growth factor treatment of degenerated intervertebral discs. *Spine*, **29**, 156–163.
- Wang, X., Xiao, F., Yang, Q., Liang, B., Tang, Z., Jiang, L., *et al.* (2006) A Novel Mutation in GDF5 Causes Autosomal Dominant Symphalangism in Two Chinese Families. *American journal of medical genetics*, **140A**, 1846–1853.
- Warburg, O. & Christian, W. (1941) Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. *Naturwissenschaften*, **29**, 589–590.
- Weichler, M.-T. (2010) Identifizierung von Subdomänen von Pro-Formen menschlicher Knochenwachstumsfaktoren. *Bachelorarbeit, MLU Halle-Wittenberg*.

Wilson, C.A., Clemente, N. di, Ehrenfels, C., Pepinsky, R.B., Josso, N., Vigier, B., *et al.* (1993) Mullerian Inhibiting Substance Requires Its N-Terminal Domain for Maintenance of Biological Activity , a Novel Finding within the Transforming Growth Factor- β Superfamily. *Molecular endocrinology*, **7**, 247–257.

Wolfman, N.M., Hattersley, G., Cox, K., Celeste, A.J., Nelson, R., Yamaji, N., *et al.* (1997) Ectopic Induction of Tendon and Ligament in Rats by Growth and Differentiation Factors 5 , 6 , and 7 , Members of the TGF- β Gene Family. *Journal of Clinical Investigation*, **100**, 321–330.

Wozney, J.M. (2002) Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine*, **27**, 2–8.

Wozney, J.M., Rosen, V., Celeste, A.J., Mitsock, L.M., Whitters, M.J., Kriz, R.W., *et al.* (1988) Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science (New York, N.Y.)*, **242**, 1528–1534.

Wrana, J.L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F. & Massagué, J. (1994) Mechanism of Activation of the TGF-beta Receptor. *Nature*, **370**, 341–347.

Yamashita, H., Shimizu, A., Kato, M., Nishitoh, H., Ichijo, H., Hanyu, A., *et al.* (1997) Growth/differentiation factor-5 induces angiogenesis in vivo. *Experimental cell research*, **235**, 218–226.

Yang, W., Cao, L., Liu, W., Jiang, L., Sun, M., Zhang, D., *et al.* (2008) Novel point mutations in GDF5 associated with two distinct limb malformations in Chinese: brachydactyly type C and proximal symphalangism. *Journal of human genetics*, **53**, 368–374.

Yokouchi, Y., Sakiyama, J., Kameda, T., Iba, H., Suzuki, A., Ueno, N., *et al.* (1996) BMP-2 / -4 mediate programmed cell death in chicken limb buds. *Development*, **122**, 3725–3734.

Yoon, B.S. & Lyons, K.M. (2004) Multiple functions of BMPs in chondrogenesis. *Journal of cellular biochemistry*, **93**, 93–103.

Zimmerman, L.B., Jesús-Escobar, J.M. De & Harland, R.M. (1996) The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell*, **86**, 599–606.

Zou, H., Wieser, R., Massagué, J. & Niswander, L.A. (1997) Distinct roles of type I bone morphogenetic protein receptors in the formation and differentiation of cartilage. *Genes & Development*, **11**, 2191–2203.

8 Abkürzungsverzeichnis

A	hier: Extinktion
AA/BAA	Acrylamid / Bisacrylamid
ActR	<i>Activin receptor</i>
AD	akromesomale Dysplasie
app	apparent
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
AU	<i>arbitrary unit</i> , willkürliche Einheit
BD	<i>Brachydactyly</i>
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BMPR	<i>BMP receptor</i>
bp	<i>brachypodism</i>
CD	Circulardichroismus
CDMP	<i>Cartilage-Derived Morphogenetic Protein</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Cys	Cystein
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DSC	dynamische Differenzkalorimetrie
DTNB	Dithionitrobenzoesäure
D ₂ O	Deuteriumoxid, schweres Wasser
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
E. coli	Escherichia coli
FHSQC	<i>fast Heteronuclear Single-Quantum Correlation</i>
GDF	<i>Growth and Differentiation Factor</i>
GdmCl	Guanidiniumchlorid
GSH	Glutathion, reduziert
GSSG	Glutathion, oxidiert
IB	<i>inclusion body</i>
IMAC	immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
LAP	<i>Latency-Associated Peptide</i>
L-Arg	L-Arginin
LB	<i>lysogeny broth</i>
LTBP	<i>Latent TGF-β Binding Protein</i>
MALDI-TOF-MS	<i>matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-</i> Massenspektrometrie
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>

MIC	<i>Macrophage-inhibitory Cytokine</i>
MRW	<i>mean residue weight</i>
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
NaAc	Natriumacetat
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
NaDOC	Natriumdesoxycholat
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RGD	hier: Arginin-Glycin-Aspartat
RU	<i>resonance unit</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEC	Größenausschluss-Chromatographie
SMAD	zusammengesetzt aus <i>sma</i> und <i>mothers against decapentaplegic</i>
SPC	<i>Subtilisin-like Proprotein Convertase</i>
SPR	Oberflächenplasmonresonanz
SV	Säulenvolumen
TAE	hier: Tris-Acetat-EDTA
TB	<i>terrific broth</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS/T	<i>Tris-buffered saline</i> mit Tween-20
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
TSR	<i>TGF-β superfamily receptor</i>
T β R	<i>TGF-β receptor</i>
UV	ultraviolett
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
x g	x-fache Erdbeschleunigung

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Elisabeth Schwarz danke ich für die Möglichkeit, nach meiner Diplomarbeit an dem sehr interessanten Thema weiterzuarbeiten und meine Promotion in ihrer Arbeitsgruppe anfertigen zu können. Außerdem möchte ich mich für die gute Betreuung, die fachliche Unterstützung und ein wirklich sehr angenehmes und nicht selbstverständliches Verhältnis zu ihr als Chefin bedanken.

Bei Prof. Dr. Jochen Balbach und Prof. Dr. Harald Schwalbe bedanke ich mich für die Kooperation bei den NMR-Untersuchungen. Deren Mitarbeitern Rica Patzschke und Atia Tulwahab danke ich für die Durchführung der NMR-Messungen und deren Auswertung.

Prof. Dr. Mike Schutkowski danke ich für die Möglichkeit, die Peptid-*Microarray*-Untersuchungen durchzuführen. Bei Dr. David Rauh und Antonia Masch möchte ich mich für die wertvollen Tipps zur Technik und Auswertung bedanken.

Ich danke PD Dr. Hauke Lilie für die Hilfe bei der analytischen Ultrazentrifugation und der „Wartung“ des Biacore X. Weiterhin möchte ich mich für die hochwertige konstruktive Kritik und Diskussionen zum Thema bedanken.

PD Dr. Ralph Golbik danke ich für die Tipps und Tricks bei der Auswertung der Entfaltungsübergänge. Bei Prof. Dr. Thomas Müller bedanke ich mich für die Bereitstellung des Protokolls zur Isotopenmarkierung. Für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen danke ich Dr. Angelika Schierhorn.

Weiterhin danke ich unserer TA Christiane Harnisch, die mit ihrer Zuarbeit im Labor und den kleinen Aufmerksamkeiten zu Geburtstagen, Ostern und Nikolaus immer für angenehmes und reibungsloses Arbeiten gesorgt hat. Auch Dr. Mathias Strutz und Katja Möritz danke ich für ihr organisatorisches Geschick und den unkomplizierten Umgang mit dem ganzen Papierkram.

Ein besonderer Dank gilt meinen ehemaligen Doktorandenkollegen in der AG Schwarz. Jens, Steffen, Silke, Reno, Chris, Anja und Sabrina haben immer für eine herrliche Atmosphäre im Labor gesorgt. Es hat jeden Tag Spaß gemacht, mit euch zu arbeiten. Gerade die enge Zusammenarbeit mit Silke hat es mich immer schaffen lassen, auch die nervigsten Eigenheiten der von uns untersuchten Proteine mit einem Lächeln zu ignorieren. Natürlich dürfen auch Felix, Christin, Flo, Dori und Teresa nicht unerwähnt bleiben, die mir als Bachelor-, Master- oder Diplomstudent die eine oder andere Aufgabe abgenommen haben. Ich möchte mich auch bei den Kollegen außerhalb der AG, im Speziellen bei Christian, Micha, Martin, Franzi, Jenni, Lars, Dennis und Lydia bedanken. Die Stimmung im Institut, die WM-Tippspiele, die

Kaffeepausen, die Kirschblütenfeste und Weihnachtsfeiern werde ich immer in Erinnerung behalten.

Einen mindestens ebenso großen Anteil an meiner Motivation, diese Arbeit zu Ende zu bringen haben meine zahlreichen alten und neuen Freunde, die die letzten 10 Jahre in Halle zum bisher schönsten Abschnitt meines Lebens gemacht haben. Ob im Studium oder während der Promotion, ohne den Ausgleich zum Alltag im Chari, FloPo, BC und Fiddler oder einfach nur am Küchentisch wäre es deutlich langweiliger und wahrscheinlich auch nicht so erfolgreich verlaufen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Freundin Julia, die sich manches Mal mein Meckern anhören musste, wenn es nicht so gut lief und auch geduldig war, als es mal wieder länger dauerte.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich immer auf verschiedenste Art unterstützt hat und ohne die es mir nicht möglich gewesen wäre, diesen Weg zu gehen.

Lebenslauf

Zur Person

Name:	Thieme	Vorname:	Tino
Geburtsdatum:	08. Februar 1985	Geburtsort:	Merseburg
Familienstand:	ledig	Nationalität:	deutsch
Geschlecht:	männlich		

Bildungsweg

Promotion

seit 11/2009 Promotion an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg am Institut für Biochemie/ Biotechnologie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Schwarz

Hochschulausbildung

11/2009 Studienabschluss als Diplom-Biochemiker (Gesamtnote: 1,3)

01/2008 - 11/2009 Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Biochemie/ Biotechnologie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Schwarz

10/2004 - 11/2009 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Schulausbildung

06/2004 Abitur (Gesamtnote: 1,4)

08/1995 - 06/2004 Schulbildung am Geiseltal-Gymnasium, Mücheln

09/1991 - 06/1995 Grundschule „Geschwister Scholl“, Mücheln

Publikationen

Kuhfahl, S., Hauburger, A., Thieme, T., Groppe, J., Ihling, C., Tomic, S., Schutkowski, M., Sinz, A. and Schwarz, E. (2011) Identification of a core domain within the proregion of bone morphogenetic proteins that interacts with the dimeric, mature domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **408**, 300–305.

Schwarz, E. and Thieme, T. (2014) Rekombinante Proteine - Anwendung in Therapie und Diagnostik. *GIT-Labor-Fachzeitschrift*, **58**, 50-52.

Stange, K., Thieme, T., Hertel, K., Kuhfahl, S., Janecke, A.R., Piza-Katzer, H., Penttinen, M., Hietala, M., Dathe, K., Mundlos, S., Schwarz, E. and Seemann, P. (2014) Molecular Analysis of Two Novel Missense Mutations in the GDF5 Proregion That Reduce Protein Activity and Are Associated with Brachydactyly Type C. *Journal of molecular biology*, **426**, 3221-3231.

Thieme, T., Patzschke, R., Job, F., Liebold, J., Seemann, P., Lilie, H., Balbach, J. and Schwarz, E. (2014) Biophysical and structural characterization of a folded core domain within the proregion of growth and differentiation factor-5. *The FEBS Journal*, **281**, 4866-4877.

Präsentationen

Poster-Präsentationen

9th International Conference on Bone Morphogenetic Proteins: Bone Morphogenetic Proteins - Regenerative Medicine and Stem Cells (Juni 2012). Lake Tahoe, Kailifornien, USA.

23th Protein Faltertage (Oktober 2012). Regensburg, Deutschland

Mündliche Präsentationen

Anlässlich von Gesamtarbeitsbesprechungen im April 2011 und März 2013 des Protein-Kompetenznetzwerks-Halle: "tools, targets and therapeutics" ProNet-T3

Erklärung an Eides statt

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Benutzung der aufgeführten Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen wurden als solche gekennzeichnet.

Ich versichere weiterhin, dass ich mich mit dieser Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe. Ich habe mich mit der vorliegenden Arbeit weder an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg noch an einer anderen Einrichtung um die Erlangung eines akademischen Grades beworben.

Tino Thieme