

**Untersuchungen zur
Pro-Sequenz-vermittelten Faltung
von rekombinantem, humanen
Nervenwachstumsfaktor**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Anke Rattenholl
geb. am 11.05.1971 in Bielefeld

Gutachter:

1. Prof. Dr. rer. nat. Rainer Rudolph, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2. Prof. Dr. rer. nat. Rainer Jaenicke, Universität Regensburg
3. Prof. Dr. rer. nat. Johannes Buchner, TU München

Halle/Saale, 20.06.2001 (Datum der Verteidigung)

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	β -NGF (<i>β-Nerve Growth Factor</i>) und die Familie der Neurotrophine	1
1.2	Entdeckung und Struktur von NGF	1
1.3	Die Neurotrophin-Rezeptoren	5
1.4	Rh-NGF als mögliches Therapeutikum zur Behandlung degenerativer Krankheiten des Nervensystems	8
1.5	Herstellung von rh-NGF	9
1.6	Die langsame Entfaltung von NGF	10
1.7	Die Pro-Sequenz-vermittelte Faltung von Proteinen	12
1.8	Problemstellung und Ziele dieser Arbeit	14
2	Material und Methoden	16
2.1	Material	16
2.1.1	Chemikalien	16
2.1.2	Standards und Kits	17
2.1.3	Enzyme und andere Proteine	17
2.1.4	Sonstiges Material	18
2.1.5	Geräte	18
2.1.6	<i>E. coli</i> -Stämme und Plasmide	21
2.1.7	Oligodesoxynukleotide	22
2.1.8	Medien, Antibiotika und Puffer	23
2.1.8.1	Medien	23
2.1.8.2	Antibiotika	23
2.1.8.3	Puffer	23
2.2	Methoden	26
2.2.1	Gentechnische Methoden	26
2.2.1.1	Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> -Zellen (XL1-Blue, BL21(DE3) und BL21(DE3)/pUBS520)	26
2.2.1.2	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen durch Elektroporation (Dower, 1990)	26
2.2.1.3	Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i> -Stämmen	27
2.2.1.4	Schnelles Plasmid- <i>Screening</i> („Quickpreps“)	27
2.2.1.5	Plasmid-Isolierung	27
2.2.1.5.1	CTAB-Methode (Del Sal <i>et al.</i> , 1989)	27
2.2.1.5.2	Isolierung mit dem <i>Spin</i> - oder <i>Midiprep-Kit</i> von Qiagen („Qiaprep“)	28
2.2.1.6	Bestimmung der DNA-Konzentration	28
2.2.1.7	Agarose-Gelelektrophorese	28
2.2.1.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR; nach Mullis & Faloona, 1987)	28
2.2.1.9	Aufreinigung von PCR-Produkten und geschnittener DNA	29
2.2.1.10	Enzymatische Spaltung von PCR-Produkten und Plasmiden	30
2.2.1.11	Behandlung geschnittener Vektoren mit alkalischer Phosphatase	30
2.2.1.12	Ligierung von DNA-Fragmenten	30
2.2.1.13	DNA-Sequenzierung	30
2.2.2	Allgemeine proteinchemische Methoden	31
2.2.2.1	Anzucht von <i>E. coli</i>	31
2.2.2.2	IB-Präparation (Rudolph <i>et al.</i> , 1997)	31
2.2.2.3	IB-Solubilisierung (Rudolph <i>et al.</i> , 1997)	32
2.2.2.4	Bestimmung freier SH-Gruppen (Habeeb, 1972)	32

2.2.2.5	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	32
2.2.2.5.1	Bestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)	32
2.2.2.5.2	Bestimmung durch Messung der UV-Absorption	33
2.2.2.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	33
2.2.2.6.1	Färbung mit Coomassie R250	34
2.2.2.6.2	Silberfärbung (Nesterenko <i>et al.</i> , 1994)	34
2.2.2.7	Proteinfällung mit Natriumdesoxycholat (Arnold & Ulbrich-Hofmann, 1999).....	34
2.2.2.8	Western-Blot.....	34
2.2.2.9	N-terminale Proteinsequenzierung.....	35
2.2.2.10	Massenspektrometrie	35
2.2.2.11	Aufkonzentrierung von Proteinlösungen	35
2.2.2.12	Analytische Gelfiltration	35
2.2.2.13	PAGE unter nativen Bedingungen (McLellan, 1982; Radziejewski <i>et al.</i> , 1992).....	36
2.2.2.14	Chemische Quervernetzung mit Glutaraldehyd (nach Rudolph <i>et al.</i> , 1997)	36
2.2.2.15	Limitierte Proteolyse.....	36
2.2.3	Renaturierung und Reinigung von rh-Pro-NGF.....	37
2.2.3.1	Faltungsoptimierung von rh-Pro-NGF aus <i>Inclusion Bodies</i>	37
2.2.3.2	Pulsrenaturierung von rh-Pro-NGF.....	37
2.2.3.3	Reinigung von renaturiertem rh-Pro-NGF mittels Kationen-Austauschchromatographie	38
2.2.4	Reinigung des rh-NGF-Pro-Peptids.....	38
2.2.4.1	Zellaufschluss und Kationen-Austauschchromatographie	38
2.2.4.2	Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC).....	38
2.2.4.3	Kationen-Austauschchromatographie	39
2.2.5	Reinigung des rh-His ₁₀ -NGF-Pro-Peptids	39
2.2.5.1	Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)	39
2.2.5.2	Kationen-Austauschchromatographie	39
2.2.6	<i>Bioassay</i> (Davies, 1989).....	39
2.2.7	Spektroskopische Methoden	40
2.2.7.1	Fluoreszenzspektroskopie.....	40
2.2.7.1.1	Emissionsspektren	40
2.2.7.1.2	Denaturierungsmittel-abhängige Übergänge.....	40
2.2.7.1.3	Temperaturübergänge.....	41
2.2.7.2	Circulardichroismus	41
2.2.7.3	Analytische Ultrazentrifugation	42
2.2.7.4	1D-1H-NMR-Spektren	43
2.2.8	Identifizierung von Faltungsintermediaten	43
2.2.8.1	Vergleichende Untersuchung der oxidativen Faltung von rh-Pro-NGF und rh-NGF.....	43
2.2.8.1.1	Herstellung von reduziertem Protein (Rudolph <i>et al.</i> , 1997)	43
2.2.8.1.2	Alkylierung von Intermediaten (Gray, 1993; Torella <i>et al.</i> , 1994)	44
2.2.8.1.3	Elektrospray-Massenspektrometrie	44
2.2.8.2	Strukturelle Charakterisierung der Intermediate.....	45
2.2.8.2.1	Limitierte Proteolyse.....	45
2.2.8.2.2	MALDI-TOF-Massenspektrometrie.....	45
2.2.9	Untersuchung der langsamen Faltung von disulfidverbrücktem rh-Pro-NGF und rh-NGF.....	45
2.2.9.1	RP-HPLC-Kinetiken	45
2.2.9.2	Faltung in Gegenwart verschiedener PPIasen	46
2.2.10	Renaturierung von rh-NGF <i>in trans</i>	46

3 Ergebnisse und Diskussion.....	47
3.1 Expression, Renaturierung und Reinigung von rekombinatem, humanen Pro-NGF	47
3.1.1 Konstruktion des Expressionsplasmids.....	47
3.1.2 <i>Inclusion Body</i> -Präparation	48
3.1.3 Optimierung der Renaturierung von rh-Pro-NGF	49
3.1.3.1 Vorversuche	49
3.1.3.2 Zeit- und Temperaturabhängigkeit der Renaturierung von rh-Pro-NGF	50
3.1.3.3 Einfluss des pH-Werts auf die Renaturierungsausbeute	51
3.1.3.4 Effekt der L-Arginin-Konzentration auf die Faltungsausbeute	52
3.1.3.5 Auswirkung der Konzentration an oxidiertem Glutathion auf die Renaturierungsausbeute von rh-Pro-NGF	52
3.1.3.6 Einfluss der GSH-Konzentration auf die Renaturierungsausbeute.....	53
3.1.3.7 Auswirkung der Guanidinium-Konzentration auf die Faltungsausbeute	54
3.1.3.8 Einfluss der rh-Pro-NGF-Konzentration auf die Renaturierungsausbeute	55
3.1.3.9 Reinigung des rh-Pro-NGF nach der Renaturierung.....	56
3.1.3.10 Zusammenfassung der bisherigen Resultate	56
3.2 Charakterisierung des rekombinanten, humanen Pro-NGF	56
3.2.1 N-terminale Sequenzierung und massenspektrometrische Analyse	56
3.2.2 Limitierte Proteolyse.....	57
3.2.3 Untersuchung der Quartärstruktur.....	60
3.2.3.1 Analytische Ultrazentrifugation	60
3.2.3.2 Analytische Gelfiltration	61
3.2.3.3 Chemische Quervernetzung	62
3.2.4 Spektrale Eigenschaften von rh-Pro-NGF.....	63
3.2.4.1 UV-Absorption.....	63
3.2.4.2 Fluoreszenz-Emissionsspektren	64
3.2.4.3 Circular dichroismus	65
3.2.4.4 Thermische Stabilität	66
3.2.4.5 Biologische Aktivität.....	67
3.2.4.6 Zusammenfassung von Kapitel 3.2.....	69
3.3 Expression und Reinigung des NGF-Pro-Peptids	69
3.3.1 Herstellung der Expressionsplasmide	69
3.3.2 Isolierung der beiden Pro-Peptide.....	70
3.3.2.1 Reinigung des rh-NGF-Pro-Peptids ohne Fusions- <i>Tag</i>	70
3.3.2.2 Darstellung des rh-NGF-Pro-Peptids mit Deka-His- <i>Tag</i> (rh-His ₁₀ -NGF-Pro-Peptid)	71
3.4 Charakterisierung des rekombinanten, humanen NGF-Pro-Peptids	72
3.4.1 N-terminale Sequenzierung und massenspektrometrische Analyse	72
3.4.2 Untersuchung der Quartärstruktur.....	73
3.4.2.1 Analytische Ultrazentrifugation	74
3.4.2.2 Analytische Gelfiltration	74
3.4.2.3 Chemische Quervernetzung	75
3.4.2.4 Untersuchung der Wechselwirkung zwischen rh-NGF-Pro-Peptid und reifem rh-NGF	76
3.4.2.4.1 Analytische Gelfiltration eines Gemischs von reifem rh-NGF und dem Pro-Peptid	76
3.4.2.4.2 PAGE unter nativen Bedingungen.....	77
3.4.3 Spektrale Eigenschaften des Pro-Peptids	78
3.4.3.1 UV-Absorption.....	78
3.4.3.2 Fluoreszenz-Emissionsspektren	79
3.4.3.3 Circular dichroismus	80

3.4.3.4	Thermische Stabilität	82
3.4.3.5	¹ D- ¹ H-NMR-Spektren	83
3.4.4	Untersuchung der biologischen Aktivität des rh-NGF-Pro-Peptids.....	84
3.4.5	Zusammenfassung von Kapitel 3.4.....	86
3.5	Faltung von reifem, humanen NGF in Gegenwart des isolierten rh-NGF-Pro-Peptids (Renaturierung <i>in trans</i>)	86
3.6	Vergleich der oxidativen Faltung von rh-NGF und rh-Pro-NGF	87
3.6.1	Oxidative Faltung von rh-Pro-NGF	89
3.6.2	Oxidative Faltung von rh-NGF	95
3.7	Untersuchungen zur langsamen Faltung und Entfaltung des oxidierten Nervenwachstumsfaktors	99
3.7.1	Guanidiniumchlorid-abhängige Übergänge von rh-NGF und rh-Pro-NGF.....	99
3.7.2	Vergleich der langsamen Faltung von oxidiertem rh-NGF und rh-Pro-NGF	102
3.7.3	Untersuchung der langsamen Faltung von rh-NGF in Gegenwart verschiedener PPIasen.....	108
4	Zusammenfassung und Ausblick.....	110
5	Literatur	113
Anhang		I
Abkürzungsliste.....		I
Aminosäuren		IV

1 Einleitung

1.1 β -NGF (β -Nerve Growth Factor) und die Familie der Neurotrophine

β -NGF (β -Nerve Growth Factor; im Folgenden als NGF bezeichnet) ist ein Mitglied der Neurotrophin-Proteinfamilie (Übersichtsartikel: Bradshaw *et al.*, 1993). Neben NGF wurden bisher fünf weitere Neurotrophine bzw. deren cDNAs anhand ihrer Aktivität bzw. durch Klonierung identifiziert. Alle Neurotrophine bewirken Überleben, Wachstum und Differenzierung bestimmter Populationen von Neuronen. Unter bestimmten Umständen induzieren Neurotrophine jedoch auch Apoptose, den programmierten Zelltod (Casaccia-Bonnel *et al.*, 1996; Frade *et al.*, 1996).

Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) lässt sich hauptsächlich im Gehirn nachweisen und wirkt auf Zellen des zentralen und peripheren Nervensystems (Barde, 1990). Die anderen vier Neurotrophine bzw. deren cDNAs, NT-3, NT-4/5, NT-6 und NT-7, wurden ursprünglich durch Klonierung identifiziert und mit rekombinantem Material charakterisiert (Ernfors *et al.*, 1990; Hohn *et al.*, 1990; Maisonpierre *et al.*, 1990; Rosenthal *et al.*, 1990; Berkemeier *et al.*, 1991; Hallböök *et al.*, 1991; Götz *et al.*, 1994; Lai *et al.*, 1998). NT-4 wurde erstmals im Krallenfrosch *Xenopus laevis* gefunden und ist lediglich eine Variante des NT-5, welches in Säugern identifiziert wurde (Ip *et al.*, 1992). Aus diesem Grund hat sich die Bezeichnung NT-4/5 eingebürgert. Innerhalb der Klasse der Neurotrophine weisen die einzelnen Mitglieder untereinander über 50 % Sequenz-Homologie auf. Neurotrophine sind homodimere Proteine; allerdings ließen sich *in vitro* mit BDNF, NT-3 und NT-4/5 auch stabile Heterodimere bilden, deren physikalische und biologische Eigenschaften sich aus denen der reinen Homodimere zusammensetzten. Heterodimere mit NGF erwiesen sich jedoch als instabil, was dadurch begründet ist, dass die strukturelle Ähnlichkeit zwischen NGF und den anderen Neurotrophinen geringer ist als die zwischen BDNF, NT-3 und NT-4/5 untereinander (Radziejewski & Robinson, 1993; Arakawa *et al.*, 1994). Durch gezielte Aminosäureaustausche in den variablen Regionen des NGF gegen die anderer Neurotrophine ließen sich Chimären bilden, welche Eigenschaften des jeweils anderen Neurotrophins aufwiesen (Ibáñez *et al.*, 1993; Ilag *et al.*, 1994).

1.2 Entdeckung und Struktur von NGF

NGF wurde Anfang der 50er Jahre in Mäusesarkom-Zellen aufgrund seiner Eigenschaft, Neuritenwachstum in den Dorsalwurzelganglien von Hühnerembryonen zu stimulieren, entdeckt

(Abb. 1.2.1). Wenig später wurde er auch in Schlangengift und in den Submaxillardrüsen männlicher Mäuse gefunden (Levi-Montalcini, 1987).

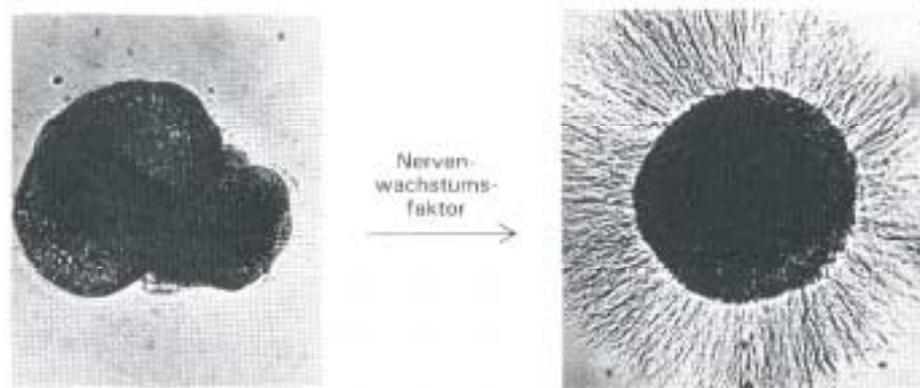


Abb. 1.2.1: Stimulation des Neuritenwachstums in Ganglien nach Inkubation mit NGF (aus: Stryer, 1990).

Reifer, aus Maus-Submaxillardrüsen (s. u.) isolierter NGF ist ein Homodimer mit je 118 Aminosäuren pro Monomer. Jedes Protomer bildet ein viersträngiges, antiparalleles β -Faltblatt aus (Abb. 1.2.2 A) (McDonald *et al.*, 1991). Das Protein besitzt keine α -Helices. Es existieren vier variable *Loop*-Regionen (L1-L4), die an der Rezeptorbindung beteiligt sind. In der Kristallstruktur des murinen NGF sind die Aminosäuren 1-10 des N-Terminus sowie die Aminosäurereste 112-118 des C-Terminus nicht aufgelöst. Diese Regionen sind flexibel und empfindlich gegenüber Proteolyse (Mobley *et al.*, 1976; Moore *et al.*, 1974). Die beiden Monomere sind nicht-kovalent in einer parallelen Orientierung über eine flache, hydrophobe Kontaktfläche von insgesamt 2.332 \AA^2 assoziiert. Jedes Monomer hat eine Abmessung von etwa $60 \times 25 \times 15 \text{ \AA}$ (McDonald *et al.*, 1991). Das Dimer wird hauptsächlich durch starke hydrophobe Wechselwirkungen zusammengehalten, eine Tatsache, die sich in der äußerst geringen Dissoziationskonstante von $\leq 10^{-13} \text{ M}$ bei neutralem pH-Wert widerspiegelt (Bothwell & Shooter, 1977). Reifer humaner NGF (h-NGF) ist homolog zu mu-NGF. Beide unterscheiden sich lediglich in zwölf von 118 Aminosäureresten (Ullrich *et al.*, 1983). Das NGF-Monomer enthält sechs Cysteine, die intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden. Durch die Disulfidbrücken zwischen Cys58 und Cys108 sowie Cys68 und Cys110 wird ein aus 14 Aminosäureresten bestehender Ring ausgebildet, durch welchen die dritte Disulfidbrücke, gebildet von Cys15 und Cys80, hindurchfädelt (Abb. 1.1.2 B). Diese Struktur wird als Cystin-Knoten bezeichnet und findet sich z.B. auch bei den anderen Neurotrophinen, bei den Wachstumsfaktoren der TGF- β -Familie sowie im PDGF-BB (Daopin *et al.*, 1992; Oefner *et al.*, 1992; Übersichtsartikel: McDonald & Hendrickson, 1993). Einige kleine, aus etwa 30 Aminosäuren bestehende Toxine und Protease-Inhibitoren besitzen ebenfalls Cystin-Knoten. Diese unterscheiden sich jedoch topologisch vom Cystin-Knoten des NGF (Pallaghy *et al.*, 1994; Price-Carter *et al.*, 1996; Wentzel *et al.*, 1999).

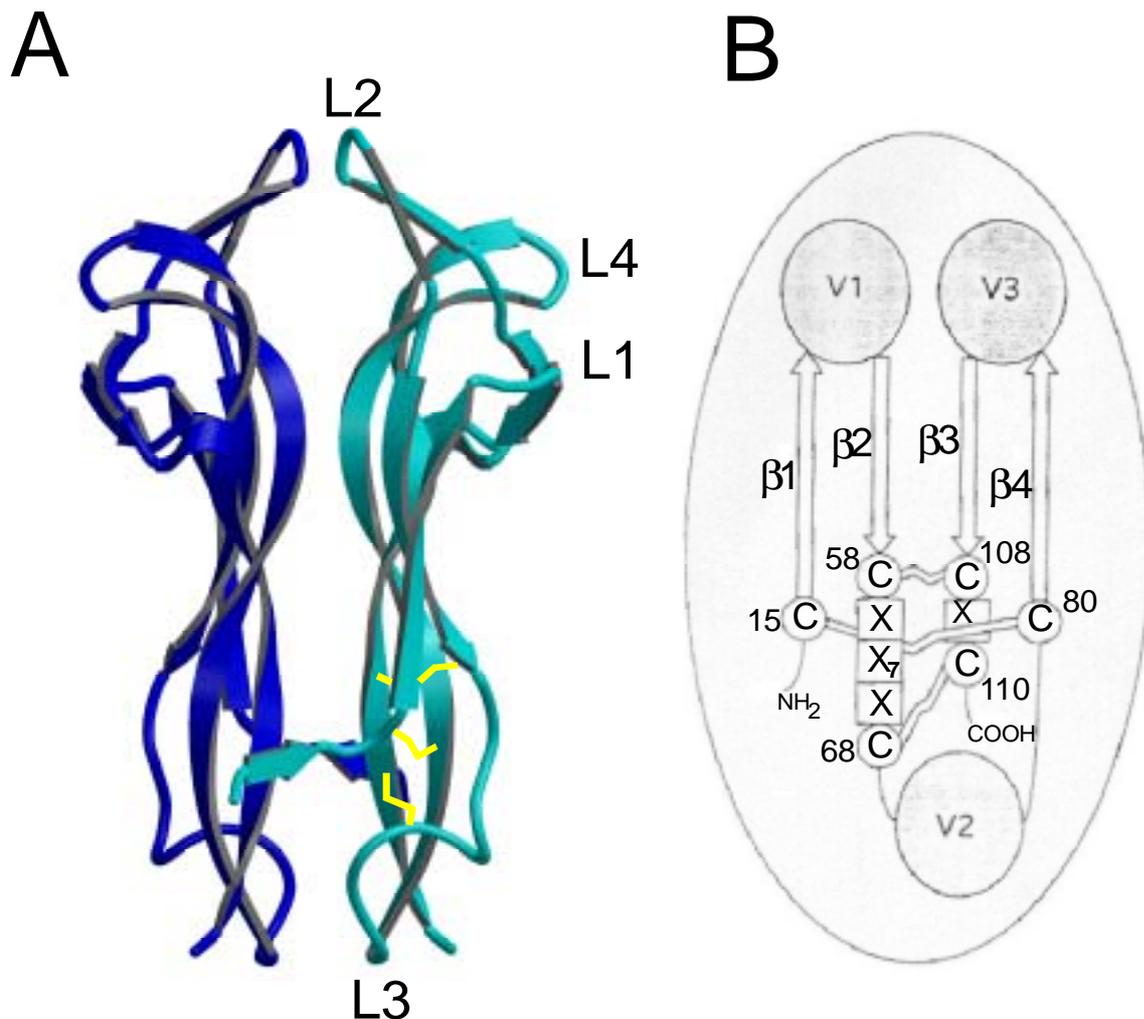


Abb. 1.2.2: (A) Strukturmodell von humanem NGF. Dieses Modell wurde aus den Kristallstruktur-Daten von mu-NGF (McDonald *et al.*, 1991; PDB-Eintrag: 1BET) mithilfe des Programms „InsightII“ (Version 2000) an einem Silicon Graphics Computer „Indigo 2“ berechnet. Die Abbildung wurde mit den Programmen „Molscript“ (Kraulis, 1991) und „Raster3D“ (Merritt & Bacon, 1997) erstellt. Für ein Monomer sind die Disulfidbrücken als gelbe Balken sowie die Numerierung der flexiblen, variablen *Loops* (L1 - L4) eingezeichnet. **(B) Schematische Darstellung des Cystin-Knotens im NGF (modifiziert nach: McDonald & Hendrickson, 1993).** Die disulfidverbrückten Cysteine werden durch je zwei in einem Kreis befindliche „C“ symbolisiert, die durch eine Linie miteinander verbunden sind. Die Zahlen geben die Positionen der Cysteine an. Quadrate mit einem „X“ stellen die Aminosäurereste des Rings im Cystin-Knoten dar. „X₇“ steht für sieben Aminosäurereste. V1 - V3 sind variable Regionen, $\beta 1$ - $\beta 4$ symbolisieren β -Faltblatt-Stränge.

In vivo wird NGF als Prä-Pro-Protein translatiert (Abb. 1.2.3) (Berger & Shooter, 1977; Ullrich *et al.*, 1983). Die 18 Aminosäuren umfassende Prä-Sequenz wird bei der Translokation ins endoplasmatische Retikulum abgespalten. Dort erfolgt die Ausbildung der Disulfidbrücken und N-Glycosylierung an Asn-47 und Asn-8 der 103 Aminosäuren umfassenden NGF-Pro-Sequenz. Die Glycosylierung am Asn-8 scheint für die korrekte Faltung des Proteins im ER wichtig zu sein (Seidah *et al.*, 1996). Durch Mutagenese-Experimente konnte gezeigt werden, dass die Abschnitte Asn-53 bis Arg-27 sowie Asn-8 bis Ser-3 der Pro-Sequenz ausreichen, um korrekt prozessierten, biologisch aktiven NGF zu erhalten (Suter *et al.*, 1991). Pro-NGF wird durch bestimmte Pro-Protein-Konvertasen (Furin und vermutlich auch die Furin-artigen Proteasen PACE4 und

PC5/6-B) im *trans-Golgi Network* prozessiert (Bresnahan *et al.*, 1990; Seidah *et al.*, 1996; Farhadi *et al.*, 1997; Mowla *et al.*, 1999). Unprozessierter Pro-NGF wurde in Präparationen von kommerziell erhältlichem rh-NGF und in Dorsalwurzelganglien von Ratten nachgewiesen. Es wird angenommen, dass das glycosylierte Pro-Hormon Wechselwirkungen zwischen Neuronen und umgebendem Gewebe reguliert (Reinshagen *et al.*, 2000).

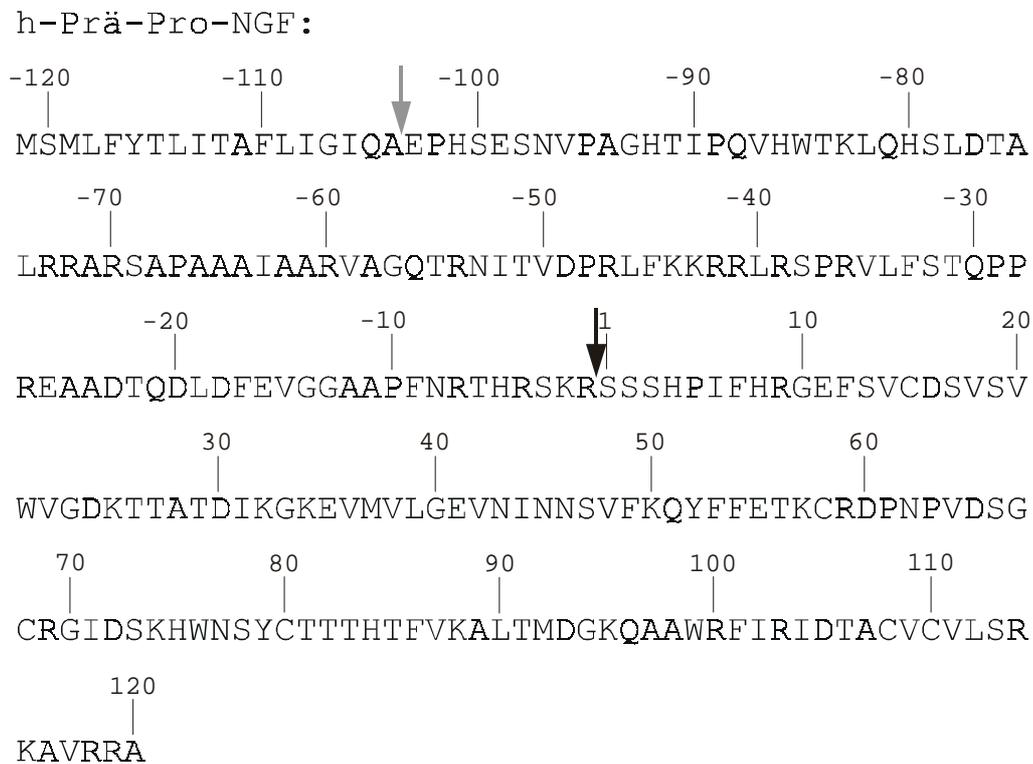


Abb. 1.2.3: Primärstruktur von humanem Prä-Pro-NGF. Die Prozessierungsstelle der Signalpeptidase ist mit einem grauen Pfeil gekennzeichnet. Die Spaltstelle der Furin-Protease ist als schwarzer Pfeil dargestellt. Die letzten beiden Aminosäuren (119 und 120) werden *in vitro* leicht durch Trypsin abgespalten. Reifer rh-NGF mit 118 Aminosäuren pro Monomer besitzt die gleiche biologische Aktivität wie C-terminal unprozessierter rh-NGF mit 120 Aminosäuren (Schmelzer *et al.*, 1992). In dieser Arbeit wurde rh-Pro-NGF untersucht, der 118 Aminosäuren im maturen Teil besaß.

Die Submaxillardrüsen männlicher Mäuse weisen einen hohen Gehalt an NGF auf. Die physiologische Bedeutung hierfür ist unbekannt. In diesem Gewebe liegt das β -NGF-Dimer in einem hochmolekularen 7 S-Komplex von etwa 140 kDa vor (Varon *et al.*, 1967). Dabei ist es mit je zwei Untereinheiten α - und γ -NGF komplexiert, wodurch seine physiologische Wirkung inhibiert wird (Varon *et al.*, 1968; Bax *et al.*, 1997). α - und γ -NGF gehören zur Familie der glandulären Kallikrein-Proteasen. *In vitro* vermag γ -NGF die Pro-Form von β -NGF spezifisch N- und C-terminal zu prozessieren (Edwards *et al.*, 1988). α -NGF liegt in einer inaktiven Zymogen-Form vor. Die Prozessierungsstelle des Proteins ist vermutlich im Laufe der Evolution durch

Mutation verloren gegangen (Isackson & Bradshaw, 1984). In menschlichem Gewebe ließ sich bisher weder α - noch γ -NGF nachweisen.

1.3 Die Neurotrophin-Rezeptoren

Es sind zwei Rezeptoren bekannt, über die NGF seine physiologische Wirkung vermittelt: der hochaffine TrkA-Rezeptor ($K_D \sim 10^{-12}$ M), ein Tyrosin-Kinase-Rezeptor, und der niedrigaffine Neurotrophin-Rezeptor p75 ($p75^{NTR}$; $K_D \sim 10^{-9}$ M), an den alle Neurotrophine zu binden vermögen (Übersichtsartikel: Barbacid, 1994; Dechant & Barde, 1997; Kaplan & Miller, 2000). Auf die Bedeutung der beiden Rezeptorklassen wird weiter unten eingegangen. Durch Deletions-, Mutagenese- sowie *Modelling*-Studien wurden auf der NGF-Oberfläche zwei Bindungsepitope für $p75^{NTR}$ identifiziert (Ibáñez *et al.*, 1992; Urfer *et al.*, 1994; Chapman & Kuntz, 1995). Ein Bereich umfasst positiv geladene Aminosäurereste in den *Loops* L1 und L4, die proximal zur Membran orientiert sind, die andere Region beinhaltet die hochkonservierte Schleife L3 sowie Teile des C-Terminus (Rydén & Ibáñez, 1997; Krüttgen *et al.*, 1997). Die Kristallstruktur von rekombinantem, humanen (rh-NGF) im Komplex mit einer der zwei immunoglobulinartigen Domänen von rh-TrkA (TrkA-d5) wurde kürzlich aufgeklärt (Abb. 1.3.) (Holden *et al.*, 1997; Wiesmann *et al.*, 1999; O'Connell *et al.*, 2000). Die Bindung von NGF an rh-TrkA-d5 reicht aus, um die intrazelluläre Kinase-Domäne des Rezeptors zu aktivieren (Wiesmann *et al.*, 1999). Rh-TrkA-d5 bindet an zwei Regionen der NGF-Oberfläche. Die erste beinhaltet den *Loop* L1 sowie Aminosäurereste der zentralen β -Faltblattstruktur, welche das Rückgrat des NGF-Dimers bildet. Die zweite Region wird von den N-terminalen Resten 2 - 13 ausgebildet, wobei die Aminosäuren 6 - 9 eine helikale Konformation annehmen. Aus Deletions- und Mutagenesestudien war bereits bekannt, dass der N-Terminus und Teile des β -Faltblatt-Rückgrats von NGF an der Rezeptorbindung beteiligt sein müssen (Ibáñez *et al.*, 1992; Kahle *et al.*, 1992; Kullander *et al.*, 1997; Woo & Neet, 1996; Woo *et al.*, 1995). Darüber hinaus sind auch Aminosäurereste in L2 und L4 wichtig für die biologische Aktivität von NGF (Kullander *et al.*, 1997; Woo & Neet, 1996). Wahrscheinlich interagieren diese Schleifen mit Regionen von TrkA, die in der Kristallstruktur nicht berücksichtigt wurden.

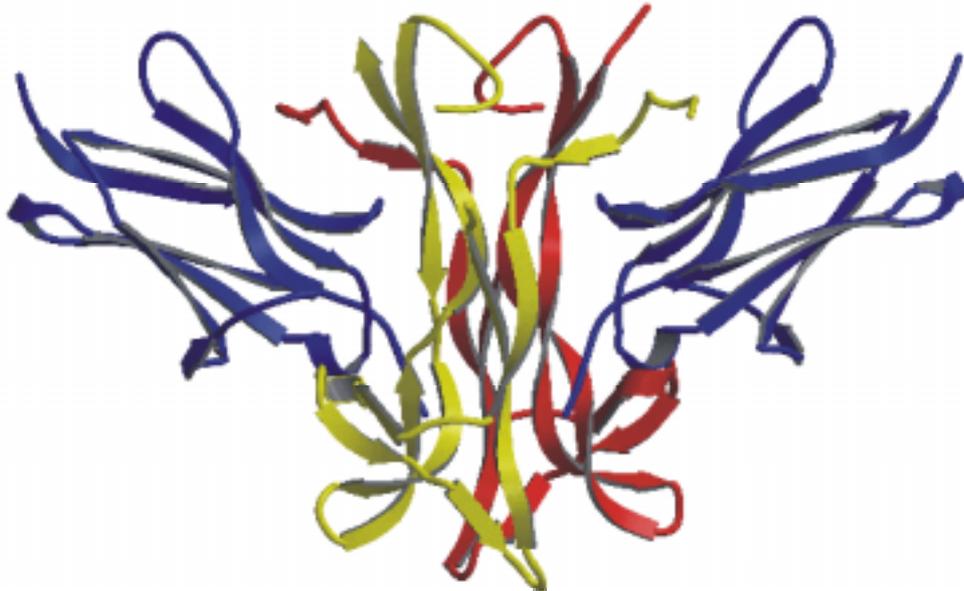


Abb. 1.3: Kristallstruktur des Komplexes von rh-NGF mit der Domäne 5 von rh-TrkA (rh-TrkA-d5) (Wiesmann *et al.*, 1999; PDB-Eintrag: 1www). Die beiden Monomere des rh-NGF sind rot bzw. gelb dargestellt, die beiden rh-TrkA-Domänen blau. Die Abbildung wurde mit den Programmen „Molscript“ (Kraulis, 1991) und „Raster3D“ (Merritt & Bacon, 1997) generiert.

Während die Trk-Rezeptoren Wachstum und Vitalität der Neuronen vermitteln, kann die durch $p75^{\text{NTR}}$ vermittelte Signaltransduktion entweder ebenfalls Neuritenwachstum und Überleben der Neurone bewirken oder aber unter bestimmten Umständen auch zum programmierten Zelltod führen. Die Wirkung der beiden Neurotrophin-Rezeptoren kann sich also entweder verstärken oder neutralisieren. Außerdem gibt es Befunde, die darauf hindeuten, dass $p75^{\text{NTR}}$ direkt mit Trk-Rezeptoren wechselwirkt (Bibel *et al.*, 1999). Bislang wurden drei Mitglieder der Trk-Rezeptorfamilie identifiziert: TrkA, TrkB und TrkC (Klein *et al.*, 1989; Lamballe *et al.*, 1991; Martin-Zanca *et al.*, 1989). TrkA bindet NGF, kann jedoch auch mit NT-3 wechselwirken (Cordon-Cardo *et al.*, 1991; Kaplan *et al.*, 1991; Klein *et al.*, 1991a; Belliveau *et al.*, 1997). TrkB bindet sowohl BDNF als auch NT-3 und NT-4/5 (Berkemeier *et al.*, 1991; Ip *et al.*, 1992; Klein *et al.*, 1991b; Soppet *et al.*, 1991; Urfer *et al.*, 1994). Von TrkB existieren auch verkürzte Formen, denen die cytoplasmatische Tyrosin-Kinase-Domäne fehlt. TrkB in seiner vollen Länge bewirkt nach Aktivierung die Bildung kurzer, proximal zum Zellkörper liegender Neuriten. Ligandenbindung an die verkürzte Isoform T1 ruft Dendritenwachstum in distalen Regionen hervor (Yacoubian & Lo, 2000). TrkC bindet spezifisch NT-3 (Lamballe *et al.*, 1991). Trk-Rezeptoren binden die Neurotrophine über ihre immunoglobulinartigen Domänen (s. oben). Die Kristallstruktur dieser Domänen wurde kürzlich aufgeklärt (Ultsch *et al.*, 1999). Während oder nach Neurotrophin-Bindung erfolgt eine Rezeptor-Dimerisierung, einhergehend mit einer

Autophosphorylierung intrazellulärer Tyrosin-Reste. Auf die wichtigsten Prozesse der daran anschließenden Signaltransduktions-Kaskade soll nun kurz eingegangen werden.

Ein durch Neurotrophine aktiviertes Signal-Protein, welches das Überleben von Neuronen weitervermittelt, ist Ras, ein kleines G-Protein (Borasio *et al.*, 1993; Nobes & Tolkovsky 1995; Vogel *et al.*, 1995). Ras leitet Signale auf verschiedenen Wegen weiter. Zwei dieser Wege, PI-3K (Phosphoinositid-3-Kinase)/Akt (Protein-Kinase B) und MEK (MAP-Kinase-Kinase)/MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*), sind die Haupt-Effektoren der Ras-induzierten Signalketten (Rodriguez-Viciana *et al.*, 1994; Yao & Cooper, 1995; Datta *et al.*, 1997; Holgado-Madruga *et al.*, 1997; Aloyz *et al.*, 1998; Brunet *et al.*, 1999; Korhonen *et al.*, 1999; Riccio *et al.*, 1999; Shen *et al.*, 1999; Wiese *et al.*, 1999; Hetman *et al.*, 2000; Vanhaesebroeck & Alessi, 2000; Übersichtsartikel: Grewal *et al.*, 1999).

Der Rezeptor $p75^{\text{NTR}}$ ist im Gegensatz zu den Trk-Rezeptoren keine Tyrosinkinase. Die extrazelluläre Domäne hat Ähnlichkeit mit Tumor-Nekrosefaktor-Rezeptoren. Unabhängig von Trk-Rezeptoren induziert $p75^{\text{NTR}}$ nach Bindung von Neurotrophinen die Apoptose verschiedener Neurone (Bamji *et al.*, 1998; Davey & Davies, 1998; Soilu-Hanninen *et al.*, 1999). $p75^{\text{NTR}}$ konnte in allen bisher untersuchten Fällen nur dann Apoptose auslösen, wenn die Trk-Rezeptoren entweder fehlten oder inaktiviert waren. Trk-Aktivierung oder -Expression inhibiert die apoptotische Wirkung von $p75^{\text{NTR}}$ (Bamji *et al.*, 1998; Davey & Davies, 1998; Yoon *et al.*, 1998).

Wie wird nun durch $p75^{\text{NTR}}$ Apoptose induziert? Vermutlich können hier verschiedene Signalwege besprochen werden, die noch nicht alle aufgeklärt sind. An einem dieser Wege sind Isoformen der Jun N-terminalen Kinase (JNK) beteiligt. Diese aktivieren den Transkriptionsfaktor c-Jun, der wiederum die Bildung von FasL bewirkt. JNK stimuliert darüber hinaus die Synthese von p53 (Eilers *et al.*, 1998; Le-Niculescu *et al.*, 1999). Diese Signalkaskade kann sowohl nach Aktivierung von $p75^{\text{NTR}}$ durch Neurotrophin-Bindung als auch als Folge von NGF-Entzug besprochen werden. Bei NGF-Entzug kann programmierter Zelltod der Neuronen zusätzlich über die Phosphorylierung des Proteins pRb (gefunden in Retinoblastom-Zellen) erfolgen, einhergehend mit einer verstärkten Bildung von p53 (Le-Niculescu *et al.*, 1999). Die Induktion des programmierten Zelltods durch NGF-Entzug in Nervenzellen wird bei dem so genannten *Dorsal Root Ganglion (DRG) Assay* für die Bestimmung der biologischen Aktivität von NGF genutzt. Dieser *Assay* wird in Kap. 2.2.6 näher beschrieben.

Eine der wesentlichen Schlussfolgerungen, die die letzten Untersuchungen der Neurotrophin-Rezeptoren ergaben, ist, dass die Signalwirkung und biologische Rolle von $p75^{\text{NTR}}$ in engem Zusammenhang mit dem Status der Trk-Aktivierung steht. Ein Trk-Signal vermag Apoptose durch $p75^{\text{NTR}}$ zu unterdrücken, während andere von $p75^{\text{NTR}}$ ausgelöste Signalwege intakt bleiben. Diese „Zwiesprache“ zwischen beiden Rezeptoren scheint darüber hinaus bidirektional zu sein, denn $p75^{\text{NTR}}$ kann umgekehrt bestimmte Trk-Signalwege beeinflussen. So kann $p75^{\text{NTR}}$ in verschiedenen Neuronen durch Bindung von NGF den Transkriptionsfaktor NF- κ B (*Nuclear Factor κ B*) aktivieren. Der über diesen Transkriptionsfaktor beschrittene Signalweg bewirkt das Überleben von Neuronen (Carter *et al.*, 1996; Ladiwala *et al.*, 1998; Kimpinski *et al.*, 1999; Khursigara *et al.*, 1999). Eine weitere biologische Funktion von $p75^{\text{NTR}}$ ist die Regulation des Neuritenwachstums. Der Rezeptor kann die durch TrkA stimulierte Neuritenbildung hemmen, indem der TrkA-abhängige Raf-MEK-MAPK-Signalweg herunterreguliert wird (Kaplan & Miller, 2000). Auf weitere, an der Signaltransduktion beteiligte Faktoren kann an dieser Stelle nicht mehr eingegangen werden. Diese sind aber detailliert in einem aktuellen Übersichtsartikel beschrieben (Kaplan & Miller, 2000). Es wird vermutet, dass in naher Zukunft noch weitere Proteine identifiziert werden, die mit den Neurotrophin-Rezeptoren in Wechselwirkung treten können.

1.4 Rh-NGF als mögliches Therapeutikum zur Behandlung degenerativer Krankheiten des Nervensystems

NGF ist für das Wachstum und Überleben sowohl von sympathischen und sensorischen Neuronen des peripheren Nervensystems (PNS) als auch von cholinergen Neuronen des zentralen Nervensystems (ZNS) notwendig (Levi-Montalcini, 1987; Hefti, 1994). Mögliche therapeutische Indikationen für NGF stellen daher periphere Neuropathien dar, welche z.B. als Nebenwirkung bei Chemotherapien oder als Begleiterscheinung von Diabetes oder AIDS auftreten können (Schaumburg *et al.*, 1992). In Mäusen führte die systemische Verabreichung von NGF zu einer Abnahme sensorischer Neuropathien, hervorgerufen durch Cisplatin und Taxol (Apfel *et al.*, 1991; Apfel *et al.*, 1992). Darüber hinaus scheint die Verabreichung von NGF auch zu einer gesteigerten Expression anderer Neurotrophine zu führen (Apfel & Kessler, 1996). Die positive Wirkung von rh-NGF bei peripheren Neuropathien von Diabetes-Patienten und HIV-Infizierten wurde in klinischen Phase II-Tests bewiesen. Dabei wurde das Neurotrophin sowohl intravenös als auch subkutan verabreicht. Als hauptsächliche Nebenwirkung traten Schmerzen oder Schmerzempfindlichkeit an der Einstichstelle auf, seltener auch Muskelschmerzen bei

Überdosierung (Apfel *et al.*, 1998; Freeman, 1999; McArthur *et al.*, 2000). Die Ergebnisse des ersten Phase III-Tests blieben jedoch hinter den Erwartungen zurück (Levinson, 1999). Die Wirkung von NGF auf eine mögliche Verbesserung bei Patienten mit der Alzheimer'schen Krankheit wurde ebenfalls untersucht (Seiger *et al.*, 1993; Eriksdotter-Jonhagen *et al.*, 1998). Da das Neurotrophin die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden kann, wurde es intraventrikular injiziert. Zwar ließ sich eine gesteigerte Bindung von Nikotin in verschiedenen Hirnregionen feststellen, und in einigen neuropsychologischen Tests zeigten sich leichte Verbesserungen; als Nebenwirkung traten jedoch Rückenschmerzen und Gewichtsverlust auf. Alternative Applikationsformen und/oder eine geringere Dosierung des NGF, eventuell zusammen mit anderen Neurotrophinen, könnten die Nebenwirkungen herabsetzen. Kürzlich konnte erstmals gezeigt werden, dass NGF in Ratten, deren Dorsalwurzeln durchtrennt worden waren, eine selektive Regeneration der Axone und deren Wachstum bis in das Rückenmark hinein bewirkte. (Ramer *et al.*, 2000). Bis dahin wurde stets beobachtet, dass diese Axone ihr Wachstum an der Grenze zum ZNS einstellen. NGF könnte daher in Zukunft ein Therapeutikum zur Regeneration verletzter Dorsalwurzeln und anderer Teile des ZNS darstellen.

1.5 Herstellung von rh-NGF

Für klinische Tests werden große Mengen h-NGF benötigt. NGF kommt jedoch nur in verschwindend geringen Konzentrationen im Gewebe vor: etwa 0,3 ng NGF pro Gramm Gewebeprobe wurden mittels *Immunoassay* im Gehirn von Ratten nachgewiesen (Korsching *et al.*, 1985; Whittemore *et al.*, 1986). Daher kommt für dessen Einsatz als Therapeutikum nur die rekombinante Herstellung in Betracht. Hier bestehen prinzipiell zwei Möglichkeiten: die rekombinante Expression entweder in Zellkultur oder in Bakterien. Eukaryontische Expressionssysteme können das rekombinante Protein zwar posttranslational modifizieren und korrekt prozessieren; sie liefern jedoch nur sehr geringe Proteinmengen und sind verhältnismäßig teuer (Barnett *et al.*, 1991; Schmelzer *et al.*, 1992; Edwards & Rutter, 1997). Im Gegensatz dazu werden mit prokaryontischen Expressionssystemen große Mengen des Proteins erhalten. Bakterien können Vorläuferproteine jedoch nicht prozessieren. Außerdem kann im reduzierenden Milieu des bakteriellen Cytosols normalerweise keine Ausbildung von Disulfidbrücken erfolgen. Die Produktion von rh-NGF führt in Prokaryonten, wie häufig bei der Expression von rekombinanten Säugergenen, zum biologisch inaktiven Translationsprodukt, welches dann in Form von Aggregaten als sogenannte Einschlusskörper oder *Inclusion Bodies* (IBs) in der Zelle abgelagert wird. Diese müssen dann unter geeigneten Bedingungen renaturiert werden (Rudolph & Lilie, 1996; Rudolph *et al.*, 1997; De Bernardez-Clark *et al.*, 1999). Dazu

werden die Aggregate zunächst in hohen Konzentrationen eines geeigneten Denaturierungsmittels solubilisiert (z.B. 6 M GdmCl oder 8 M Harnstoff) und während der Isolierung zufällig gebildete Disulfidbrücken mit Thiolreagenzien wie DTT (Dithiothreitol), DTE (Dithioerythritol) oder β -Mercaptoethanol reduziert. Die Renaturierung erfolgt anschließend in einem optimierten Faltungspuffer. Die Ausbildung der nativen Disulfidbrücken wird durch Zusatz eines *Oxido Shuffling*-Systems erreicht. Dies besteht aus einem Thiol und seinem entsprechenden Disulfid, also z.B. reduziertes und oxidiertes Glutathion (GSH und GSSG), Cystein und Cystin oder Cysteamin und Cystamin (Ahmed *et al.*, 1975; Rudolph *et al.*, 1997). Da das Thiolat-Anion die reagierende Spezies ist, sollte die Renaturierung im alkalischen Milieu (pH 8 - 9) erfolgen. Der Mechanismus der Disulfidbrückenbildung ist in Abb. 1.5 dargestellt. Die Renaturierungsausbeute von reifem rh-NGF aus IBs ist selbst unter optimierten Bedingungen äußerst gering (s. auch Kap. 3.1.3.8). Die Ursache hierfür ist in der Aggregationsanfälligkeit der Faltungsintermediate zu suchen.

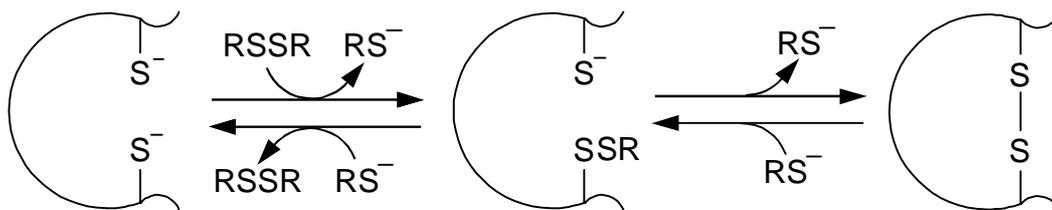
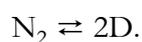


Abb. 1.5: Mechanismus der Disulfidbrückenbildung in Proteinen in Anwesenheit von Disulfidreagenzien (nach: Rudolph *et al.*, 1997). RSSR: Disulfidkomponente (z.B. oxidiertes Glutathion), RS^- : reduzierte Komponente (z.B. reduziertes Glutathion). Die Schlangenlinie stellt schematisch die Peptidkette des Proteins dar. Die „S“ symbolisieren die Thiolate zweier Cysteine. Eines davon bildet nun mit der zugesetzten Disulfidkomponente ein gemischtes Disulfid (-SSR). Dieses kann schließlich mit dem zweiten Cysteinrest eine intramolekulare Disulfidbrücke ausbilden (-S-S-). Die Reaktion kann auch in der Rückrichtung ablaufen. Dies macht man sich beispielsweise zunutze, wenn man reduziertes Protein für Faltungsexperimente benötigt. Die Reaktion läuft nur ab, wenn die Thiole deprotoniert vorliegen, also im alkalischen Milieu.

1.6 Die langsame Entfaltung von NGF

Die Entfaltung von oxidiertem NGF in Gegenwart von GdmCl wurde Anfang der 90er Jahre von Timm und Mitarbeitern als Zwei-Zustandsmodell beschrieben, in dem sich natives Dimer N_2 und denaturiertes Monomer D im Gleichgewicht befinden. Natives Monomer lässt sich nicht beobachten (Timm & Neet, 1992; Timm *et al.*, 1994):



Gl. 1.1

Unter bestimmten Bedingungen zeigt NGF jedoch eine langsame Re- bzw. Denaturierungskinetik. Dies ist ein Hinweis dafür, dass die Faltung und Entfaltung des Proteins tatsächlich komplizierter als ursprünglich angenommen sein muss (Timm & Neet, 1992; Timm *et al.*, 1994). Für die Neurotrophine NT-3 und BDNF wird Ähnliches beobachtet (Radziejewski *et al.*, 1992; Timm *et al.*, 1994). Für mu-NGF wurde beschrieben, dass die Entfaltung nach 1 min bei 25°C in 4 M GdmCl abgeschlossen ist, und sich das Protein nach 24 h bei 25°C vollständig reversibel wieder renaturieren lässt (Radziejewski *et al.*, 1992; Timm & Neet, 1992; Timm *et al.*, 1994). De- bzw. Renaturierung bei GdmCl-Konzentrationen zwischen 2 und 4 M hingegen dauert bei 20-22°C bis zu 24 bzw. 72 h (Timm & Neet, 1992). Die langsame Entfaltung der Neurotrophine, insbesondere von rh-NGF, wurde von De Young und Mitarbeitern näher untersucht (De Young *et al.*, 1996; De Young *et al.*, 1999). Die Autoren beobachteten, dass rh-NGF in Gegenwart von 5 M GdmCl praktisch sofort monomerisiert und seine Sekundärstruktur fast vollständig verliert. Aus diesem Zustand (M1) kann das Monomer jedoch bei längerer Inkubation langsam in einen zweiten, denaturierten Zustand M2 übergehen:



Dabei zeigte sich, dass bei den bisher publizierten Daten vermutlich lediglich die erste schnelle Entfaltungsreaktion der Neurotrophine zum ersten Intermediat M1 erfasst wurde, und die Kinetik des langsamen Entfaltungsschritts erst nach deutlich längeren Inkubationszeiten in Denaturierungsmittel untersucht werden kann. Die Autoren analysierten die Entfaltung des rh-NGF mit einer Reihe verschiedener Techniken wie RP-HPLC- und SEC-*Double Jump*-Experimenten (De Young *et al.*, 1996). Dabei beobachteten sie des Weiteren, dass die Denaturierung N-terminal verkürzter Mutanten deutlich schneller ablief. Außerdem betrug die Aktivierungsenergie der Entfaltung des intakten rh-NGF 26-27 kcal/mol, die kaum signifikant höher war als die typischen Aktivierungsenergien von 18-22 kcal/mol für eine Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung von Modellpeptiden (Schmid & Baldwin, 1979). Trotzdem schlossen die Autoren als Ursache für die langsame Entfaltung des rh-NGF Prolyl-Isomerisierung aus und stellten die so genannte „*Loop Threading*“-Hypothese auf. Diese postuliert als Grund für die langsame Denaturierung von rh-NGF das Durchfädeln des N-Terminus durch den Peptid-Ring im Cystin-Knoten (Abb. 1.6).

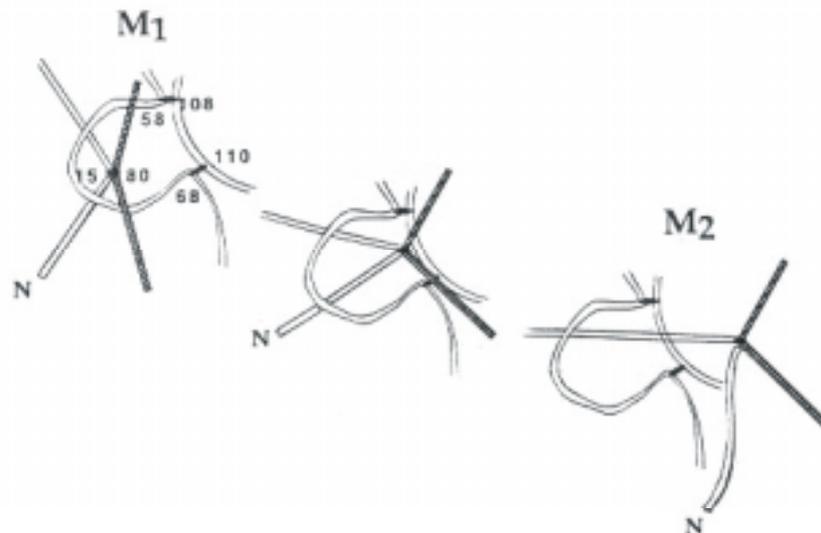


Abb. 1.6: Schematische Darstellung des „Loop Threading“-Mechanismus als mögliche Ursache für die langsame Entfaltung von rh-NGF (aus: De Young *et al.*, 1999). Die Zahlen geben die Positionen der Cysteine im Cystin-Knoten an. Der N-Terminus ist durch den Buchstaben „N“ gekennzeichnet. Zur besseren Übersichtlichkeit ist das Peptid-Rückgrat N- und C-terminal vom Cys80 schattiert dargestellt.

1.7 Die Pro-Sequenz-vermittelte Faltung von Proteinen

Anfang der 70er Jahre postulierte Anfinsen aus seinen Untersuchungen zur Renaturierung von RNase A, dass Proteine sich selbst organisierende Moleküle sind, die keine zusätzlichen Faktoren benötigen, um in ihre biologisch aktive Konformation zu falten (Anfinsen, 1973). Die Existenz von monomeren Proteinen, die nicht spontan in ihre native Form renaturieren können, wurde erstmals 1987 mit Subtilisin E gezeigt, einer Protease aus *Bacillus subtilis* (Ikemura *et al.*, 1987). Hier und bei einer Vielzahl weiterer Proteasen wie z.B. α -Lytischer Protease aus *Lysobacter enzymogenes* (Silen & Agard, 1989) und Carboxypeptidase Y aus *Saccharomyces cerevisiae* (Winther & Sørensen, 1991) wird die Bildung des aktiven Enzyms durch das Pro-Peptid katalysiert (Baker *et al.*, 1992; Eder *et al.*, 1993). Anschließend wird das Pro-Peptid entweder intramolekular oder intermolekular abgespalten (Li & Inouye, 1996; Marie-Claire *et al.*, 1998). In Abwesenheit der Pro-Sequenz falten die Proteasen in einen inaktiven, teilweise gefalteten Zustand. Dieses Intermediat kann durch Zugabe stöchiometrischer Mengen des jeweiligen Pro-Peptids in die aktive Form übergehen (Baker *et al.*, 1992; Eder *et al.*, 1993; Winther *et al.*, 1994). Für α -Lytische Protease wurde gezeigt, dass das Intermediat sogar thermodynamisch stabiler ist als das aktive Protein. Letzteres ist durch eine hohe Energiebarriere von dem intermediären Zustand getrennt und damit metastabil (Sohl *et al.*, 1998). Zusätzlich haben die Pro-Sequenzen von Proteasen auch eine regulatorische Funktion: sie stellen spezifische Inhibitoren ihrer jeweiligen Protease dar, deren Dissoziationskonstanten etwa 10^{-7} bis 10^{-11} M betragen (Ohta *et al.*, 1991; Winther & Sørensen, 1991; Fusek *et al.*, 1991; Baker *et al.*, 1992; Fox *et al.*, 1992). Das gebundene Pro-Peptid

wird später von der aktivierten Protease proteolytisch abgebaut. Aufgrund ihrer Eigenschaft als spezifische Faltungshelfer werden diese Pro-Sequenzen als „intramolekulare Chaperone“ bezeichnet, um sie von den unspezifischen molekularen Chaperonen wie z.B. GroE und Hsp70 zu unterscheiden (Inouye, 1991). Es konnte sogar gezeigt werden, dass eine Mutation in der Pro-Sequenz des Subtilisin E (I-48V) zwar zu einer aktiven, reifen Protease führt. Deren strukturelle Eigenschaften und Aktivität unterscheiden sich jedoch vom Wildtyp. Diese Beobachtung zeigt, dass ein identisches Polypeptid aufgrund einer Mutation im Pro-Peptid verschiedene Konformationen annehmen kann. Dieses Phänomen wird *Protein Memory* genannt (Shinde *et al.*, 1997).

Neben NGF und verschiedenen Proteasen existieren noch eine Vielzahl weiterer Proteine, deren Faltung und Sekretion durch die Pro-Sequenzen vermittelt werden. Dies sind z.B. die humane Myeloperoxidase (Andersson *et al.*, 1998), TGF- β 1 und Activin A (Gray & Mason, 1990) sowie humanes BMP-2 (Hillger, 1999). Beim Von-Willebrand-Faktor vermittelt das Pro-Peptid die Disulfidverbrückung und die Bildung der Multimere (Wise *et al.*, 1988; Voorberg *et al.*, 1990). Beim Insulin sorgt das C-Peptid zwischen der A- und der B-Kette für eine korrekte Faltung und Ausbildung der Disulfidbrücken (Steiner & Clark, 1968). Das C-Peptid scheint im Übrigen neben seiner Rolle als Faltungshelfer auch noch eine weitere Funktion zu besitzen, denn für dieses Peptid wurde auch biologische Aktivität nachgewiesen (Ido *et al.*, 1997). In einem Diabetes-Rattenmodell bewirkte das C-Peptid eine Erhöhung der Na-K-ATPase-Aktivität sowie eine Verbesserung des Blutflusses. Im Falle des Trypsin-Inhibitors aus Rinderpankreas (BPTI) stellt das Pro-Peptid mit seinem Cysteinrest ein intramolekulares Thiol-Disulfid-Reagenz dar, welches die Disulfidbrücken-Bildung des reifen Teils beschleunigt (Weissman & Kim, 1992). Die Pro-Sequenz von Barnase aus *Bacillus amyloliquefaciens* hingegen scheint keine Rolle bei der Faltung des Proteins zu spielen. Die Aufgabe des unstrukturierten Pro-Peptids besteht vermutlich darin, für eine Wechselwirkung mit der Transportmaschinerie der Zelle zu sorgen, indem es zusätzliche Bindungsstellen für molekulare Chaperone liefert (Gray *et al.*, 1993).

Viele Pro-Peptide können ihre Wirkung auch *in trans* entfalten, d.h. es ist keine kovalente Bindung zwischen ihnen und dem reifen Teil nötig. Dies wurde insbesondere für Proteasen nachgewiesen (z.B. Subtilisin E (Zhu *et al.*, 1989), α -Lytische Protease (Silen & Agard, 1989), Carboxypeptidase Y (Winther *et al.*, 1994) und Thermolysin aus *Bacillus thermoproteolyticus* (Marie-Claire *et al.*, 1999)). Aber auch andere Proteine ließen sich *in trans* falten und prozessieren, so z.B. Activin A und TGF- β 1 (Gray & Mason, 1990) und Von-Willebrand-Faktor (Wise *et al.*, 1988). Interessanterweise existiert eine Lipase aus *Pseudomonas cepacia* DSM 3959, die ein für sie

spezifisches, durch ein eigenes Gen codiertes Chaperon (*limA*) besitzt. Dieses Gen ist auf dem Chromosom vom Gen für die (Prä-)Lipase (*lipA*) nur drei Basen entfernt. Man geht davon aus, dass beide Gene aus einem gemeinsamen Gen hervorgegangen sind, welches im Verlauf der Evolution in zwei Gene aufgespalten wurde (Hobson *et al.*, 1993).

1.8 Problemstellung und Ziele dieser Arbeit

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Bemühungen unternommen, biologisch aktiven, reifen rh-NGF aus *Inclusion Body*-Material herzustellen. Die Faltungsausbeuten waren jedoch stets äußerst gering. *In vivo*-Experimente zeigten, dass Teile der Pro-Sequenz für eine korrekte Faltung und Prozessierung wichtig sind (s. Kap. 1.2). Daher sollte die *in vitro*-Faltung des Pro-Proteins untersucht werden. Zunächst sollte die für rh-Pro-NGF codierende DNA mit einem geeigneten Expressionssystem in *E. coli* überexprimiert und das *Inclusion Body*-Material anschließend unter optimierten Bedingungen renaturiert werden. Die physikalisch-chemischen Eigenschaften und die biologische Aktivität des nativen rh-Pro-NGF sollten danach näher untersucht sowie dessen oligomerer Zustand charakterisiert werden. Aus renaturiertem rh-Pro-NGF sollte darüber hinaus *in vitro* mit einer Protease geeigneter Substratspezifität reifer, biologisch aktiver rh-NGF hergestellt werden.

Ein weiterer Schwerpunkt sollte ein Vergleich der Renaturierung von rh-NGF und rh-Pro-NGF darstellen. Falls in Anwesenheit der kovalent gebundenen Pro-Sequenz tatsächlich die Faltungsausbeute von NGF erhöht ist, sollten disulfidverbrückte Intermediate von rh-NGF und rh-Pro-NGF mittels Massenspektrometrie identifiziert werden. Ein Vergleich der Faltungsintermediate könnte dann vielleicht Aufschluss darüber geben, warum die Strukturbildung von rh-NGF in hohem Maße ineffizient erfolgt. Darüber hinaus sollte die Bedeutung der NGF-Pro-Sequenz näher untersucht werden. Immerhin ist es mit einer Länge von 103 Aminosäuren fast genauso groß wie das reife h-NGF-Monomer (118 Aminosäurereste). Dazu sollte das Pro-Peptid ebenfalls aus *E. coli* gewonnen und charakterisiert werden. Falls die Pro-Sequenz in der Tat die Faltung des reifen NGF vermittelt, sollte die Renaturierung des murenen rh-NGF auch *in trans*, d.h. in Anwesenheit des nicht-kovalent gebundenen Pro-Peptids, untersucht werden.

Im letzten Teil der Arbeit sollten die Geschwindigkeitskonstanten der langsamen Faltung von korrekt disulfidverbrücktem rh-NGF und rh-Pro-NGF miteinander verglichen werden. Für rh-NGF sind überraschend langsame De- und Renaturierungskinetiken beschrieben worden (De

Young *et al.*, 1996). Als molekulare Ursache hierfür wurde ein „*Loop Threading*“-Mechanismus postuliert (s. Kap. 1.6). Nach dieser Hypothese müsste die Pro-Sequenz aufgrund ihrer Länge und möglicherweise ihrer Struktur signifikant Einfluss auf die Geschwindigkeit der Faltung von rh-Pro-NGF im Vergleich zu rh-NGF nehmen. Ein Vergleich der Faltung von oxidiertem rh-NGF und rh-Pro-NGF sollte es daher ermöglichen, die „*Loop Threading*“-Hypothese zu überprüfen. Darüber hinaus sollte als eine andere mögliche Ursache für die langsame Faltung von rh-NGF die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung in Betracht gezogen werden. Aus diesem Grund sollte die Faltungsgeschwindigkeit dieses Proteins auch in Anwesenheit verschiedener PPIasen untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Acrylamid-Lösung („Rotiphorese“; 30 % (w/v)	
Acrylamid, 0,8 % (w/v) Bisacrylamid in Wasser	Roth (Karlsruhe)
Ampicillin, Natriumsalz	Sigma (St. Louis, MO, USA)
L-Arginin	Ajinomoto (Tokio, Japan)
Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs)	Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)
5,5'-Dithio-bis-(2-dithionitrobenzoat) (DTNB)	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Glutathion (oxidiert)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Glutathion (reduziert)	AppliChem (Darmstadt)
Guanidinium Hydrochlorid, <i>C-Grade</i> (GdmCl)	Nigu Chemie (Waldkraiburg)
Guanidinium Hydrochlorid, <i>ultra pure</i> (GdmCl)	AppliChem (Darmstadt)
Harnstoff	ICN (Aurora, OH, USA)
Hefeextrakt	Difco/Becton Dickinson (Sparks, MD, USA)
Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG)	AppliChem (Darmstadt)
Kanamycinsulfat	Fluka (Buchs, Schweiz)
Mineralöl für die PCR	Sigma (St. Louis, MO, USA)
<i>Repel Silane</i> ES (Dimethyldichlorsilan (2 % (w/v), in Octamethylcyclotetrasiloxan)	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth (Karlsruhe)
Trypton	Difco/Becton Dickinson (Sparks, MD, USA)

Alle anderen hier nicht aufgeführten Chemikalien stammten von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Fluka (Buchs, Schweiz), ICN (Aurora, OH, USA), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (St. Louis, MO, USA) und hatten den Reinheitsgrad p.a. Zur Herstellung von Puffern und Lösungen wurde bidestilliertes Wasser verwendet.

2.1.2 Standards und Kits

1 kb DNA-Leiter	Gibco BRL (Paisley, UK)
100 bp DNA-Leiter	Gibco BRL (Paisley, UK)
<i>DNA Sequencing Kit</i> „LC SequiTherm Excel II“	Epicentre Technologies (Madison, WI, USA)
<i>LMW Electrophoresis Calibration Kit</i>	Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)
<i>LMW Gel Filtration Calibration Kit</i>	Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)
<i>Protein Assay</i> nach Bradford	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
<i>Protein LMW Marker</i>	Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)
Protein 10 kDa-Leiter	Gibco BRL (Paisley, UK)
„Qiaprep“ („Spin“- und „Midiprep“)	Qiagen (Hilden)
„SequaGel XR“ und „SequaGel <i>Complete Buffer Reagent</i> “, für DNA-Sequenziergele	National Diagnostics (Atlanta, GA, USA)
„Wizard“ PCR „Preps“	Promega (Madison, WI, USA)

2.1.3 Enzyme und andere Proteine

Albumin (aus Rinderserum)	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Alkalische Phosphatase (aus Rind)	Roche Diagnostics (Mannheim)
<i>BamH I</i> (aus <i>Bacillus amyloliquefaciens H</i>)	Roche Diagnostics (Mannheim)
DNase I (aus Rinderpankreas)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Insulin (aus Rinderpankreas)	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Lysozym (aus Hühnereiweiß)	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Myoglobin (aus Pferdeherz)	Sigma (St. Louis, MO, USA)
<i>Nde I</i> (aus <i>Neisseria dentrificans</i> NRCC 31009)	Roche Diagnostics (Mannheim)
NGF (human, rekombinant aus <i>E. coli</i>)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Pfu-DNA-Polymerase	
(kloniert, aus <i>Pyrococcus furiosus</i> DSM 3638)	Stratagene (La Jolla, CA, USA)
RNase (aus Rinderpankreas)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Subtilisin	Sigma (St. Louis, MO, USA)
T4-DNA-Ligase (aus lysogenem λ NM 989)	Gibco BRL (Paisley, UK)

(Fortsetzung nächste Seite)

Taq-DNA-Polymerase (aus <i>Thermus aquaticus</i> YT1)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Trypsin (aus Rinderpankreas)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Trypsin-Inhibitor (aus Sojabohnen)	Sigma (St. Louis, MO, USA)

2.1.4 Sonstiges Material

Dialyseschläuche

(Ausschlussgröße 6.000 - 8.000 Da) Spectra/Por (Rancho Dominguez, CA, USA)

PVDF-Membran Bio-Rad (Hercules, CA, USA)

Rundfilter (0,025 µm, für Tropfendialysen) Millipore (Bedford, MA, USA)

Rundfilter (0,45 µm, zur Puffer-Filtration) Sigma (St. Louis, MO, USA)

Sterilfilter (0,2 und 0,45 µm) Renner (Dannstadt)

2.1.5 Geräte

Hier nicht aufgelistete Messgeräte werden im Methodenteil beschrieben.

Absorptionsspektrophotometer

DU-7400 Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA)

Ultrospec 3000 Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)

Chromatographieeinheiten

ÄKTA Explorer mit Pumpe P-900, UV-Monitor UV-900, Fraktionskollektor Frac-900, pH- und Leitfähigkeitsmonitor pH/C-900; Steuer- und Auswertungssoftware: „Unicorn“ Version 3.10.11 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)

HiLoad mit Pumpe P-50; *Programmer* GP-250 Plus, UV-Monitor UV-MII, Fraktionskollektor Super Frac, Schreiber Rec 102 und *Conductivity Monitor* (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)

Pumpe P-1 zum Auftragen größerer Probevolumina (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)

DNA-Sequenzierer

Model 4000 mit „BaseImagIR“ Steuer- und Auswertungssoftware V.4 (Li-Cor, Lincoln, NE, USA)

Gelelektrophoreseapparaturen

Agarose-Gelelektrophoresekammern: Eigenbau der mechanischen Werkstatt der LMU München

SDS-Gelelektrophoresekammern: Eigenbau der mechanischen Werkstatt der LMU München

Kryostaten

Wasserbad C25, Thermostat F6 (Haake, Karlsruhe); E10 (Prüfgeräte-Werk Medingen GmbH, Dresden); F34 und F25 (Julabo, Seelbach); WK100 (Colora, Lorch)

Pipetten

Research 10, 20, 100, 200, 1000 und 5000 µl (Eppendorf, Hamburg)

Rührer

Ikamag RH (Janke & Kunkel, Staufen)

MR 1000 und MR 3001 (Heidolph, Kelheim)

Spannungsgeräte

EPS 600 und EPS 3500 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)

Schüttler

Orbitalsbaker: Polymax 2040 (Heidolph, Kelheim)

Schüttelinkubatoren: VKS-75 Control und SM-30 (Edmund Bühler, Hechingen); HT (Infors, Bottmingen, Schweiz); Innova 4300 (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA)

Thermocycler

Omn-E (Hybaid, Heidelberg)

Personal Cycler (Biometra, Göttingen)

Thermomixer

Thermomixer compact, comfort und 5436 (Eppendorf, Hamburg)

Vakuum-Konzentratoren

RC 1010 mit Kühlfalle RCT 60 (Jouan, Saint Herblain, Frankreich)

Speed Vac Plus SC110A mit Kühlfalle RVT 400 (Savant Instruments, Farmingdale, NY, USA)

Waagen

Analytical Standard A560 (Ohaus, Gießen)

FA-1500-1 (Faust, Köln)

Zentrifugen

Avanti J-20 und J-25; Rotoren: JLA-8.1000, Ja-25.50 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)

Biofuge pico und Biofuge fresco (Heraeus, Hanau)

Centrifuge 5415C (Eppendorf, Hamburg)

Sorvall RC 5C Plus; Rotoren: SLA-3000, SLA-1500, SS-34 (Kendro Laboratory Products, Hanau)

Sonstige Geräte

Autoklaven: Varioklav

H+P Labortechnik (Oberschleißheim)

Brutschrank

Memmert (Schwabach)

Eismaschine: AF20

Scotsman (Vernon Hills, IL, USA)

Elektroporationsgerät: Gene Pulser II

Bio-Rad (Hercules, CA, USA)

Elektroporationsküvetten

(Elektrodenabstand: 0,1 und 0,2 cm)

Bio-Rad (Hercules, CA, USA)

Küvetten

Hellma (Müllheim)

Metallblock-Thermostat:

Stuart Scientific (Redhill, Surrey, UK)

Mixer Vortex Genie 2

Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)

pH-Meter: WTW 526

Wissenschaftlich-Technische Werkstätten
(Weilheim)

Refraktometer

Carl Zeiss (Jena)

Sterilbank: Hera Safe

Heraeus (Hanau)

Tiefkühlschrank

GFL (Burgwedel)

Ultraturrax: T25

Janke & Kunkel (Staufen)

UV-Lampe

Faust (Köln)

UV-Transilluminator

Biotec-Fischer (Reiskirchen)

Vakuumpumpe

Saskia (Ilmenau)

Zell-Homogenisator: Gaulin Micron Lab 40

APV Homogeniser (Lübeck)

2.1.6 *E. coli*-Stämme und Plasmide

Stämme

E. coli XL1-Blue (Stratagene, La Jolla, CA, USA): *rec A1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1* [F' *proAB lacI^qZΔM15 Tn 10* (Tet^r)],

E. coli BL21(DE3) (Novagen, Madison, WI, USA): *E. coli* B F⁻ *dcm ompT hsdS*(r_B⁻m_B) *gal λ*(DE3).

Der Stamm *E. coli* XL1-Blue wurde zur Vermehrung von Plasmid-DNA verwendet. Die Endonuklease-Defizienz (*endA1*) verbessert die Qualität isolierter Miniprep-DNA. Die Rekombinations-Defizienz (*recA*) vermittelt Insert-Stabilität. Die *hsdR*-Mutation verhindert die Spaltung klonierter DNA durch das *EcoK*-Endonuklease-System. Das *lacI^qZΔM15*-Gen auf dem F'-Episom erlaubt ein „Blau-Weiß-Screening“ rekombinanter Plasmide.

E. coli BL21(DE3) diente zur Überexpression rekombinanter Gene und enthält eine chromosomale Kopie des Gens für die T7-RNA-Polymerase. Der Stamm besitzt den lysogenen Bakteriophagen DE3, einen Abkömmling des Phagen Lambda. DE3 enthält ein DNA-Fragment mit dem *lacI^q*-Gen, dem *lacUV5*-Promotor und dem Gen für die T7-RNA-Polymerase (Studier & Moffatt, 1986). Dieses Fragment wurde in das *int*-Gen des *E. coli*-Chromosoms inseriert. Auf diese Weise wurde verhindert, dass DE3 ohne Helferphagen ins *E. coli*-Chromosom integriert oder excisiert werden kann. Das Gen für die T7-RNA-Polymerase steht unter der Kontrolle des *lacUV5*-Promotors, welcher durch IPTG induzierbar ist. Die nach Induktion synthetisierte T7-RNA-Polymerase transkribiert Ziel-Gene, die unter Kontrolle des T7-Promotors stehen. Ein weiterer Vorteil von *E. coli* B-Stämmen ist, dass bei ihnen die für die Proteasen *lon* und *ompT* codierenden Gene deletiert sind. Diese Proteasen können Proteine während der Aufreinigung abbauen (Grodberg & Dunn, 1988).

Plasmide

pMGL-SIG-proNGF	Roche Diagnostics (Mannheim)
pET11a	Novagen (Madison, WI, USA)
pET19b	Novagen (Madison, WI, USA)
pUBS520	Roche Diagnostics (Mannheim; Brinkmann <i>et al.</i> 1989)
pET11a-Pro-NGF	Ergebnis dieser Arbeit
pET11a-NGF-Pro-Peptid	Ergebnis dieser Arbeit
pET19b-NGF-Pro-Peptid	Ergebnis dieser Arbeit

Als Expressionsvektoren wurden pET11a und pET19b verwendet. Diese Plasmide enthalten das Gen für den Lactoserepressor *lacI^q*, welcher die Expression des T7-RNA-Polymerase-Gens unterdrückt. Durch Zugabe von IPTG zum Medium wird die Repression des Gens für die T7-RNA-Polymerase aufgehoben. Die in die multiple Klonierungsstelle der pET-Vektoren integrierten Gene stehen unter der Kontrolle des T7-Promotors. Der T7-Terminator bildet auf RNA-Ebene eine Haarnadel-Struktur aus, die eine Ablösung der T7-RNA-Polymerase von der DNA-Matrize bewirkt.

2.1.7 Oligodesoxynukleotide

Oligodesoxynukleotide

Alle Primer wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen und waren HPLC-gereinigt.

Primer für PCR-Reaktion:

FwPro-NGF (Sinn): 5'-CGG AAT TCC ATA TGG AAC CAC ACT CAG AGA GC-3'

RevNGF (Gegensinn): 5'-CCG GAT CCT TAT CAT CTC ACA GCC TTT CTA GA-3'

RevPro-Peptid (Gegensinn): 5'-CCG GAT CCT TAC CGC TTG CTC CTG TGA GTC C-3'

Primer für DNA-Sequenzierung:

Die Primer waren am 5'-Ende mit dem Farbstoff IRD41 markiert, welcher im Infrarot fluoresziert.

TLT7 (T7-Promotor-Primer): 5'-CGA AAT TAA TAC GAC TCA C-3'

RevT7 (T7-Terminator-Primer): 5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG GTG G-3'

2.1.8 Medien, Antibiotika und Puffer

2.1.8.1 Medien

<u>LB-Medium:</u>	10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl
<u>LB-Agar:</u>	LB-Medium mit zusätzlich 15 g/l Agar Agar
<u>SOB-Medium:</u>	20 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl.
<u>SOC-Medium (100 ml):</u>	98 ml SOB-Medium; 1 ml Magnesium-Stammlösung (1 M MgCl ₂ ; 1 M MgSO ₄); 1 ml 40 % (w/v) Glucose.
<u>2xYT:</u>	17 g/l Trypton; 10 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl

Die Medien wurden mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und sofort nach Herstellung autoklaviert. Nach Erkalten auf Raumtemperatur wurden nach Bedarf Antibiotika zugegeben.

2.1.8.2 Antibiotika

Ampicillin-Stammlösung: 100 mg/ml in Wasser

Kanamycin-Stammlösung: 50 mg/ml in Wasser

Die Antibiotika wurden nach Herstellung steril filtriert und bei -20°C gelagert. Bei Gebrauch wurden sie 1 : 1000 in die Medien verdünnt.

2.1.8.3 Puffer

Stammlösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, in Wasser gelöst.

Puffer für alkalische Phosphatase (10x): 500 mM Tris/HCl, pH 9,0; 10 mM MgCl₂; 1 mM ZnCl₂; 10 mM Spermidin.

DNA-Agarosegele: 0,8 – 2 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer.

DNA-Probenpuffer (5x): 10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 150 mM EDTA; 30 % (v/v) Glycerin; 0,25 % (w/v) Bromphenolblau.

DNA-„Quickprep“-Puffer: 10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 60 % (v/v) Glycerin; 0,25 % (m/v) Bromphenolblau.

DNA-Sequenziergel (6 % (w/v) Acrylamid; 41 cm Länge; 0,25 mm Dicke): 30 ml „SequaGel XR“ *Complete Buffer Reagent*; 7,5 ml „SequaGel“ Acrylamidlösung; 400 µl DMSO; 300 µl APS (10 % (v/v)). Die Lösung wurde vor dem Auftrag filtriert.

Entfärber für Proteingele: 40 % (v/v) EtOH; 10 % (v/v) Eisessig.

Färber für Proteingele: 40 % (v/v) EtOH; 10 % (v/v) Eisessig; 0,1 % (w/v) Coomassie R250.

Geltrocknungslösung (SDS-PAGE): 10 % (v/v) Methanol; 3 % (v/v) Glycerin.

HIC-Puffer A: 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0; 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 mM EDTA.

IB-Aufschlusspuffer: 100 mM Tris/HCl, pH 7; 1 mM EDTA.

IB-Dialysepuffer: 6 M GdmCl, pH 4; 10 mM EDTA.

IB-Solubilisierungspuffer: 100 mM Tris/HCl, pH 8,0; 6 M GdmCl; 10 mM EDTA; 100 mM DTT.

IB-Tritonpuffer: 60 mM EDTA; 6 % (v/v) Triton X-100; 1,5 M NaCl.

IB-Waschpuffer: 100 mM Tris/HCl, pH 7,0; 20 mM EDTA.

IEX-Puffer A: 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0; 1 mM EDTA.

IEX-Puffer B: 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0; 1 M NaCl; 1 mM EDTA.

IMAC-Puffer A: 6 M GdmCl; 50 mM Natriumphosphat, pH 8,0; 10 mM Imidazol.

IMAC-Puffer B: 6 M GdmCl; 50 mM Natriumphosphat, pH 8,0; 500 mM Imidazol.

Laufpuffer für native PAGE: 43 mM Imidazol; 35 mM Hepes pH 7,4.

Laufpuffer für SDS-PAGE (10x): 250 mM Tris/HCl, pH 8,3; 1,87 M Glycin; 1 % (w/v) SDS.

Probenpuffer für native PAGE (2x): 100 mM Natriumphosphat, pH 6,5; 20 % (v/v) Glycerin.

Probenpuffer für SDS-PAGE (2x): 100 mM Tris/HCl, pH 8; 4,8 % (w/v) SDS; 16 % (v/v) Glycerin; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau; 2 % (v/v) 2-Mercaptoethanol (frisch zugeben).

Sammelgelpuffer für SDS-PAGE (4x): 500 mM Tris/HCl, pH 6,8; 0,4 % (w/v) SDS.

Sammelgel (6 % (w/v) Acrylamid) für SDS-PAGE: 1 ml „Rotiphorese“-Acrylamid-Lösung; 1,25 ml Sammelgelpuffer; 2,75 ml H₂O; 20 µl TEMED; 60 µl APS.

STET-Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 0,1 % (v/v) Triton X-100; 8% (w/v) Sucrose; 50 mM EDTA.

Trenngelpuffer für SDS-PAGE (4x): 3 M Tris/HCl, pH 8,85; 0,4 % (w/v) SDS.

Trenngel (11 % (w/v) Acrylamid) für native PAGE: 7,7 ml „Rotiphorese“-Acrylamid-Lösung, 13,3 ml Laufpuffer für native PAGE, 32 µl TEMED, 100 µl APS.

Trenngel (15% (w/v) Acrylamid) für SDS-PAGE: 7,5 ml „Rotiphorese“-Acrylamid-Lösung; 3,75 ml Trenngelpuffer; 3,75 ml H₂O; je 60 µl TEMED und APS.

TAE-Puffer (50x): 2 M Tris; 1 M Essigsäure; 100 mM EDTA (Natriumsalz) ad pH 8,5.

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA.

Western Blotting Puffer (für Proteinsequenzierung): 50 mM Natriumborat, pH 9,0; 20 % (v/v) Methanol.

2.2 Methoden

2.2.1 Gentechnische Methoden

2.2.1.1 Herstellung elektrokompenter *E. coli*-Zellen (XL1-Blue, BL21(DE3) und BL21(DE3)/pUBS520)

Zwei Erlenmeyerkolben mit gleichen Volumina LB-Medium wurden im Volumenverhältnis 1 : 100 mit einer Übernacht-Kultur steril angeimpft. Kultur 1 diente zur Herstellung der elektrokompenten Zellen, mit Kultur 2 wurde die OD bei 600 nm verfolgt. Im Falle von BL21(DE3)/pUBS520 wurde mit Kanamycin ein Selektionsdruck für das Pasmid pUBS520 aufrechterhalten. Die Zellen wurden bei 37°C und 150 rpm geschüttelt. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 in der Kultur 2 wurde Kultur 1 für 30 min auf Eis gestellt und anschließend 15 min bei 4°C und 5.000 rpm in GS3-Zentrifugenbechern abzentrifugiert. Die Zellen wurden nacheinander mit je 100 %, 50 % und 10 % des ursprünglichen Volumens sterilem Glycerin (10 % (v/v) in Wasser) gewaschen. Beim letzten Waschschrift wurden sie in kleinere (SS34) Zentrifugenbecher überführt. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Zellpellet in 0,1 % Volumen 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert und zu je 40 µl in sterile Reaktionsgefäße aliquotiert. Diese wurden bei -70°C eingefroren und gelagert.

2.2.1.2 Transformation von *E. coli*-Zellen durch Elektroporation (Dower, 1990)

40 µl elektrokompente Zellen wurden auf Eis mit 10 - 500 ng Plasmid-DNA bzw. 8 - 10 µl Ligationsansatz vermischt und in eine bei -20°C vorgekühlte Elektroporationsküvette transferiert. Es wurden folgende Einstellungen am Elektroporationsgerät verwendet:

Spannung:	1,8 kV (Elektrodenabstand 0,1 cm), 2,5 kV (Elektrodenabstand 0,2 cm),
Widerstand:	200 Ω (<i>E. coli</i> XL1-Blue), 400 Ω (<i>E. coli</i> BL21(DE3)),
Kapazität:	25 µF.

Die Transformanten wurden sofort in 1 ml vortemperiertem (37°C) SOC-Medium ohne Antibiotikum resuspendiert und 30 - 60 min bei 37°C geschüttelt. Danach wurden die Transformanten 1/10 und 9/10 auf LB-Agarplatten mit dem jeweiligen Antibiotikum ausplattiert. Die Agarplatten wurden über Nacht (16 - 18 h) bei 37°C inkubiert.

2.2.1.3 Kultivierung und Konservierung von *E. coli*-Stämmen

Für Übernacht-Kulturen wurden 3 - 50 ml LB-Medium mit dem jeweiligen Antibiotikum mit einer Einzelkolonie oder mit einer Glycerinkultur angeimpft. Die Kulturen wurden 16 - 18 h bei 37°C und 150 rpm geschüttelt. Zur Herstellung von Glycerin-Kulturen wurde 1 ml Übernacht-Kultur mit 250 µl sterilem Glycerin vermischt und die Suspension in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Glycerin-Kulturen wurden anschließend bei -70°C gelagert.

2.2.1.4 Schnelles Plasmid-Screening („Quickpreps“)

Diese Methode wurde bei der Suche nach positiven Klonen, d.h. Transformanten, welche Plasmide mit dem gewünschten Insert enthielten, verwendet. Dazu wurden die Zellen mit Phenol-Chloroform lysiert, wobei auch gleichzeitig alle Proteine quantitativ ausgefällt wurden. Die Gesamtzell-DNA sowie -RNA blieben in Lösung. 100 µl Übernachtskultur wurden mit 50 µl Phenol-Chloroform-Gemisch (1 : 1 (m/v)) und 10 µl DNA-„Quickprep“-Puffer versetzt, 10 s kräftig durchmischt und danach 3 min bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Von der blauen, wässrigen Phase wurden 20 - 30 µl auf ein 0,8%iges Agarosegel aufgetragen.

2.2.1.5 Plasmid-Isolierung

2.2.1.5.1 CTAB-Methode (Del Sal *et al.*, 1989)

Mit dieser Vorschrift wurde Plasmid-DNA für Kontroll-Restriktionen gewonnen. Das Detergens Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) bildet bei einer NaCl-Konzentration < 0,6 M mit Nukleinsäuren bei Raumtemperatur schwerlösliche Komplexe, die sich durch Zentrifugation isolieren lassen. Die DNA lässt sich dann unter Hochsalz-Bedingungen (1,2 M NaCl) wieder in Lösung bringen. Chromosomale DNA wird zusammen mit den Zellproteinen im Lysis-Schritt sedimentiert. 1,5 ml Übernachtskultur wurden zweimal je 3 min bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 300 µl STET-Puffer resuspendiert und mit 10 µg RNase sowie 6 µg Lysozym versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT wurde der Ansatz 45 s bei 95°C im Thermoblock erhitzt und 5 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Dann wurde das Pellet mit einem Zahnstocher entfernt und der Überstand mit 12 µl 5%iger (w/v) CTAB-Lösung (bei 37°C lösen) versetzt. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 13.000 rpm) wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 400 µl 1,2 M NaCl-Lösung aufgenommen. Der Ansatz wurde 15 min bei 50°C im Thermomixer geschüttelt und danach auf Eis mit 1 ml kaltem 100 % Ethanol gefällt. Die Plasmid-DNA wurde 5 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert, nochmals mit 1 ml kaltem 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und bei 50°C getrocknet. Das Pellet wurde in 20 µl sterilem Wasser gelöst.

2.2.1.5.2 Isolierung mit dem *Spin-* oder *Midiprep-Kit* von Qiagen („Qiaprep“)

Die „Qiaprep“-Methode der Plasmid-Isolierung beruht auf einer alkalischen Lyse der *E. coli*-Zellen mit anschließender Adsorption der DNA an eine Silikat-Matrix in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen (Vogelstein & Gillespie, 1979; Birnboim & Doly, 1979). Für die *Spinprep*-Methode wurden 10 ml Übernachtskultur verwendet. Sie lieferte bis zu 7,5 µg Plasmid-DNA. Größere Mengen Plasmid (bis zu 60 µg) wurden mit der *Midiprep*-Methode gewonnen. Hierfür wurden 100 ml Übernachtskultur verwendet.

2.2.1.6 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von Plasmid-DNA für Transformationen und Sequenzierungen wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Dabei entspricht eine Absorption von 1 etwa einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Zusätzlich wurde die Absorption bei 280 nm bestimmt, um eventuelle Verunreinigungen durch Proteine zu detektieren. Das Absorptionsverhältnis $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ beträgt für reine dsDNA 1,8 - 2,0. Parallel zur Absorptionsmessung wurde die DNA-Konzentration auch durch Anfärben mit Ethidiumbromid nach Agarose-Gelelektrophorese anhand der Markerbanden bekannter DNA-Konzentration abgeschätzt.

2.2.1.7 Agarose-Gelelektrophorese

Für „Quickpreps“, Plasmidisolierungen und Restriktionsansätze wurden 0,8 - 1%ige (w/v) Agarosegele in TAE-Puffer hergestellt. Kleinere DNA-Fragmente und Produkte aus PCR-Reaktionen wurden mittels 2%iger (w/v) Gele analysiert. Die Proben wurden in TAE-Puffer bei 80 - 150 V für 50 - 120 min aufgetrennt und die DNA anschließend durch Anfärben mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid-Lösung sichtbar gemacht.

2.2.1.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR; nach Mullis & Faloona, 1987)

Für die Amplifikation der cDNA von rh-Pro-NGF wurden 2 ng *Template*-DNA (Plasmid pMGL-SIG-proNGF, Roche Diagnostics, Mannheim), je 50 pmol Primer FwPro-NGF und RevNGF, je 0,2 mM dNTPs, 1 µl DMSO und 10 µl 10x-Taq-Puffer mit sterilem Wasser auf 95 µl aufgefüllt. Zum Schluss wurden 5 U Taq-Polymerase (5 µl) ad 100 µl Gesamtvolumen zugegeben. Der Ansatz wurde mit Mineralöl überschichtet. Die Reaktionsbedingungen wurden folgendermaßen gewählt:

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
1. Denaturierung	94°C	45 s
2. Denaturierung	94°C	45 s
3. Hybridisierung	65°C	45 s
4. DNA-Synthese	72°C	1,5 min
5. 29 × 2.		
6. DNA-Synthese	72°C	10 min

Tab. 2.2.1.8.1: Programmparameter der PCR zur Vermehrung der rh-Pro-NGF-cDNA.

Nach Ende der Reaktion wurde der Ansatz langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

Zur Herstellung von NGF-Pro-Peptid-cDNA wurden 2 ng des Vektors pET11a-Pro-NGF als Matrize sowie je 25 pmol Primer FwPro-NGF und RevPro-Peptid verwendet. Des Weiteren wurden je 0,1 mM dNTPs, 0,5 µl DMSO und 5 µl 10x Pfu-Puffer zugegeben und mit sterilem Wasser auf 49,5 µl aufgefüllt. Zum Schluss wurden 2,5 U (0,5 µl) Pfu-Polymerase ad 50 µl Gesamtvolumen zugegeben. Der Ansatz wurde mit Mineralöl überschichtet und folgende Programmparameter gewählt:

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
1. Denaturierung	96°C	3 min
2. Denaturierung	94°C	1 min
3. Hybridisierung	50°C	2 min
4. DNA-Synthese	72°C	3 min
5. 24 × 2.		
6. DNA-Synthese	72°C	10 min

Tab. 2.2.1.8.2: Programmparameter der PCR zur Vermehrung der für das rh-NGF-Pro-Peptid codierenden DNA.

2.2.1.9 Aufreinigung von PCR-Produkten und geschnittener DNA

Zur Abtrennung von Enzymen, überschüssigen Primern und Nukleotiden wurden PCR-Produkte und geschnittene Inserts bzw. Vektoren mit dem „Wizard“-Kit von Promega gereinigt. Hierbei wird die DNA, ähnlich wie bei der „Qiaprep“-Methode, an ein Silikat-Harz adsorbiert. PCR-Produkte wurden aus dem Agarosegel eluiert, Restriktionsansätze direkt eingesetzt. Für die Reinigung wurde gemäß der Vorschrift des Herstellers vorgegangen. Die Adsorption der DNA an das Harz erfolgte bei 0°C, die abschließende Elution wurde mit 65°C warmem Wasser durchgeführt.

2.2.1.10 Enzymatische Spaltung von PCR-Produkten und Plasmiden

Für die Spaltung von DNA wurden 0,1 - 1 U/ μ l Restriktionsenzym in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer verwendet. Die Reaktionsansätze wurden 2 - 16 h bei 37°C inkubiert. Im Falle von *Nde* I, welches bei 37°C eine Halbwertszeit von etwa 15 min besitzt (Perry-O'Keefe & Kissinger, 1995), wurden jede Stunde erneut 10 U (1 μ l) des Enzyms zugegeben. Die Reaktionsdauer betrug in diesem Falle 6 h, das Endvolumen 105 μ l (ausgehend von 100 μ l).

2.2.1.11 Behandlung geschnittener Vektoren mit alkalischer Phosphatase

Geschnittene, gefällte Vektoren wurden in 44 μ l sterilem H₂O gelöst. Dann wurden 5 μ l 10-fach Puffer des Herstellers sowie 1 U (1 μ l) alkalische Phosphatase zugegeben. Der Ansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert, dann nochmals mit 1 U Enzym versetzt und weitere 30 min inkubiert. Anschließend wurden 40 μ l H₂O, 10 μ l STE-Puffer (10x) sowie 5 μ l 10% (w/v) SDS zugegeben und 15 min bei 68°C erwärmt, um das Enzym zu inaktivieren. Die DNA wurde anschließend mit dem „Wizard“-Kit gereinigt.

2.2.1.12 Ligierung von DNA-Fragmenten

Für Ligationen wurden geschnittener Vektor (pET11a bzw. pET19b) und Insert in einem molaren Verhältnis von etwa 5 - 10 : 1 in Ligase-Puffer verdünnt. Danach wurden 2 U T4-Ligase ad 20 μ l Gesamtvolumen zugegeben. Die Ansätze wurden 16 h bei 14°C inkubiert und anschließend 30 - 60 min tropfendialysiert. Hierfür wurde auf eine mit sterilem Wasser gefüllte Petrischale ein Ultrafilter (0,025 μ m, Millipore (Bedford, MA, USA)) gelegt. Auf diesen wurde der Ligationsansatz pipettiert. Durch die Tropfendialyse wurden Salze entfernt, die bei der Elektroporation zu Kurzschlüssen führen können. 8 - 10 μ l des Dialysats wurden für die Elektroporation eingesetzt.

2.2.1.13 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruchmethode von Sanger (Sanger *et al.*, 1977) mittels *Cycle Sequencing* (Krishnan *et al.*, 1991). Hierbei wurden die Didesoxynukleotide statistisch durch PCR eingebaut. Die Sequenzier-Reaktion wurde mit dem „SequiTherm EXCEL Long-Read DNA Sequencing Kit“ (Epicentre Technologies, Madison, WI, USA) gemäß der Herstellervorschrift in einer 96-Well-Mikrotiterplatte angesetzt. Es wurden 2 pmol Fluoreszenzmarkierter Primer und 600 - 800 fmol Plasmid verwendet. Die Ansätze wurden mit flüssigem Wachs überschichtet. Die Reaktionsbedingungen für die PCR-Reaktion sind in Tab. 2.2.1.13 aufgelistet.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
1. Denaturierung	95°C	5 min
2. Denaturierung	95°C	30 s
3. Hybridisierung	52°C (Primer TLT7) 63°C (Primer RevT7)	15 s
4. DNA-Synthese	70°C	1 min
5. 29×2.		

Tab. 2.2.1.13: *Cycle Sequencing-Programmparameter.*

Die Reaktion wurde mit 3 μ l *Stop/Loading Buffer* gestoppt. Das Sequenzier-Gel wurde ca. 40 min vorlaufen gelassen, die Proben 5 min auf 70°C erwärmt und danach aufgetragen. Die Sequenzierung wurde mittels kontinuierlicher Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt (Brumbaugh *et al.*, 1987). Die Sequenzanalyse erfolgte durch die „BaseIMagIR“-Software (Version 4.0) und anschließendes *Alignment* mit dem Programm „MACAW“ (Version 2.0.5, *National Center for Biotechnology Information, NCBI*).

2.2.2 Allgemeine proteinchemische Methoden

2.2.2.1 Anzucht von *E. coli*

Zur Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli* wurden 4 × 1 l 2×YT-Medium in 5 l-Erlenmeyerkolben mit dem jeweiligen Antibiotikum 1 : 100 bis 1 : 50 mit einer Übernachtskultur angeimpft. Die Kulturen wurden bei 37°C und 100 rpm geschüttelt. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,8 wurden die Zellen mit 1 mM IPTG (für die Produktion von rekombinantem NGF-Propeptid) bzw. 3 mM IPTG (für die Gewinnung von rh-Pro-NGF) induziert. Nach 3 - 4 h Induktionsdauer wurden die Zellen 15 min bei 5.000 rpm geerntet (Sorvall SLA-3.000- oder Beckman JLA-8.1000-Rotor) und die Zellfeuchtmasse bestimmt. Die Produktion rekombinanten Proteins wurde unmittelbar vor der Induktion und danach in stündlichen Abständen überprüft. Dazu wurden je 1 ml der Zellsuspension abzentrifugiert und die Pellets mit 50 μ l Laemmli-Puffer ad OD₆₀₀ = 1 für 5 min aufgekocht. Anschließend wurden die Proben 3 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert und 10 - 20 μ l der Überstände auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

2.2.2.2 IB-Präparation (Rudolph *et al.*, 1997)

Die Zellpellets wurden in 5 ml IB-Auflschlusspuffer je Gramm Feuchtmassenzelle resuspendiert. Dann wurden 1,5 mg Lysozym je Gramm Zellpellet zugegeben, 30 min bei 4°C inkubiert und die Suspension anschließend zweimal mit dem Zellhomogenisator (Druck: 1.000 - 1.200 bar)

aufgeschlossen. Danach wurden 3 mM MgCl₂ und 10 µg/ml DNase I zugegeben, um bakterielle DNA abzubauen. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei RT wurden 0,5 Volumenanteile IB-Tritonpuffer zugegeben und weitere 30 min bei 4°C inkubiert, um Membranbestandteile aufzulösen. Die Einschlusskörper wurden 10 min bei 4°C bei 20.000 rpm (SS34-Rotor) abzentrifugiert und danach noch viermal mit je 40 ml IB-Waschpuffer gewaschen. Das IB-Pellet wurde bei -20°C gelagert.

2.2.2.3 IB-Solubilisierung (Rudolph *et al.*, 1997)

400 mg feuchtes IB-Pellet wurden in 2 ml Solubilisierungspuffer resuspendiert und 2 h bei RT inkubiert. Der pH-Wert wurde dann mit 1 M HCl auf 3 bis 4 gesenkt, um eine zufällige Oxidation der Cysteine zu Disulfidbrücken unter denaturierenden Bedingungen zu unterdrücken. Unlösliche Zellbestandteile wurden anschließend in der Tischzentrifuge 30 min bei 13.000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Danach wurde das DTT durch zweimalige Dialyse gegen je 500 ml IB-Dialysepuffer für 2 h bei RT und anschließend ein drittes Mal bei 7°C über Nacht (ca. 16 h) entfernt. Alternativ dazu wurde überschüssiges DTT mit einer PD10-Säule (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) abgetrennt, die vorher mit IB-Dialysepuffer gemäß der Herstellervorschrift äquilibriert worden war. Die Proteinkonzentration wurde nach der Bradford-Methode (s. Kap. 2.2.2.5.1) bestimmt (Bradford, 1976). Das IB-Solubilisat wurde entweder sofort für die Renaturierung eingesetzt oder bei -70°C eingefroren.

2.2.2.4 Bestimmung freier SH-Gruppen (Habeeb, 1972)

Es wurden jeweils zwei Testansätze (Proteinvolumen 1 ml) pipettiert: 50 - 350 µg Protein/ml Probenpuffer + 30 µl DTNB-Lösung bzw. 30 µl Probenpuffer. Als Leerwert diente 1 ml Probenpuffer ohne Protein + 30 µl DTNB-Lösung. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei RT wurde die Absorption bei 410 nm bestimmt ($\epsilon_{410} = 13.600 \text{ l}/(\text{mol} \times \text{cm})$). Aus der korrigierten Absorption bei 410 nm wurde die molare Konzentration an freien Thiolgruppen berechnet. Diese Konzentration wurde dann durch die Proteinkonzentration dividiert. Daraus ergab sich die Anzahl freier SH-Gruppen pro Proteinmolekül.

2.2.2.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

2.2.2.5.1 Bestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)

Diese Methode wurde für die Konzentrationsbestimmung von IB-Solubilisaten verwendet. Das Prinzip dieser Analytik beruht auf der Bildung eines blauen Komplexes aus Coomassie Brilliant Blue G-250 und Proteinen mit einer Masse >3.000 Da bei pH 0 bis 1 ($\lambda_{\text{max}} = 595 \text{ nm}$;

$\epsilon_{595} = 47.000 \text{ l}/(\text{mol} \times \text{cm})$). Der Farbstoff bindet hauptsächlich an basische Aminosäure-Reste. Die Proteinbestimmungen wurden mit dem fertigen, fünffach konzentrierten *Protein Assay Reagent* der Firma Bio-Rad durchgeführt. Dieses enthält den Farbstoff, Phosphorsäure sowie Methanol in Wasser. Bei jeder Bestimmung wurde stets eine Eichkurve mit BSA (Fraktion V) erstellt (Dreifachbestimmung; 1 - 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA-Endkonzentration in der Küvette). Das IB-Solubilisat wurde im *Assay* 1 : 1.000 – 1 : 10.000 verdünnt, die Absorption bei 595 nm gemessen. Letztere sollte 5 - 60 min nach Ansetzen der Proben erfolgen, da nach einer Stunde Präzipitatbildung einsetzt.

2.2.2.5.2 Bestimmung durch Messung der UV-Absorption

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von gereinigtem rh-Pro-NGF bzw. rh-NGF-Pro-Peptid erfolgte durch Messung der Absorption bei 280 nm. Die Extinktionskoeffizienten berechnen sich folgendermaßen aus den Einzelkoeffizienten von Tryptophanen, Tyrosinen und Disulfidbrücken (Gill & von Hippel, 1989):

Protein	$\epsilon_{280,ox} \text{ [l}/(\text{mol} \times \text{cm})]$	$\epsilon_{280,red} \text{ [l}/(\text{mol} \times \text{cm})]$
rh-NGF	39.980 (Dimer)	19.630 (Monomer)
rh-Pro-NGF	51.360 (Dimer)	25.320 (Monomer)
rh-NGF-Pro-Peptid	5.690	-

Tab. 2.2.2.5.2: Molare Extinktionskoeffizienten der verwendeten Proteine.

Es wurde stets ein UV-Absorptionsspektrum im Bereich von 240 - 340 nm aufgenommen, um mögliche Verunreinigungen durch DNA oder Aggregate identifizieren zu können. Letztere rufen aufgrund von Lichtstreuung eine Absorption bei Wellenlängen $>300 \text{ nm}$ hervor.

2.2.2.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (King & Laemmli, 1971; Laemmli, 1970) wurde mit 6%igen (w/v) Sammel- und 15%igen (w/v) Trenngelen (Abmessung: 10 cm \times 14 cm \times 1 mm) durchgeführt. Die Proben wurden 5 min bei 95°C im Probenpuffer erhitzt, 3 min bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge abzentrifugiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophoresedauer betrug 2,5 h bei 150 V. Als Standards wurden entweder die 10 kDa-Leiter (Gibco BRL, Paisley, UK) oder der *LMW Marker* von Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden verwendet (mit α -Lactalbumin aus Kuhmilch (14,4 kDa), Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen (20,1 kDa), Carboanhydrase aus Rinder-Erythrozyten (20 kDa), Ovalbumin aus Hühnereiweiß (43 kDa), Albumin aus Rinderserum (67 kDa) und Phosphorylase B aus Kaninchen-Muskel (94 kDa)).

2.2.2.6.1 Färbung mit Coomassie R250

Die Gele wurden 0,5 - 2 h gefärbt und anschließend über mehrere Stunden entfärbt. Die Nachweisgrenze dieser Färbung beträgt etwa 0,2 - 0,5 µg Protein/mm² Gel.

2.2.2.6.2 Silberfärbung (Nesterenko *et al.*, 1994)

Mit dieser Methode lassen sich noch 0,05 - 0,1 µg Protein/mm² Gel detektieren. Die Gele wurden zunächst 5 min in 100 ml 50 % (v/v) Aceton, 1,5 ml 50 % (w/v) TCA und 42 µl 37 % (w/v) Formaldehyd fixiert. Dann wurde mehrmals mit Wasser gewaschen (3 × 5 s, 1 × 5 min, 3 × 5 s) und anschließend 5 min in 50 % (v/v) Aceton inkubiert. Danach wurden die Gele in 0,016 % (w/v) Na₂S₂O₃ × 5 H₂O für 1 min vorbehandelt und anschließend wieder dreimal kurz mit Wasser gespült. Dann wurde mit 0,25 % (w/v) Silbernitratlösung; 0,37 % (w/v) Formaldehyd für 8 min imprägniert und zweimal kurz mit Wasser gespült. Schließlich wurden die Gele 10 - 20 s mit 2 % (w/v) Natriumcarbonat; 0,015 % (w/v) Formaldehyd und 0,004 % (w/v) Na₂S₂O₃ × 5 H₂O entwickelt und die Reaktion mit 1 % (w/v) Essigsäure gestoppt.

2.2.2.7 Proteinfällung mit Natriumdesoxycholat (Arnold & Ulbrich-Hofmann, 1999)

Stark verdünnte Protein-Proben oder solche, die hohe Konzentrationen an GdmCl oder anderen Salzen enthielten, mussten vor dem Auftrag auf das SDS-Polyacrylamid-Gel gefällt werden. Die Proben wurden mit 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0; 1 mM EDTA auf ein Gesamtvolumen von 990 µl gebracht. Dann wurden 10 µl 10 % (w/v) Natriumdesoxycholat in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 zugegeben und gut durchmischt. Anschließend wurden die Proteine durch Zugabe von 200 µl 50 % (w/v) TCA gefällt. Nach 15 min Inkubationszeit bei RT wurden die Pellets 15 min bei 13.000 rpm und 4°C in der Tischzentrifuge sedimentiert, die Überstände verworfen und die Niederschläge in 1 ml Aceton resuspendiert. Nach 15 min bei -20°C wurden die Proben nochmals abzentrifugiert, die Überstände abgenommen und gefälltes Protein in 20 - 30 µl Laemmli-Puffer gelöst.

2.2.2.8 Western-Blot

Zur Analyse einzelner Proteinbanden der SDS-Polyacrylamidgele mittels N-terminaler Sequenzierung wurde das Protein nach der SDS-PAGE auf eine PVDF-Membran geblottet. Dazu wurde die Membran zunächst 3 x 10 s in reinem Methanol gewaschen und anschließend 3 - 5 min im Transferpuffer äquilibriert. Das Western-Blotting wurde im *Semi Dry*-Verfahren bei konstanter Stromstärke von 1 mA/cm² über eine Dauer von 5 h durchgeführt. Die Blots wurden

2 - 5 s mit Coomassie R250 gefärbt und der Hintergrund anschließend mit 40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure entfärbt.

2.2.2.9 N-terminale Proteinsequenzierung

Die N-terminale Sequenzierung wurde freundlicherweise von Dr. Peter Rücknagel (MPG Halle) durchgeführt. Die zu analysierenden Banden wurden aus der Membran ausgeschnitten. Die auf den Membranstückchen befindlichen Proteine wurden anschließend abgelöst und die Proben mit einem LC-10A RP-HPLC-System der Firma Shimadzu (Kyoto, Japan) mit einer Nucleosil 500-5 C3-PPn-Säule (Macherey & Nagel, Düren) entsalzt. Die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz nach Edman (Edman & Begg, 1967) erfolgte mittels eines 476 A Gasphasen-Sequenzers der Firma Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).

2.2.2.10 Massenspektrometrie

Die Molekulargewichtsbestimmung der gereinigten, entsalzten Proteinproben mittels Massenspektrometrie wurden freundlicherweise von Dr. Angelika Schierhorn (Universität Halle) durchgeführt. Die MALDI-TOF-Massenspektren wurden mit einem Reflex-Spektrometer (Bruker-Franzen Analytik GmbH, Bremen) aufgenommen. Dazu wurden die Proben in eine Sinapinsäure-Matrix eingebettet. ESI-Massenspektren wurden mit einem VG Bio-Q Tripel-Quadrupol Massenspektrometer (Fisons Instruments, Manchester, UK) aufgenommen.

2.2.2.11 Aufkonzentrierung von Proteinlösungen

Verdünnte Lösungen von Proteinen wurden mit zwei verschiedenen Methoden aufkonzentriert. Große Volumina (>500 ml) wurden mittels einer *Cross-Flow*-Filtrationsanlage mit „Miniset“-Filter (Ausschlussgröße der Poren: 8 kDa) (Pall Filtron, Northborough, MA, USA) auf ein Volumen von etwa 50 ml aufkonzentriert, kleinere Volumina (bis 100 ml) wurden in Dialyseschläuche überführt, in PEG 35.000 eingebettet und bis zum gewünschten Endvolumen bei 7°C eingengt.

2.2.2.12 Analytische Gelfiltration

Der oligomere Zustand der Proteine bzw. mögliche Wechselwirkungen zwischen reifem rh-NGF und rh-NGF-Pro-Peptid wurden unter anderem mittels analytischer Gelfiltration charakterisiert. Dazu wurde eine Superdex 75 HiLoad 16/60-Säule (130 ml Gelvolumen V_{tot}) mit 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA bei 7°C äquilibriert. Das Ausschlussvolumen V_o wurde mit *Blue Dextran* (MW = 2.000 kDa) zu 48,0 ml bestimmt. Die Säule wurde mit folgenden Proteinen geeicht: RNase A (aus Rinderpankreas; 13,7 kDa),

Chymotrypsinogen A (aus Rinderpankreas; 25 kDa), Ovalbumin (aus Hühnereiweiß; 43 kDa) und Rinderserumalbumin (67 kDa). Zusammen mit den Elutionsvolumina V_e der Eichproteine lässt sich hieraus ein Koeffizient K berechnen (Gl. 2.1), welcher gegen den Logarithmus des Molekulargewichts ($\log MW$) graphisch aufgetragen wird (Pharmacia LKB Biotechnology, 1993). Die Masse des zu bestimmenden, nativen Proteins lässt sich dann hiermit aufgrund seines Elutionsvolumens bestimmen.

$$K = \frac{V_e - V_0}{V_{\text{tot}} - V_0} \quad \text{Gl. 2.1}$$

2.2.2.13 PAGE unter nativen Bedingungen (McLellan, 1982; Radziejewski *et al.*, 1992)

Um Wechselwirkungen zwischen Proteinen zu analysieren, wurden diese zunächst im gewünschten Verhältnis miteinander gemischt und mit 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0; 1 mM EDTA auf ein Gesamtvolumen von 5 μl gebracht. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei 22°C wurden je 5 μl Probenpuffer für native PAGE zugegeben. Es wurden 11%ige (w/v) Polyacrylamid-Gele ohne Sammelgel gegossen und in vorgekühltem Laufpuffer für native PAGE 2 h bei 150 V und 7°C vorlaufen gelassen, um störende Persulfatreste zu entfernen und den pH-Wert zu äquilibrieren. Anschließend wurde der Laufpuffer gewechselt, die Proben aufgetragen und die Elektrophorese für weitere 4 h fortgesetzt.

2.2.2.14 Chemische Quervernetzung mit Glutaraldehyd (nach Rudolph *et al.*, 1997)

20 μl Protein (Konzentration etwa 0,3 mg/ml in 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0; 1 mM EDTA) wurden mit dem gleichen Volumen Glutaraldehyd (0,02 % (w/v), im gleichen Puffer) versetzt und 30 – 60 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 μl 2 M Natriumborhydrid in 100 mM NaOH gestoppt, das Protein mit Natriumdesoxycholat gefällt (s. Kap. 2.2.2.7) und durch SDS-PAGE analysiert.

2.2.2.15 Limitierte Proteolyse

100 μg rh-Pro-NGF (0,41 mg/ml; in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0) wurden mit verschiedenen Konzentrationen Trypsin (w/w-Verhältnis Trypsin : rh-Pro-NGF 1 : 40 bis 1 : 2500) 30 min auf Eis inkubiert. Die Proteolyse wurde dann durch Zugabe eines Überschusses an STI (25 μg) abgestoppt. Als Kontrolle wurde rh-Pro-NGF ohne Zugabe von Trypsin inkubiert. Für Ansätze im präparativen Maßstab wurde rh-Pro-NGF mit Trypsin im Verhältnis 1 : 250 unter den gleichen Bedingungen behandelt. Anschließend wurde das Proteolyseprodukt direkt auf die mit

IEX-Puffer A äquilibrierte Poros 20 HS-Säule (s. Kap. 2.2.3.3) aufgetragen und mit einem linearen Gradienten von 0 - 2 M NaCl in 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0; 1 mM EDTA in einem Gesamtvolumen von 20 ml eluiert. Das Protein wurde bei etwa 840 mM NaCl eluiert. Protein enthaltende Fraktionen wurden vereinigt und gegen 100 mM Essigsäure/NaOH, pH 6,0; 220 mM NaCl dialysiert.

2.2.3 Renaturierung und Reinigung von rh-Pro-NGF

2.2.3.1 Faltungsoptimierung von rh-Pro-NGF aus *Inclusion Bodies*

Die Optimierung der Ausbeute von gefaltetem rh-Pro-NGF wurde mittels RP-HPLC analysiert. Dazu wurde das Beckman Gold HPLC-System (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) verwendet (mit Pumpe 125NM, Detektor 168, Autosampler 507 und Software „Gold“ V 8.10). Je 925 µl Renaturierungsansatz wurden mit 75 µl 32 % (v/v) HCl versetzt und davon 100 µl bei einem Fluss von 0,5 ml/min auf eine Poros 10 R1-Säule aufgetragen (4,6 mm × 100 mm (PerSeptive Biosystems, Farmingdale, NY, USA), äquilibriert mit 6 % (v/v) Laufmittel B). Korrekt gefaltetes Protein sowie Faltungsintermediate wurden bei 20°C und einer Flussrate von 0,8 ml/min mit einem nicht-linearen Gradienten aufgetrennt (0 - 4 min: 6 % B; 4 - 9 min: 6 - 30 % B; 9 - 24 min: 30 - 69 % B; 24 - 25 min: 69 - 100 % B; 25 - 30 min: 100 % B). Elutionspeaks wurden bei 220 und 280 nm detektiert und deren Flächen mit dem Programm „Peakfit“ V 2.01 integriert. Zur Ausbeutebestimmung wurden Eichgeraden mit dem gereinigten, gefalteten Protein (1 - 5,5 µg) erstellt. Da das IB-Material homogen war (≥ 95 % rh-Pro-NGF im SDS-PAA-Gel) wurde zur Berechnung der Ausbeute die Gesamtmenge an IB-Protein im Faltungsexperiment herangezogen.

Laufmittel A: 0,13 % (v/v) TFA in Wasser

Laufmittel B: 0,1 % (v/v) TFA in 80 % (v/v) Acetonitril

2.2.3.2 Pulsrenaturierung von rh-Pro-NGF

Mit der optimierten Methode wurde das Protein in entgastem Faltungspuffer (100 mM Tris/HCl, pH 9,5; 1 M L-Arginin; 5 mM GSH; 1 mM GSSH; 5 mM EDTA) bei 10°C und einer Proteinkonzentration von 50 µg/ml renaturiert. Jede Stunde wurden erneut 50 µg/ml Protein unter heftigem Rühren zugegeben und anschließend der Rührer wieder abgeschaltet. Eine Restkonzentration von 500 mM GdmCl durfte nicht überschritten werden, um Ausbeuteverluste zu vermeiden. 3 - 16 h nach der letzten Zugabe wurde der Faltungsansatz gegen 8 - 10 l IEX-Puffer A dialysiert.

2.2.3.3 Reinigung von renaturiertem rh-Pro-NGF mittels Kationenaustauschchromatographie

Das Dialysat wurde 30 min bei 20.000 rpm (SS34-Rotor) abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine mit IEX-Puffer A äquilibrierte Poros 20 HS-Säule (1,7 ml) aufgetragen und mit einem linearen Gradienten von 0 bis 100 % IEX-Puffer B bei einer Flussrate von 2 ml/min (10 CV) eluiert. Anschließend wurde mit 20 ml IEX-Puffer B nacheluiert. Nicht-nativer rh-Pro-NGF ließ sich nur unter denaturierenden Bedingungen (6 M GdmCl) von der Säule entfernen.

2.2.4 Reinigung des rh-NGF-Pro-Peptids

2.2.4.1 Zellaufschluss und Kationenaustauschchromatographie

Je 1 g Zellfeuchtmasse wurde in 8 M Harnstoff; 100 mM Tris/HCl, pH 7,0; 10 mM EDTA resuspendiert und entweder bei -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren oder sofort mit dem Hochdruck-Homogenisator aufgeschlossen. Das Aufschlussgut wurde 30 min bei 15.000 rpm mit dem SLA-1500-Rotor abzentrifugiert und der Überstand auf eine mit dem gleichen Puffer äquilibrierte S-Sepharose-Säule (Volumen 16 ml; XK16, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) aufgetragen. Die Säule wurde mit 8 M Harnstoff; 50 mM Bicin/NaOH, pH 10; 10 mM EDTA gespült, bis die Basislinie wieder erreicht war. Anschließend wurde ein linearer Gradient über 100 ml von 0 - 2 M NaCl im gleichen Puffer angelegt. Das Protein eluierte bei etwa 250 mM NaCl (Fluss: 2 ml/min). Pro-Peptid enthaltende Fraktionen wurden vereinigt und gegen 8 l 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0; 10 mM EDTA dialysiert.

2.2.4.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Das Dialysat wurde 30 min bei 20.000 rpm (SS34-Rotor) abzentrifugiert und der Überstand mit festem Ammoniumsulfat auf eine Endkonzentration von 1 M gebracht. Danach wurde die Lösung auf eine Phenyl-Sepharose-6-Fast Flow-Säule („High Sub“; Volumen 8 ml; Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) aufgetragen, welche vorher mit HIC-Puffer A äquilibriert worden war. Nach dem Auftrag wurde mit dem gleichen Puffer gewaschen. Das Protein wurde dann mit einem Fluss von 2 ml/min bei einer Konzentration von etwa 430 mM Ammoniumsulfat in einem linearen Gradienten (160 ml) bis 0 M Ammoniumsulfat eluiert. Zum Schluss wurde mit 40 ml Ammoniumsulfat-freiem Puffer nachgespült. Fraktionen, die das Pro-Peptid enthielten, wurden vereinigt und gegen 8 l IEX-Puffer A dialysiert.

2.2.4.3 Kationen-Austauschchromatographie

Das dialysierte Protein wurde filtriert (0,45 µm Filter) und auf eine mit IEX-Puffer A äquilibrierte S-Sepharose-Säule (s. Kap. 2.2.4.1) aufgetragen. Nach dem Auftrag wurde mit IEX-Puffer A gewaschen, bis die Basislinie wieder erreicht war. Das Pro-Peptid wurde dann in einem linearen Gradienten von 0 - 100 % IEX-Puffer B über 160 ml bei einer Salzkonzentration von 470 mM eluiert (Fluss: 2 ml/min). Pro-Peptid-haltige Fraktionen wurden vereinigt, auf das gewünschte Volumen aufkonzentriert, gegen IEX-Puffer A dialysiert und bei -20°C gelagert.

2.2.5 Reinigung des rh-His₁₀-NGF-Pro-Peptids

2.2.5.1 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)

Je 1 g feuchtes Zellpellet wurde in 5 ml 6 M GdmCl; 100 mM Natriumphosphat, pH 8,0; 10 mM Tris resuspendiert und entweder bei -20°C gelagert oder sofort zweimal mit dem Hochdruck-Homogenisator aufgeschlossen. Die Suspension wurde 30 min bei 15.000 rpm (SLA-1500-Rotor) abzentrifugiert und der Überstand auf eine mit dem gleichen Puffer äquilibrierte Ni-NTA-Säule (Volumen 10 ml; Qiagen, Hilden) aufgetragen. Nach dem Auftragen wurde mit IMAC-Puffer A gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine von der Säule zu entfernen. Anschließend wurde in einem linearen Gradienten über 10 CV von 0 - 100 % IMAC-Puffer B eluiert (Flussrate: 1 ml/min) und danach mit 20 ml IMAC-Puffer B nachgewaschen. Das Pro-Peptid eluierte bei etwa 70 mM Imidazol. Alternativ wurde diese Reinigung auch als Stufenelution durchgeführt. Dabei wurde zunächst mit IMAC-Puffer A gewaschen und anschließend mit IMAC-Puffer B eluiert, bis die Basislinie wieder erreicht war. Die vereinigten Fraktionen wurden gegen 8 l IEX-Puffer A dialysiert.

2.2.5.2 Kationen-Austauschchromatographie

Die dialysierten Fraktionen wurden auf eine S-Sepharose-Säule (s. Kap. 2.2.4.1) aufgetragen und mit IEX-Puffer A gewaschen. Das Pro-Peptid wurde mit einer Flussrate von 2 ml/min in einem linearen Gradienten von 0 - 100 % IEX-Puffer B (10 CV) bei etwa 600 mM NaCl eluiert. Die Eluate wurden vereinigt, konzentriert, gegen IEX-Puffer A dialysiert und bei -20°C eingefroren.

2.2.6 Bioassay (Davies, 1989)

Die Bestimmung der biologischen Aktivitäten von rh-NGF (aus limitierter Proteolyse von rh-Pro-NGF), rh-Pro-NGF und dem NGF-Pro-Peptid erfolgte mit dem *DRG-Assay (Dorsal Root*

Ganglion Assay) und wurde freundlicherweise von Dr. Olaf Mundigl und Monika Heidrich (Roche Diagnostics, Penzberg) durchgeführt. Dazu wurden Dorsalwurzelganglien von sieben bis acht Tage alten Hühnerembryonen präpariert, die Neuronen vereinzelt und mit 0,02 - 20 ng/ml des jeweiligen Proteins für 48 h bei 37°C inkubiert. Dann wurde die Anzahl der überlebenden Zellen bestimmt. Als Standard diente gereinigter rh-NGF (Roche Diagnostics, Mannheim).

2.2.7 Spektroskopische Methoden

2.2.7.1 Fluoreszenzspektroskopie

Die Messungen wurden mit dem Fluoreszenzspektrophotometer F-4500 von Hitachi (Tokio, Japan) mit thermostatisierbaren Küvettenhaltern durchgeführt. Alle verwendeten Puffer wurden vorher filtriert (0,45 µm Filter). Die Spaltbreiten für Anregungs- und Emissionslichtstrahl betragen 5 nm. Die Messungen wurden in 1 ml-Küvetten (d = 1 cm) durchgeführt. Als Proteinkonzentration wurde, falls nicht anders angegeben, 20 µg/ml gewählt.

2.2.7.1.1 Emissionsspektren

Emissionsspektren wurden bei einer Anregungswellenlänge von 280 bzw. 295 nm durchgeführt, wobei die Fluoreszenzintensität von 300 bis 400 nm bestimmt wurde. Die Messgeschwindigkeit betrug 60 nm/min, die Verstärkungsspannung 700 V. Alle gezeigten Spektren sind Durchschnittswerte aus 30 Messungen und wurden gegen den jeweiligen Puffer korrigiert. Die Pufferspektren wurden je zehnmal gemessen.

2.2.7.1.2 Denaturierungsmittel-abhängige Übergänge

Im Falle von rh-NGF und rh-Pro-NGF wurden sowohl De- als auch Renaturierung gemessen, im Falle des rh-NGF-Pro-Peptids nur die Denaturierung. Es wurden Protein-Stammlösungen hergestellt und in die entsprechenden GdmCl- bzw. Harnstoffpuffer verdünnt. Die verschiedenen Denaturans-Konzentrationen wurden mit Nativpuffer (50 mM Natriumphosphat, pH 7,0; 1 mM EDTA) und der jeweiligen Stammlösung (8 M GdmCl bzw. 8 M Harnstoff in 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0; 1 mM EDTA) eingestellt. Die Ansätze (je 1 ml) wurden mindestens 10 h bei 20 - 22°C inkubiert und dann vermessen. Nach Anregung bei 280 nm wurden die Fluoreszenzintensitäten bei 326 nm (rh-Pro-NGF), 331 nm (rh-NGF) bzw. 350 nm (rh-NGF-Pro-Peptid) über eine Dauer von 5 min gemessen (alle 0,1 s ein Messpunkt). Anschließend wurden hieraus die Durchschnittswerte gebildet. Die genaue Konzentration des

Denaturierungsmittels wurde aus dem Brechungsindex mit folgenden empirischen Umrechnungsformeln bestimmt (Pace, 1986):

$$c(\text{GdmCl}) = 57,147 \cdot (\Delta N) + 38,68 \cdot (\Delta N)^2 - 91,6 \cdot (\Delta N)^3 \quad \text{Gl. 2.2}$$

$$c(\text{Harnstoff}) = 117,66 \cdot (\Delta N) + 29,753 \cdot (\Delta N)^2 + 185,56 \cdot (\Delta N)^3 \quad \text{Gl. 2.3}$$

(ΔN : Differenz der Brechungsindices der Proben mit und ohne Denaturierungsmittel)

Die aufgenommenen Übergangskurven wurden anschließend normiert. Dazu wurden die Kurven linear extrapoliert (Pace, 1986) und der relative Anteil α an nativen Molekülen bzw. nativem, maturen Teil im rh-Pro-NGF nach folgender Formel bestimmt:

$$\alpha = \frac{I - I_D}{I_N - I_D} \quad \text{Gl. 2.4}$$

(I = Fluoreszenzsignal bei einer bestimmten GdmCl-Konzentration, I_D bzw. I_N = Signal des denaturierten bzw. nativen Zustands bei der gleichen GdmCl-Konzentration. I_D und I_N wurden aus der linearen Abhängigkeit der Fluoreszenz des denaturierten bzw. nativen Proteins von der Denaturierungsmittel-Konzentration berechnet.)

2.2.7.1.3 Temperaturübergänge

Die Temperaturübergänge wurden in 3 ml-Küvetten ($d = 1$ cm) mit der Steuerungssoftware FTLEM (Waldmann, 1998) im Bereich von 1°C bzw. 5°C bis 95°C gemessen. Die Aufheizkurve wurde in 1-Grad-Schritten, die Abkühlkurve in 5-Grad-Schritten gemessen. Als Anregungswellenlänge wurden 280 bzw. 295 nm gewählt, die Fluoreszenz wurde bei 340 nm gemessen. Vor jeder Messung wurde 120 s bei der jeweiligen Temperatur vorinkubiert.

2.2.7.2 Circular dichroismus

Mit dem CD-Spektropolarimeter Model 62 ADS von AVIV (Lakewood, NJ; USA) wurden Nah-UV-CD-Spektren von 250 bis 350 nm ($d = 1$ cm) und Fern-UV-CD-Spektren ($d = 0,01$ bis 0,1 cm) im Bereich 190 bis 250 nm aufgenommen. Im ersten Fall betrug die Akkumulationszeit 15 s, im letzten 2 bis 5 s pro Messpunkt. Die Spektren wurden mindestens fünfmal akkumuliert. Als Spaltbreite wurde 1 nm gewählt. Alle Spektren wurden gegen den jeweiligen Puffer korrigiert und die Elliptizitäten, bezogen auf die mittlere molekulare Masse der Aminosäuren im jeweiligen Protein, mit folgender Formel berechnet (Schmid, 1997):

$$[\Theta]_{\text{MRW}} = \frac{\Theta \cdot 100 \cdot M_r}{c \cdot d \cdot N_A} \quad \text{Gl. 2.5}$$

Θ = gemessene Elliptizität in Grad,

c = Proteinkonzentration in mg/ml,

d = Schichtdicke der Küvette in cm,

M_r = Molekulargewicht des Proteins in g/mol,

N_A = Anzahl der Aminosäuren im Proteinmolekül,

MRW = durchschnittliches Molekulargewicht einer Aminosäure (*mean residue weight*).

2.2.7.3 Analytische Ultrazentrifugation

Die analytische Ultrazentrifugation (Optima XL-A Ultrazentrifuge mit Rotor An-60 Ti; Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) wurde freundlicherweise von Dr. Hauke Lilie (Universität Halle) durchgeführt. Das Molekulargewicht sphärischer Partikel wie z.B. globulärer Proteine kann mittels Sedimentationsgleichgewichtszentrifugation über die Abhängigkeit der Konzentration vom Abstand zur Rotorachse bestimmt werden (Harding, 1997):

$$M_r = \frac{d \ln A}{dr^2} \cdot \frac{2RT}{(1 - \bar{v}\rho) \cdot \omega^2} \quad \text{Gl. 2.6}$$

M_r = molekulare Masse in g/mol,

A = Absorption

r = radialer Abstand von der Rotorachse in m,

R = molare Gaskonstante (8,314 J/(K × mol)) (Aylward & Findlay, 1986),

T = Temperatur in K,

\bar{v} = partielles spezifisches Volumen des Proteins in ml/g,

ρ = Dichte des Lösungsmittels in g/ml,

ω = Winkelgeschwindigkeit in s⁻².

Alle Messungen wurden in 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0; 1 mM EDTA bei 20°C durchgeführt. EDTA musste aufgrund der Instabilität der Pro-Sequenz gegenüber Proteasen zugesetzt werden. Die Proben wurden jeweils drei Tage dialysiert. Die Konzentrationen an rh-

Pro-NGF betragen 0,1, 0,25 und 0,6 mg/ml. Die Sedimentationsläufe für rh-Pro-NGF wurden bei 40.000 rpm über 14 h, die Gleichgewichtsläufe bei 20.000 rpm durchgeführt. Für die Analyse des rh-NGF-Pro-Peptids (0,2 mg/ml) wurden für den Sedimentationslauf 40.000, für den Gleichgewichtslauf 25.000 rpm eingestellt. Die Daten wurden mit dem Beckman XL-A Datenaufnahme- und Analyseprogramm aufgenommen und ausgewertet. Die partiellen spezifischen Volumina der Proteine wurden aus dem durchschnittlichen partiellen Volumen der Aminosäuren errechnet (0,73 ml/g) (Harding, 1997).

2.2.7.4 1D-1H-NMR-Spektren

Die 1D-1H-Kernresonanz-Spektren wurden freundlicherweise von Dr. Peter Bayer (MPG Halle) mit einem Bruker Avance 500 MHz NMR-Spektrometer (Bruker Analytik, Karlsruhe) angefertigt.

2.2.8 Identifizierung von Faltungsintermediaten

Die Analyse der bei der Renaturierung von rh-NGF und rh-Pro-NGF auftretenden Intermediate wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Gennaro Marino, Prof. Piero Pucci und Dr. Margherita Ruoppolo (Università „Federico II“, Neapel, Italien) durchgeführt. Die Massenspektren wurden von Dr. Maria Monti und Dr. Floriana Vinci angefertigt. Die Analyse der Disulfidbrücken wurde von Dr. Maria Monti und Angela Flagiello durchgeführt.

Die Renaturierung des rh-Pro-NGF wurde in 100 mM Tris/HCl, pH 9,5; 1 M L-Arginin; 5 mM GSH; 1 mM GSSG; 5 mM EDTA bei einer Konzentration von 50 µg/ml untersucht. Die Renaturierung von rh-NGF ($c = 26 \mu\text{g/ml}$) erfolgte in 2 M Triethanolamin/HCl, pH 9,0; 0,5 M L-Arginin; 0,2 M NaCl; 5 mM GSH; 1 mM GSSG; 1 mM EDTA. Alle Kinetiken wurden unter N₂-Atmosphäre bei einer Temperatur von 10°C aufgenommen.

2.2.8.1 Vergleichende Untersuchung der oxidativen Faltung von rh-Pro-NGF und rh-NGF

2.2.8.1.1 Herstellung von reduziertem Protein (Rudolph *et al.*, 1997)

Zur Herstellung von denaturiertem, reduziertem rh-NGF bzw. rh-Pro-NGF wurden die nativen Proteine 16 h gegen IB-Solubilisierungspuffer ohne DTT dialysiert. Dann wurde festes DTT ad 100 mM zugegeben und analog zur IB-Solubilisierung (s. Kap. 2.2.2.3) weiter verfahren.

2.2.8.1.2 Alkylierung von Intermediaten (Gray, 1993; Torella *et al.*, 1994)

Zu bestimmten Zeiten wurden den Faltungsansätzen Aliquots entnommen und freie Thiole durch Zugabe von Iodacetamid (IAM) alkyliert. Das IAM wurde jeweils frisch ad 2,2 M im jeweiligen Faltungspuffer bei 65°C gelöst und vor dem Gebrauch auf RT abgekühlt. Die Lösung wurde durch Umwickeln des Gefäßes mit Alufolie vor Licht geschützt, um die Bildung von Iod zu minimieren, welches ein starkes Oxidationsmittel für Thiole darstellt. Die Aliquots wurden dann mit dem gleichen Volumen IAM-Lösung versetzt und 20 s bei RT unter N₂-Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 400 µl 6 M HCl ad 2 ml Reaktionsgemisch abgestoppt. Die Proben wurden mittels RP-HPLC (Beckman „Gold“-System mit Pumpe 126 und Detektor 167) entsalzt (Vydac C4-Säule; 5 µm; 4,6 mm × 250 mm (Vydac, Hesperia, CA, USA)). Faltungsintermediate wurden mit einem steilen, linearen Gradienten von 20 - 95 % B innerhalb von 5 min eluiert (Fluss: 1 ml/min). Die Absorption bei 220 nm wurde verfolgt, die Peaks manuell aufgefangen und sofort mittels ESI-MS analysiert.

Laufmittel A: 0,1 % (v/v) TFA in Wasser

Laufmittel B: 0,07 % (v/v) TFA in 2 : 1 (v/v) Acetonitril/Isopropanol

Zur näheren Untersuchung einzelner rh-Pro-NGF-Faltungsintermediate (s. Abb. 3.6.2.1.2) wurden Aliquots des Renaturierungsansatzes mit 8 % (v/v) 10 M HCl versetzt, um die Faltung abzustoppen. Die Intermediate wurden dann mit einer Phenomenex C4-Säule (5 µm; 4,6 × 250 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA)) aufgetrennt. Dazu wurde folgender Gradient verwendet: 0 - 10 min: 6 % B; 10 - 15 min: 6 - 40 % B; 15 - 30 min: 40 - 69 % B; 30 - 31 min: 69 - 95 % B. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Die Absorption bei 220 nm wurde verfolgt und die Elutionspeaks wurden manuell aufgefangen. Die Proben wurden anschließend wie oben beschrieben alkyliert, entsalzt und analysiert.

Laufmittel A: 0,1 % (v/v) TFA in Wasser

Laufmittel B: 0,07 % (v/v) TFA in 95 % (v/v) wässrigem Acetonitril

2.2.8.1.3 Elektrospray-Massenspektrometrie

Alkylierte Faltungsintermediate des rh-Pro-NGF wurden mit einem BIO-Q Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (mit Aufnahme- und Auswertesoftware „MassLynx“) aufgenommen (Micromass, Manchester, UK). Die aggregationsanfälligeren Spezies der rh-NGF-Faltung wurden mit einem API-100 Single-Quadrupol-Massenspektrometer (Perkin Elmer, USA)

analysiert. Die Proben wurden bei einer Flussrate von 3 $\mu\text{l}/\text{min}$ injiziert, die Spektren mit einer Messgeschwindigkeit von 10 s/Scan aufgenommen. Es wurde mit einem externen Standard (Myoglobin aus Pferdeherz, 16951,5 Da) kalibriert.

2.2.8.2 Strukturelle Charakterisierung der Intermediate

2.2.8.2.1 Limitierte Proteolyse

Aliquots der Faltungsansätze wurden zu bestimmten Zeiten, wie oben beschrieben, alkyliert, entsalzt und anschließend lyophilisiert. Die Proben wurden dann in 0,4 % (w/v) Ammoniumbicarbonat, pH 8,0 gelöst und bei 37°C über 16 h zunächst mit Trypsin (Verhältnis Enzym : Substrat = 1 : 50 (w/w)) verdaut und nochmals lyophilisiert. Die Peptide wurden mittels MALDI-TOF-MS analysiert (s. Kap. 2.2.8.2.2). Fragmente mit zwei Disulfidbrücken wurden durch RP-HPLC isoliert und anschließend einer zweiten Hydrolyse mit Subtilisin unter den gleichen Bedingungen wie oben unterzogen und wiederum mit MALDI-TOF-MS untersucht.

2.2.8.2.2 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die Analysen wurden mit einem Voyager DE Massenspektrometer (PerSeptive Biosystems, Boston, MA, USA) durchgeführt. Die entsalzten, lyophilisierten Proben wurden zu etwa 20 pmol/ μl in 0,2 % (v/v) TFA gelöst. Davon wurde dann 1 μl auf eine MALDI-Probenplatte getüpfelt und an der Luft getrocknet. Anschließend wurde mit 1 μl einer Lösung von α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure (10 mg/ml) in 0,1 % (v/v) TFA, 50 % (v/v) Acetonitril überschichtet und wiederum getrocknet. Die Spektren wurden aus einer Summe von 50 Laserpulsen generiert. Sie enthielten Rinderinsulin (5.734,6 Da) und einen Matrix-Peak (379,1 Da) als interne Standards.

2.2.9 Untersuchung der langsamen Faltung von disulfidverbrücktem rh-Pro-NGF und rh-NGF

2.2.9.1 RP-HPLC-Kinetiken

Nativer rh-NGF bzw. rh-Pro-NGF wurde mindestens sechs Tage bei 40°C in 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0; 6 M GdmCl; 1 mM EDTA inkubiert. Danach wurden die Proteine jeweils ad 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in guanidiniumfreien Puffer verdünnt. Die Restkonzentration an Denaturierungsmittel betrug etwa 140 mM. Die Renaturierungsansätze wurden bei 20°C inkubiert und zu bestimmten Zeiten mittels RP-HPLC analysiert (Gynkotek HPLC-System, mit Säulenofen, UV-Monitor UVD 170S, Pumpe Dionex P580, Autosampler Gina 50 und Steuer-

und Auswertesoftware „Chromleon“ V.4.32). Zur Auftrennung der Spezies wurde eine Poros 10 R1-Säule, (4,6 × 100 mm; PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA) verwendet. Es wurde der gleiche Gradient wie in Kap. 2.2.3.1 beschrieben angelegt. Die End-Flussrate betrug jedoch 1 ml/min.

Laufmittel A: 0,1 % (v/v) TFA in Wasser

Laufmittel B: 0,1 % (v/v) TFA in 80 % (v/v) Acetonitril

2.2.9.2 Faltung in Gegenwart verschiedener PPIasen

Die Kinetik der langsamen Renaturierung von rh-NGF wurde in Anwesenheit verschiedener PPIasen (rh-FKBP 12, rh-Cyp 18, sowie SlyD und Parvulin 10 aus *E. coli*) bei 20°C untersucht. Diese wurden freundlicherweise von Dr. Jens Rahfeld (MPG Halle) zur Verfügung gestellt. Die rh-NGF-Konzentration betrug wieder 20 µg/ml, der Rest-Gehalt an GdmCl etwa 25 mM. Es wurde jeweils ein 10-molarer Überschuss PPIase zugesetzt und wiederum zu bestimmten Zeiten mittels RP-HPLC analysiert.

2.2.10 Renaturierung von rh-NGF *in trans*

Es wurde untersucht, ob auch das isolierte NGF-Pro-Peptid die Faltung des maturen Proteins vermitteln kann. Dazu wurde die oxidative Faltung des reifen rh-NGF (Konzentration: 26 µg/ml; Gesamtmenge rh-NGF: 26 µg) in Gegenwart eines 5-, 10- bzw. 15-molaren Überschusses rh-His₁₀-NGF-Pro-Peptid analysiert. Die Faltung erfolgte bei 10°C in 100 mM Tris/HCl, pH 9,5; 1 M L-Arginin; 5 mM GSH; 1 mM GSSG; 5 mM EDTA. Zur Kontrolle wurde die Renaturierung ohne Zugabe von Pro-Peptid bzw. in Anwesenheit eines 15-molaren Überschusses Lysozym analysiert. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurde die Faltung durch Ansäuern mit HCl gestoppt und jeweils der gesamte Faltungsansatz mittels RP-HPLC (Gynkotek-System) untersucht. Die Poros 10 R1-Säule (4,6 × 100 mm; PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA) wurde mit 30 % Puffer B äquilibriert. Unter diesen Bedingungen wurde das Pro-Peptid von der Säule gewaschen, während reifer NGF noch nicht eluierte. Sobald die Basislinie wieder erreicht war, erfolgte ein Gradient von 30 - 40 % B innerhalb von 30 min mit einer anschließenden Stoßelution von 100 % B (Flussrate: 0,5 - 1 ml/min).

Laufmittel A: 0,1 % (v/v) TFA in Wasser

Laufmittel B: 0,1 % (v/v) TFA in 80 % (v/v) Acetonitril

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Expression, Renaturierung und Reinigung von rekombinantem, humanen Pro-NGF

Für die geplanten Untersuchungen zur Faltung der Pro-Form des Wachstumsfaktors musste als Erstes ein geeignetes Expressions- und Reinigungsverfahren etabliert werden. Für die Klonierung wurde das T7-Expressionssystem der Firma Novagen (Madison, WI, USA) gewählt (s. auch Kap. 2.1.6).

3.1.1 Konstruktion des Expressionsplasmids

Die cDNA für humanen Pro-NGF wurde zunächst durch Polymerasekettenreaktion amplifiziert. Als Matrize diente der Vektor pMGL-SIG-proNGF (Roche Diagnostics, Mannheim). Durch Mutageneseprimer (s. Kap. 2.1.7) wurde am 5'-Ende der für humanen Pro-NGF codierenden DNA-Sequenz eine *Nde* I- und am 3'-Ende eine *Bam*H I-Schnittstelle eingeführt. Das PCR-Produkt wurde in die *Nde* I/*Bam*H I-Schnittstelle der multiplen Klonierungsstelle des Vektors pET11a (Novagen) inseriert. Die korrekte Nukleotid-Sequenz des Inserts wurde mittels DNA-Sequenzierung überprüft.

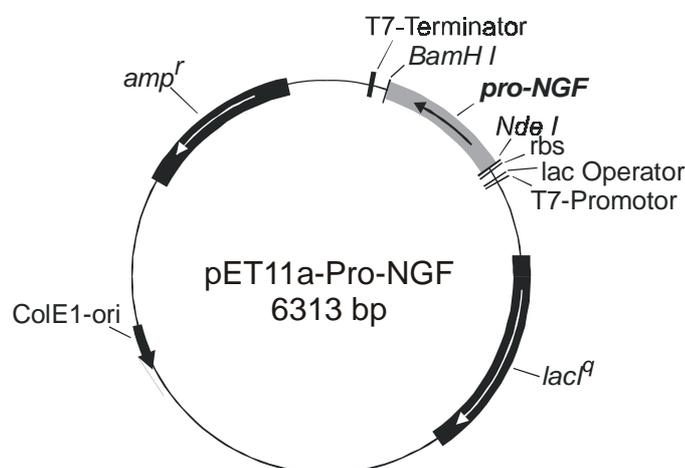


Abb. 3.1.1: Das Plasmidkonstrukt pET11a-Pro-NGF zur cytoplasmatischen Expression von rekombinantem, humanen Pro-NGF. Es enthält unter anderem das Gen für die Ampicillin-Resistenz sowie den Replikationsursprung ColE1.

Sieben der insgesamt 21 Arginine in der Primärstruktur von rh-Pro-NGF werden durch die in *E. coli* seltenen Arginin-Codons AGA (2,7 %) bzw. AGG (1,6 %) codiert (*E. coli Codon Usage* Tabelle:

[http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=Escherichia+coli+\[gbbct\]](http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=Escherichia+coli+[gbbct]))).

Die entsprechende tRNA (DnaY) ist in den Wirtszellen nur in geringen Mengen vorhanden. Daher wurde der Produktionsstamm BL21(DE3) mit dem Plasmid pUBS520 co-transformiert, welches das *dnaY*-Gen enthält (Brinkmann *et al.*, 1989). Der Vektor trägt außerdem die Gene für den Lac-Repressor (lacI^q), Kanamycin-Resistenz sowie den Replikationsursprung p15A. Damit ist das Plasmid kompatibel mit pET11a-Pro-NGF.

3.1.2 Inclusion Body-Präparation

Die Pro-NGF-cDNA konnte erfolgreich im Wirtstamm überexprimiert werden. Aus 1 l *E. coli*-Kultur wurden nach vierstündiger Induktion ca. 400 mg *Inclusion Body*-Pellet gewonnen. Die IB-Präparationen waren stets sehr sauber und enthielten $\geq 95\%$ rh-Pro-NGF (Abb. 3.1.2). Das Protein lief in der SDS-PAGE bei einer apparenten molekularen Masse von 30 kDa. Diese ist zwar größer als die zu erwartende Masse von knapp 25 kDa pro Monomer; ein langsames Laufverhalten wird bei basischen Proteinen jedoch häufiger beobachtet, da diese durchschnittlich mehr SDS-Moleküle pro Aminosäurerest binden können als saure oder neutrale Proteine. Reduzierter rh-Pro-NGF besitzt einen theoretischen isoelektrischen Punkt von 9,89 (berechnet mit dem Programm pI/Mw der SwissProt-Datenbank (http://expasy.hcuge.ch/cgi-bin/pi_tool)).

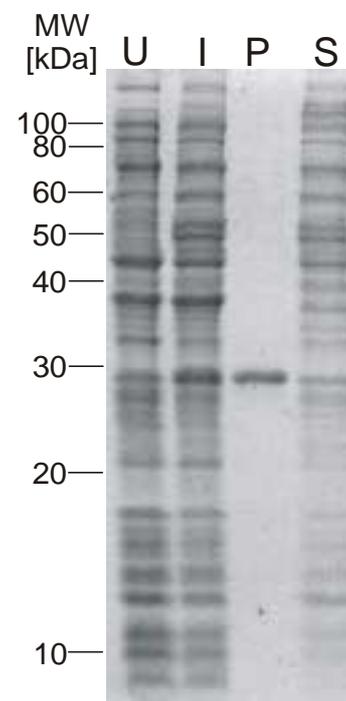


Abb. 3.1.2: SDS-PAA-Gel (15% (w/v), Coomassie-Färbung) einer IB-Präparation von rh-Pro-NGF.

U: Rohextrakt vor Induktion, I: Rohextrakt nach vierstündiger Induktion, P: IB-Pellet, S: löslicher Überstand.

3.1.3 Optimierung der Renaturierung von rh-Pro-NGF

3.1.3.1 Vorversuche

Um einen ersten Anhaltspunkt zu bekommen, unter welchen Bedingungen sich rh-Pro-NGF überhaupt renaturieren lässt, wurden zunächst Bedingungen gesucht, bei denen das Protein in Abwesenheit des Denaturierungsmittels in Lösung blieb. Dazu wurden verschiedene Puffer getestet, die sowohl reduziertes als auch oxidiertes Glutathion (GSH bzw. GSSG) enthielten. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.1.3.1 dargestellt.

a) pH 8,0

Additiv	GSH [mM]	GSSG [mM]	Präzipitatbildung
-	5	1	++
L-Arginin, 0,5 M	5	1	+
L-Arginin, 1 M	5	1	-
L-Arginin, 1 M	1	5	-
Tris, 1 M	5	1	++
Glycerin, 10 % (v/v)	5	1	++
(NH ₄) ₂ SO ₄ , 400 mM	5	1	++
GdmCl, 0,5 M	5	1	++
Triethanolamin, 2 M	5	1	++

b) pH 9,5

Additiv	GSH [mM]	GSSG [mM]	Präzipitatbildung
-	5	1	++
L-Arginin, 0,5 M	5	1	+
L-Arginin, 1 M	5	1	-
L-Arginin, 1 M	1	5	-
Tris, 1 M	5	1	++
Glycerin, 10 % (v/v)	5	1	++
(NH ₄) ₂ SO ₄ , 400 mM	5	1	++
GdmCl, 0,5 M	5	1	+
Triethanolamin, 2 M	5	1	+

Tab. 3.1.3.1: Vorversuche zur Renaturierung von rh-Pro-NGF. Der Grundpuffer bestand aus 100 mM Tris/HCl; 5 mM EDTA. Es wurden jeweils 1 ml-Ansätze mit einer Proteinkonzentration von 50 µg/ml hergestellt, 8,75 h bei 15°C inkubiert und dann gegen 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0; 1 mM EDTA dialysiert. Durch Zentrifugation wurden die Aggregate anschließend sedimentiert. Die Symbole geben den relativen Grad der Präzipitatbildung an (- : kein Pellet sichtbar; + : geringfügige Präzipitation; ++ : starke Präzipitation).

Aus diesen Vorversuchen ging hervor, dass hohe Konzentrationen an L-Arginin (1 M) die Ausbeute an löslichem Protein nach der Dialyse verbesserten. Es ist bereits in vielen anderen Fällen beobachtet worden, dass $\geq 0,5$ M L-Arginin als Additiv bei der *in vitro*-Faltung die Ausbeuten drastisch erhöhen (Buchner & Rudolph, 1991; Rudolph *et al.*, 1995; Rudolph *et al.*, 1997; Hillger, 1999). Die Ursache hierfür ist noch nicht vollständig geklärt. Vermutlich beruht die

Wirkung auf einer Erhöhung der Löslichkeit hydrophober, aggregationsanfälliger Faltungsmidiate. Der denaturierende Einfluss der Guanidinogruppe im L-Arginin ist schwächer ausgeprägt als der im Guanidinium selbst. Letzteres kann sich in geringen Konzentrationen ebenfalls günstig auf die Faltungsausbeute auswirken (Orsini & Goldberg, 1978; Zettlmeissl *et al.*, 1979; Rudolph *et al.*, 1997). In der Tat scheint dieses Denaturierungsmittel ebenfalls einen positiven Effekt auf die Ausbeute an löslichem rh-Pro-NGF zu haben, wenn auch in wesentlich geringerem Ausmaß als L-Arginin (s. Tab. 3.1.3.1). Bei den Kontrollansätzen ohne Zugabe von Additiven wurde das gesamte Protein im Pellet gefunden. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde im Folgenden die Renaturierung weiter optimiert. Die Quantifizierung der Ausbeuten erfolgte mittels RP-HPLC über die Größe der Peakfläche (s. auch Kap. 2.2.3.1). Dazu wurde zunächst mit dem Ausgangspuffer (100 mM Tris/HCl, pH 9,5; 1 M L-Arginin; 5 mM GSH; 1 mM GSSG; 5 mM EDTA) eine kleine Menge nativer rh-Pro-NGF hergestellt. Mit diesem Material wurde dann eine Eichgerade erstellt. Die Konzentration an restlichem GdmCl im Faltungspuffer war kleiner als 5 mM.

3.1.3.2 Zeit- und Temperaturabhängigkeit der Renaturierung von rh-Pro-NGF

Als Erstes wurde die Kinetik der oxidativen Faltung von rh-Pro-NGF näher untersucht, um zu bestimmen, welche Temperatur und Inkubationsdauer für die weiteren Optimierungen gewählt werden sollte. Die Resultate sind in Abb. 3.1.3.2 dargestellt.

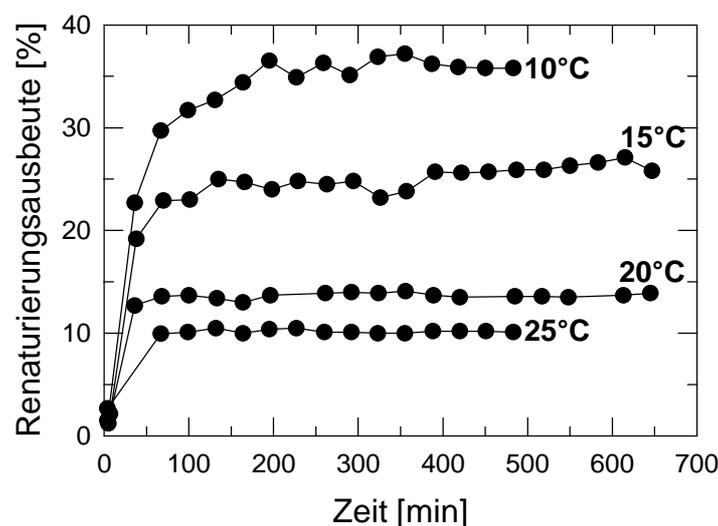


Abb. 3.1.3.2: Renaturierungskinetiken von rh-Pro-NGF bei verschiedenen Temperaturen. Die Messungen wurden in 100 mM Tris/HCl, pH 9,5; 1 M L-Arginin; 5 mM GSH; 1 mM GSSG; 5 mM EDTA durchgeführt. Die Proteinkonzentration betrug 50 µg/ml.

Mit zunehmender Temperatur nahm auch die Faltungsgeschwindigkeit wie erwartet zu. Allerdings wurden dabei auch unerwünschte Aggregationsreaktionen beschleunigt, die in Konkurrenz zur produktiven Faltung traten. Aggregationsprozesse sind stets Reaktionen höherer Ordnung, während produktive Faltungsprozesse Reaktionen erster Ordnung sind, abgesehen von z.B. der Faltung *in trans* oder Assoziationsreaktionen. Mit zunehmender Temperatur nimmt generell die Hydrophobizität zu. Daher nahm mit steigender Temperatur die Faltungsausbeute ab. Bei 10°C war die Faltung nach etwa 3 h abgeschlossen. Bei 25°C war dies schon nach etwa 1,5 h der Fall; die Ausbeute sank jedoch auf die Hälfte. In den nachfolgenden Optimierungsversuchen wurden die Faltungsansätze daher bei 10°C inkubiert.

3.1.3.3 Einfluss des pH-Werts auf die Renaturierungsausbeute

Der Effekt des pH-Werts auf die Faltungsausbeute von rh-Pro-NGF ist in Abb. 3.1.3.3 gezeigt.

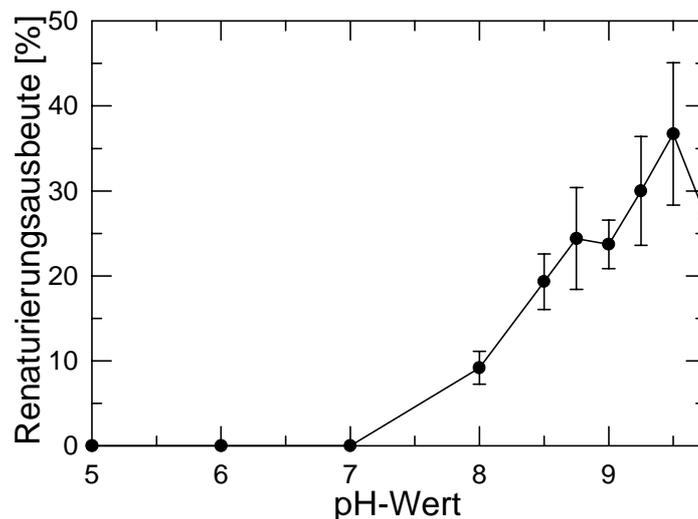


Abb. 3.1.3.3: Einfluss des pH-Werts auf die Renaturierungsausbeute von rh-Pro-NGF. Die Faltungsansätze wurden bei einer Proteinkonzentration von 50 µg/ml bei 10°C über 3 h inkubiert. Als Faltungspuffer wurde 100 mM Tris/HCl; 1 M L-Arginin; 5 mM GSH; 1 mM GSSG; 5 mM EDTA verwendet. Die dargestellten Punkte sind Durchschnittswerte aus drei Messreihen.

Bei einem pH-Wert ≤ 7 war eine Renaturierung nicht möglich. Dies ist dadurch begründet, dass bei der Ausbildung von Disulfidbrücken das Thiolat-Anion die reagierende Spezies ist (s. Kap. 1.5). Die SH-Gruppe von Cysteinen hat einen pK_a -Wert von 8,6 (Gilbert, 1990). Thiolat-Anionen entstehen also nur unter alkalischen Bedingungen. So kann erklärt werden, dass sich nativer rh-Pro-NGF erst ab einem pH-Wert von etwa 8,0 nachweisen ließ. Bei sehr hohen pH-Werten ($> 9,5$) wurde wegen der allgemeinen Instabilität von Proteinen im stark alkalischen Milieu wieder eine Abnahme der Ausbeute beobachtet. Für die folgenden Faltungsoptimierungen wurde daher ein pH-Wert von 9,5 gewählt.

3.1.3.4 Effekt der L-Arginin-Konzentration auf die Faltungsausbeute

Im folgenden Optimierungsschritt wurde der Einfluss verschiedener L-Arginin-Konzentrationen auf die Renaturierungsausbeute untersucht. Aus den Vorversuchen (Kap. 3.1.3.1) war bereits hervorgegangen, dass bei einer Konzentration von 1 M L-Arginin im Faltungspuffer mehr Protein in Lösung blieb als bei 0,5 M L-Arginin.

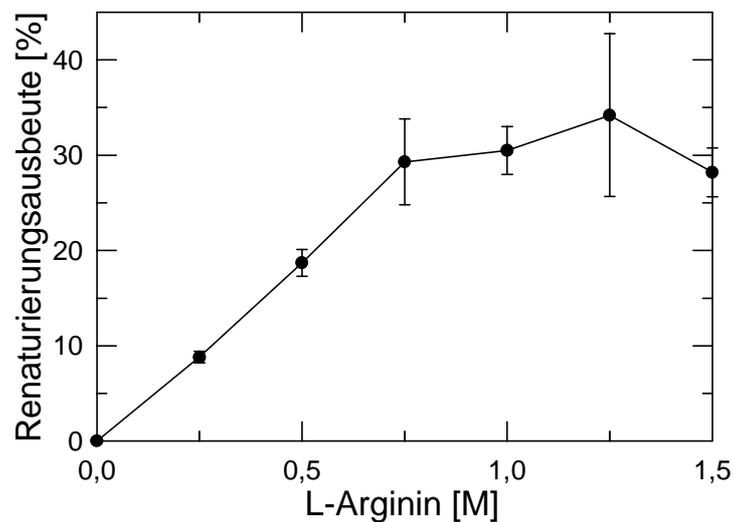


Abb. 3.1.3.4: Einfluss der L-Arginin-Konzentration auf die Faltungsausbeute von rh-Pro-NGF. Die Proteinkonzentration betrug 50 µg/ml. Als Grundpuffer wurde 100 mM Tris/HCl, pH 9,5; 5 mM GSH; 1 mM GSSG; 5 mM EDTA gewählt. Nach 3 h Renaturierung bei 10°C wurde die Ausbeute bestimmt. Die gezeigten Messpunkte sind die durchschnittlichen Ausbeuten von drei unabhängigen Ansätzen.

Ohne Zusatz von dieser Aminosäure zum Faltungspuffer war keine Renaturierung zu beobachten. Offenbar entstehen während der Renaturierung von rh-Pro-NGF stark hydrophobe, aggregationsanfällige Faltungsintermediate. Bei einer Konzentration von 0,25 M L-Arginin stieg die Ausbeute bereits auf 9 %. Bei weiterer Erhöhung des L-Arginin-Gehalts nahm die Ausbeute bis zu einer Konzentration von etwa 0,75 M L-Arginin linear zu. Oberhalb dieser Konzentration ließ sich keine weitere Erhöhung der Ausbeute (ca. 30 %) mehr erzielen.

3.1.3.5 Auswirkung der Konzentration an oxidiertem Glutathion auf die Renaturierungsausbeute von rh-Pro-NGF

Als Nächstes wurde der GSSG-Gehalt im Faltungspuffer optimiert. Dazu wurde die Konzentration an reduziertem Glutathion konstant gehalten (5 mM) und die Menge an oxidiertem Glutathion im Bereich von 0 bis 20 mM variiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.1.3.5 dargestellt.

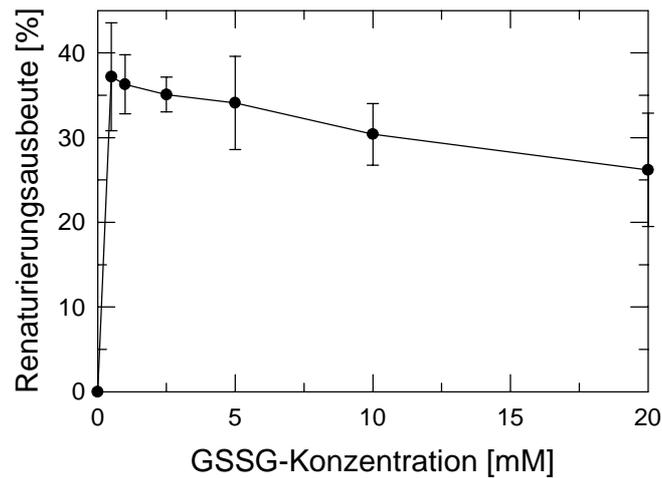


Abb. 3.1.3.5: Effekt der GSSG-Konzentration auf die Renaturierungsausbeute von rh-Pro-NGF. Die Konzentration an rh-Pro-NGF betrug 50 µg/ml. Es wurde wiederum bei einer Temperatur von 10°C über 3 h gefaltet. Der Puffer setzte sich zusammen aus 100 mM Tris/HCl, pH 9,5; 1 M L-Arginin; 5 mM GSH; 5 mM EDTA. Die Messpunkte stellen Durchschnittswerte von drei Ansätzen dar.

Wie zu erwarten, wurde in Abwesenheit von GSSG kein nativer rh-Pro-NGF gebildet. Dies lag daran, dass ohne Oxidationsmittel kein *Oxido Shuffling* stattfinden konnte (s. Kap. 1.5). Sobald der GSSG-Gehalt auf 0,5 mM erhöht wurde, war die Renaturierungsausbeute bereits maximal. Eine weitere Erhöhung der Konzentration an oxidiertem Glutathion hatte im untersuchten Bereich keinen signifikanten Einfluss mehr auf den Ertrag an nativem rh-Pro-NGF.

3.1.3.6 Einfluss der GSH-Konzentration auf die Renaturierungsausbeute

Der Effekt verschiedener Gehalte an GSH bei konstanter GSSG-Konzentration (1 mM) wurde ebenfalls untersucht. Die eingesetzte GSH-Menge betrug 0 bis 20 mM. Die Resultate sind in Abb. 3.1.3.6 gezeigt.

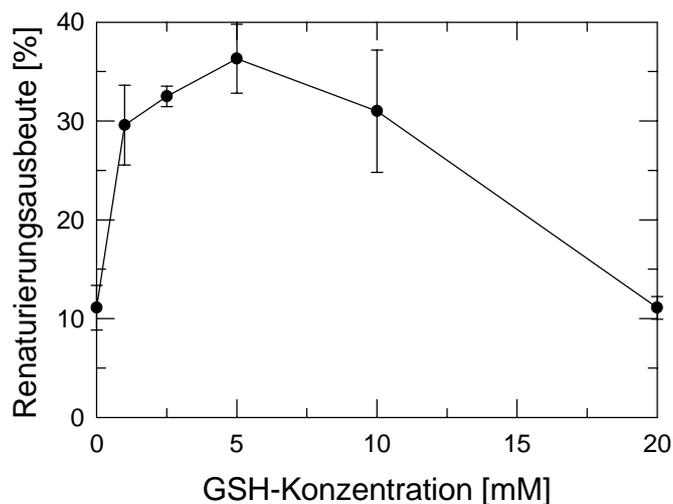


Abb. 3.1.3.6: Auswirkung verschiedener GSH-Konzentrationen auf die Faltungsausbeute von rh-Pro-NGF. Als Puffer wurde 100 mM Tris/HCl, pH 9,5; 1 M L-Arginin; 1 mM GSSG; 5 mM EDTA verwendet. Die Inkubationsdauer betrug 3 h bei 10°C bei einer Proteinkonzentration von 50 µg/ml. Die dargestellten Werte sind die durchschnittlichen Ausbeuten von drei Versuchen.

Wie die Ergebnisse zeigen, fand bereits ohne Zusatz von GSH *Oxido Shuffling* von rh-Pro-NGF statt. Die vom reduzierten Protein bereitgestellte Thiolat-Konzentration ($6 \mu\text{M}$) war jedoch noch zu gering für eine optimale Ausbeute. Der Ertrag an korrekt gefaltetem rh-Pro-NGF erreichte erst bei 5 mM GSH sein Maximum und nahm bei weiterer Erhöhung der GSH-Konzentration wieder ab.

3.1.3.7 Auswirkung der Guanidinium-Konzentration auf die Faltungsausbeute

Die Produktion größerer Mengen rh-Pro-NGF sollte mittels Pulsrenaturierung erfolgen. Bei dieser Faltungstechnik wird das reduzierte, denaturierte Protein mit der gewünschten Konzentration in den Renaturierungspuffer verdünnt. Nach Ablauf einer bestimmten Inkubationszeit wird wiederum Protein zugegeben, usw. (Rudolph & Fischer, 1990). Die Pulse können jedoch nicht beliebig oft wiederholt werden, da die Konzentration an Denaturierungsmittel stetig zunimmt. Irgendwann werden Konzentrationen erreicht, die eine weitere Renaturierung nicht erlauben. Aus diesem Grund musste die für die Faltung von rh-Pro-NGF kritische GdmCl-Konzentration bekannt sein. Wie aus Abb. 3.1.3.7 ersichtlich, ließ sich keine signifikante Abnahme der Renaturierungsausbeute im gemessenen Bereich bis 500 mM GdmCl beobachten.

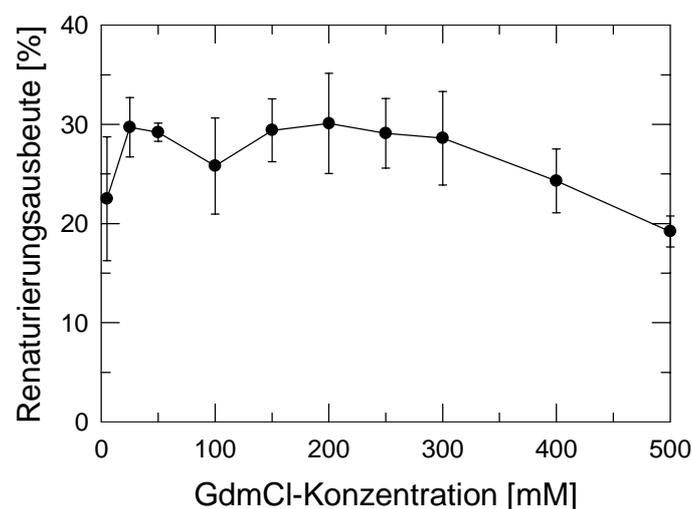


Abb. 3.1.3.7: Bestimmung der kritischen GdmCl-Konzentration für die Faltung von rh-Pro-NGF. Der Renaturierungspuffer bestand aus 100 mM Tris/HCl, pH 9,5; 1 M L-Arginin; 5 mM GSH; 0,5 mM GSSG; 5 mM EDTA. Es wurde bei einer Proteinkonzentration von $50 \mu\text{g/ml}$ bei 10°C über 3 h renaturiert. Die Messwerte stellen die durchschnittlichen Ausbeuten aus drei Versuchsreihen dar.

3.1.3.8 Einfluss der rh-Pro-NGF-Konzentration auf die Renaturierungsausbeute

Erfahrungsgemäß nimmt die Faltungsausbeute mit zunehmender Proteinkonzentration ab, da die Wahrscheinlichkeit zunimmt, dass sich hydrophobe Intermediate begegnen und aggregieren. Andererseits muss bei geringen Proteinkonzentrationen die Anzahl der Pulse erhöht werden; damit nimmt die Dauer der Pulsrenaturierung zu. Es galt daher, einen vernünftigen Kompromiss zwischen der Zunahme der Gesamt-Faltungsdauer einerseits und der Renaturierungsausbeute andererseits zu finden. Der Effekt der Proteinkonzentration auf die Faltungsausbeute von rh-Pro-NGF ist in Abb. 3.1.3.8 dargestellt.

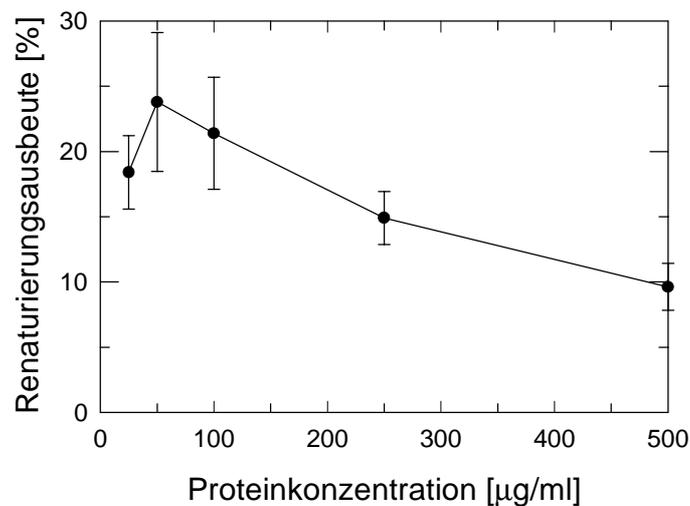


Abb. 3.1.3.8: Einfluss der rh-Pro-NGF-Konzentration auf die Renaturierungsausbeute. Es wurden der gleiche Faltungspuffer sowie die gleichen Inkubationsbedingungen wie in der Legende von Abb. 3.1.3.7 beschrieben verwendet. Die GdmCl-Konzentration betrug bei jedem Ansatz 200 mM. Die gezeigten Ausbeuten sind Durchschnittswerte aus drei Messungen.

Wie erwartet, nahm auch im Falle der rh-Pro-NGF-Faltung die Ausbeute mit zunehmender Proteinkonzentration ab. Bei einer Protein-Konzentration von 50 µg/ml betrug die Ausbeute an gefaltetem rh-Pro-NGF ca. 25 %. Bei einer Protein-Konzentration von 500 µg/ml belief sich die Ausbeute immerhin noch auf etwa 10 %.

Im Gegensatz dazu wurde für die Renaturierung von reifem rh-NGF aus IB-Material eine Proteinkonzentration von lediglich 2 µg/ml verwendet. Die Ausbeute betrug dabei maximal 10 % bei 4°C und einer Faltungsdauer von über 100 h (Dr. Adelbert Grossmann, Roche Diagnostics, Penzberg; persönliche Mitteilung). Im Folgenden wurde eine rh-Pro-NGF-Konzentration von 50 µg/ml pro Puls für die Renaturierungen verwendet.

3.1.3.9 Reinigung des rh-Pro-NGF nach der Renaturierung

Da die rh-Pro-NGF *Inclusion Bodies* nahezu homogen waren (s. Abb. 3.1.2), war nach der Renaturierung ein einziger Reinigungsschritt ausreichend, um Fremdproteine und nicht-nativen rh-Pro-NGF abzutrennen. Rh-Pro-NGF hat einen relativ hohen isoelektrischen Punkt ($pI = 9,89$; s. Kap. 3.1.2). Daher lässt sich das Protein gut mittels Kationen-Austauschchromatographie reinigen (Abb. 3.1.3.9).

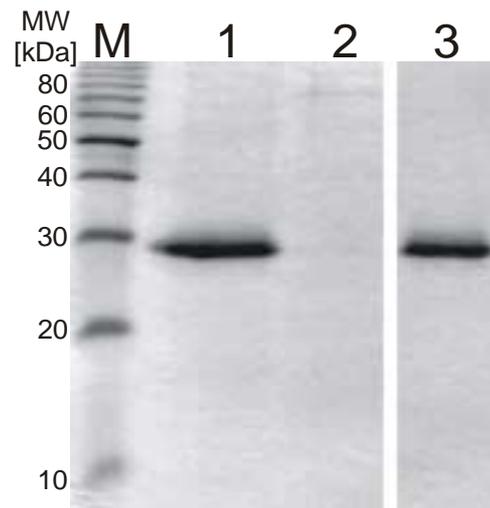


Abb. 3.1.3.9: Reinigung von rh-Pro-NGF nach der Renaturierung aus *Inclusion Bodies*. Gezeigt ist ein 15%iges (w/v) SDS-PAA-Gel (Coomassie-Färbung). M: 10 kDa-Marker, 1: Renaturierungsansatz vor der Reinigung, 2: Durchlauf der Kationenaustausch-Chromatographie, 3: rh-Pro-NGF nach Reinigung an Poros 20 HS (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA).

3.1.3.10 Zusammenfassung der bisherigen Resultate

Die Faltungsoptimierungen haben gezeigt, dass die Pro-Sequenz in der Tat *in vitro* die Faltung des murenen NGF vermittelt. Die vermuteten Ursachen hierfür werden ausführlicher in Kap. 3.5 und Kap. 3.6 diskutiert. Voraussetzung für eine erfolgreiche Renaturierung ist jedoch die Anwesenheit eines geeigneten Redoxsystems (reduziertes und oxidiertes Glutathion) sowie hohe Konzentrationen an L-Arginin (mindestens 0,75 M). Außerdem muss die Renaturierung im alkalischen Milieu erfolgen, idealerweise bei pH 9,5. Unter diesen Bedingungen ließen sich Ausbeuten von 25 - 35 % erzielen.

3.2 Charakterisierung des rekombinanten, humanen Pro-NGF

3.2.1 N-terminale Sequenzierung und massenspektrometrische Analyse

Zur Überprüfung der Identität des durch IB-Präparation isolierten Proteins wurde zunächst der N-Terminus mittels Edman-Abbau analysiert. Dabei wurde folgende Aminosäuresequenz gefunden: MEPHSESNV. Diese stimmte mit der N-terminalen Sequenz von rh-Pro-NGF überein. Das Start-Methionin wurde nach rekombinanter Synthese in *E. coli* nicht abgespalten.

Die molekulare Masse des gereinigten rh-Pro-NGF wurde mittels Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) bestimmt. Das theoretische Molekulargewicht für das oxidierte rh-Pro-NGF-Monomer mit Start-Methionin beträgt 24.869,3 Da; gemessen wurden 24.872,2 Da, in guter Übereinstimmung mit dem theoretischen Wert.

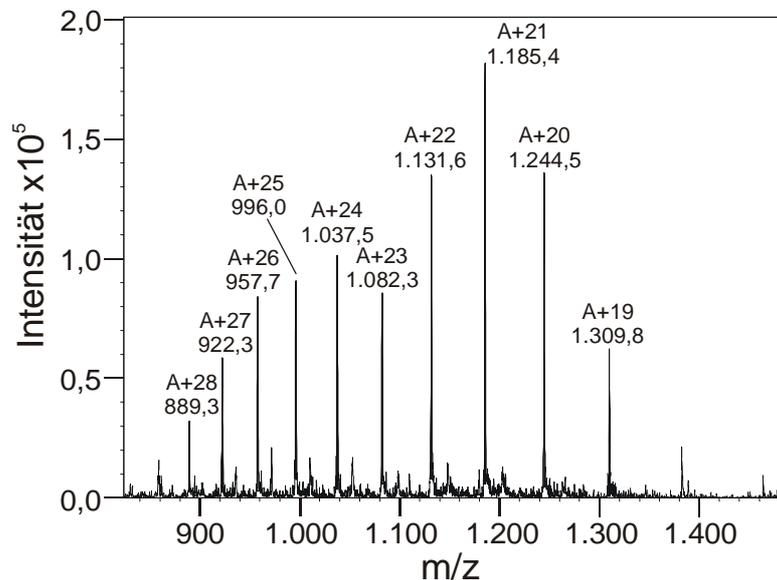


Abb. 3.2.1: Elektrospray-Massenspektrum (Ausschnitt) von renaturiertem, gereinigtem rh-Pro-NGF.

Sowohl N-terminale Sequenzierung als auch massenspektrometrische Analyse ergaben folglich, dass das rekombinante Protein weder intrazellulär noch während der nachfolgenden Isolierung, Solubilisierung, Renaturierung sowie Reinigung durch Proteasen abgebaut wurde.

3.2.2 Limitierte Proteolyse

Zwar eluierte der renaturierte rh-Pro-NGF als diskreter Peak vom Kationenaustauscher bzw. von der RP-HPLC-Säule; dies ist jedoch noch kein Nachweis dafür, ob die Faltung erfolgreich war, d.h. ob das Protein seine native Struktur erlangt hat. Eine Nachweismöglichkeit für die native Konformation ist die Resistenz gegenüber Proteasen. Strukturierte Bereiche sollten dabei von der Protease nicht gespalten werden. Humaner Pro-NGF besitzt als letzte Aminosäure der Pro-Sequenz ein Arginin. Die Überlegung war daher, durch limitierte Proteolyse mit einer Protease geeigneter Substratspezifität reifen rh-NGF aus der Pro-Form zu erhalten. *In vivo* wird die Pro-Sequenz von NGF durch Proteasen des Furin-Typs abgespalten (s. Kap. 1.2). *In vitro* gelang die Prozessierung von murinem Prä-Pro-NGF mit stöchiometrischen Anteilen γ -NGF aus Submaxillar-Drüsen der Maus (s. Kap. 1.2) und katalytischen Mengen Trypsin (Edwards *et al.*, 1988). Durch *in vitro*-Renaturierung gewonnener rh-Pro-NGF sollte daher ebenfalls durch Trypsin zur reifen Form prozessiert werden, sofern die native Konformation vorliegt. Rh-Pro-NGF wurde mit verschiedenen Konzentrationen der Serinprotease inkubiert, die Hydrolyse mit

einem Überschuss STI gestoppt und die Spaltansätze anschließend mittels SDS-PAGE analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.2.2.1 dargestellt.

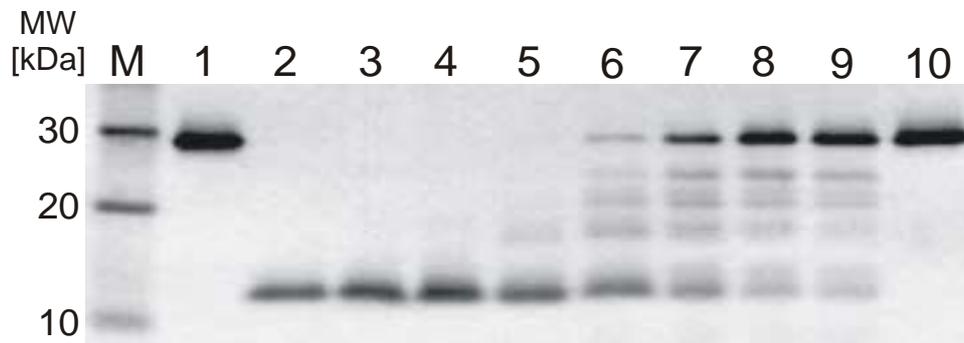


Abb. 3.2.2.1: Limitierte Proteolyse von rh-Pro-NGF mit Trypsin (SDS-PAA-Gel (15 % (w/v), Coomassie-Färbung)). M: 10 kDa-Marker, 1: rh-Pro-NGF-Standard, 2: rh-NGF-Standard, 3-9: Masseverhältnis Trypsin : rh-Pro-NGF = 1 : 40, 1 : 100, 1 : 250, 1 : 500; 1 : 1.000, 1 : 2.000, 1 : 2.500, 10: Kontrolle ohne Trypsin.

Die limitierte Proteolyse lieferte ein Spaltprodukt, welches im SDS-PAA-Gel auf der gleichen Höhe lief wie der rh-NGF-Standard (13 kDa). In den Proben mit höheren Trypsin-Konzentrationen (Masseverhältnis Trypsin : rh-Pro-NGF = 1 : 40 bis 1 : 250) war dies das einzige durch SDS-PAGE detektierbare Spaltprodukt. Die Bande in den Ansätzen mit einem Masseverhältnis Trypsin : rh-Pro-NGF = 1 : 40 bzw. 1 : 100 wurde durch N-terminale Sequenzierung näher untersucht. Dazu wurde das SDS-PAA-Gel auf eine PVDF-Membran gebロットet. Ansatz 1 : 250 wurde durch RP-HPLC entsalzt und die einzelnen Elutionspeaks analysiert. Es fanden sich folgende N-Termini:

N-Terminus 1: Met⁻¹⁰⁴ ...;

N-Terminus 2: Val⁻³⁵ ...;

N-Terminus 3: Ser¹... (reifer rh-NGF);

N-Terminus 4: Gly¹⁰... .

Diese Peptide waren in den verschiedenen Ansätzen in unterschiedlichem Ausmaß vorhanden:

Ansatz 1 : 40: N-Terminus 2 : N-Terminus 3 : N-Terminus 4 = 4 : 5 : 2,

Ansatz 1 : 100: N-Terminus 2 : N-Terminus 3 = 1 : 1 (N-Terminus 4 in Spuren).

Nach chromatographischer Auftrennung von Ansatz 1 : 250 (Masseverhältnis Trypsin : rh-Pro-NGF) mittels RP-HPLC wurden zwei Elutionspeaks erhalten. Während der eine Peak (Retentionszeit 12,34 min) lediglich kurze Peptide der Pro-Sequenz enthielt, beinhaltete der

zweite Peak (Retentionszeit 14,86 min) neben zwei kleineren Fragmenten mit 2.877,4 und 6.643,3 Da den korrekt prozessierten rh-NGF. Die massenspektrometrische Analyse ergab eine Masse von 13.264,0 Da (Abb. 3.2.2.2) Dieses Molekulargewicht ist in guter Übereinstimmung mit der Masse des rh-NGF-Monomers (13.261,1 Da).

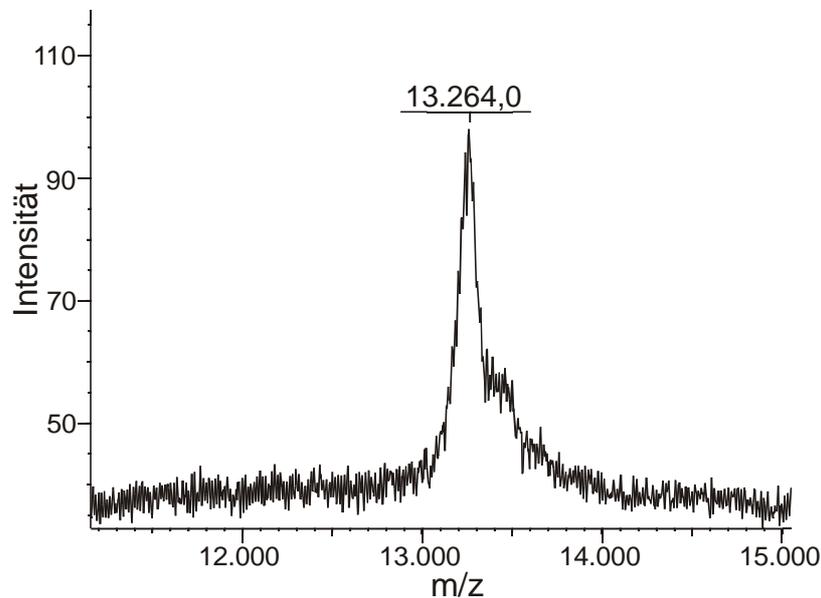


Abb. 3.2.2.2: MALDI-TOF-Massenspektrum des Ansatzes mit einem Masseverhältnis Trypsin : rh-Pro-NGF = 1 : 250 (später Elutionspeak bei 14,86 min).

Durch limitierte Proteolyse des renaturierten rh-Pro-NGF mit Trypsin konnte also reifer rh-NGF erhalten werden. Daraus ist zu folgern, dass das Pro-Protein in der nativen Struktur vorlag. Trypsin spaltete bei höheren Konzentrationen (Masseverhältnis Trypsin : rh-Pro-NGF \geq 1 : 100) auch im reifen Teil des rh-NGF vor Gly10. Letztere Spezies wurde bereits von Burton und Mitarbeitern beschrieben (Burton *et al.*, 1992). NGF-Präparationen aus Submaxillar-Drüsen der Maus enthalten ebenfalls heterogene Gemische mit N-terminal verkürzten Spezies. Der N-Terminus von reifem NGF ist nicht strukturiert und daher anfällig für Abbau durch Proteasen (s. Kap. 1.2). Zur Gewinnung von maturem rh-NGF aus rh-Pro-NGF im präparativen Maßstab wurde das Pro-Protein mit Trypsin im Masseverhältnis 1 : 250 (Trypsin : rh-Pro-NGF) versetzt. Die Elutionseigenschaften des Spaltprodukts von der Poros 20 HS-Säule bei einer Salzkonzentration von etwa 840 mM NaCl (s. auch Kap. 2.2.2.15) entsprachen denen des reifen rh-NGF-Standards in einem Kontrollexperiment (Daten nicht gezeigt). Die Ausbeute an gereinigtem, maturem rh-NGF betrug 17 – 50 % der für die Proteolyse eingesetzten Pro-Form. Bei der Hydrolyse wurden neben dem reifen Protein auch kürzere Fragmente der Pro-Sequenz gefunden, nicht jedoch das intakte Pro-Peptid. In Abb. 3.2.2.1 sind bei den Ansätzen mit geringen Trypsin-Konzentrationen (1 : 500 bis 1 : 2.500) verschiedene diskrete Abbaubanden sichtbar. Offenbar spaltet Trypsin die stark basische Pro-Sequenz stufenweise ab (theoretischer

pI: 11,62). Dies deutet darauf hin, dass die Pro-Sequenz nicht-strukturierte Bereiche oder Schleifen enthält, die der Protease leicht zugänglich sind.

3.2.3 Untersuchung der Quartärstruktur

Nachdem der native Zustand des rh-Pro-NGF-Renaturats durch limitierte Proteolyse belegt worden war, galt es zu klären, ob das Pro-Protein monomer oder dimer ist. Findet die Dimerisierung erst nach der Prozessierung statt, so würde das Pro-Peptid eine Dimerisierung verhindern. Im reifen Wachstumsfaktor sind die beiden Monomere über eine hydrophobe Kontaktfläche miteinander assoziiert (s. Kap. 1.2). Die Aufgabe des stark basischen Pro-Peptids könnte darin bestehen, sich als „Aggregationsschutz“ über die hydrophobe Fläche des gefalteten Monomers zu legen. Dagegen spricht jedoch, dass sich reifer, korrekt disulfid-verbrückter NGF leicht renaturieren lässt (Timm & Neet, 1992). Daher ist auch denkbar, dass das Pro-Peptid nur mit bestimmten hydrophoben Faltungsintermediaten in Wechselwirkung tritt und trotz seiner Größe die Dimerisierung des gefalteten Pro-Proteins nicht oder kaum behindert. Um den oligomeren Zustand des rh-Pro-NGF zweifelsfrei analysieren zu können, wurden drei verschiedene Techniken angewendet: analytische Ultrazentrifugation, analytische Gelfiltration und chemische Quervernetzung mit Glutaraldehyd.

3.2.3.1 Analytische Ultrazentrifugation

Der Gleichgewichtslauf bei 20.000 rpm ergab ein Molekulargewicht von 49.190 Da für rh-Pro-NGF ($c = 0,25$ mg/ml), was der Masse eines Dimers entspricht (Abb. 3.2.3.1). Die theoretische Masse eines rh-Pro-NGF-Dimers beträgt 49.738,6 Da. Ähnliche Molekulargewichte (48.890 bzw. 48.860 Da) ergaben sich auch für die anderen Konzentrationen (0,1 bzw. 0,6 mg/ml). Die Proben waren homogen; es ließen sich keine monomeren Spezies detektieren. Nach dem Lauf wurden die Ansätze mittels SDS-PAGE überprüft. Es ließ sich in keinem Fall proteolytischer Abbau feststellen (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus wurden in Sedimentationsläufen, durchgeführt bei 40.000 rpm, keine höher oligomeren Spezies oder Aggregate festgestellt. Rh-Pro-NGF sedimentierte als homogene Spezies mit einem s-Wert von 3,2 S.

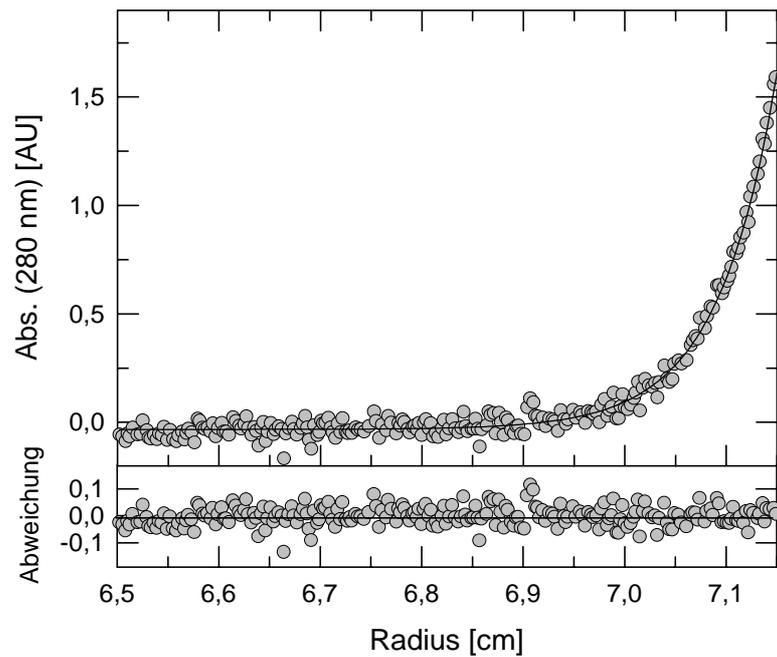


Abb. 3.2.3.1: Analytische Ultrazentrifugation von rh-Pro-NGF. Gezeigt ist der Gleichgewichtslauf bei 20.000 rpm über 30 h bei 20°C. Als Puffer wurde 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0; 1 mM EDTA verwendet. Der EDTA-Zusatz war notwendig, da die Pro-Sequenz des Proteins andernfalls während der Zentrifugation durch Spuren von Proteasen abgespalten worden wäre. Die Proteinkonzentration betrug 0,25 mg/ml.

3.2.3.2 Analytische Gelfiltration

Die Ergebnisse der analytischen Gelfiltration mit Superdex 75 sind in Abb. 3.2.3.2 gezeigt. Rh-Pro-NGF eluierte in einem Elutionsvolumen von 66,9 ml, reifer rh-NGF in einem Volumen von 85,8 ml. Das Pro-Protein ist somit größer als das rh-NGF-Dimer. Anhand der Eichkurve wurde ein Molekulargewicht von 46,0 kDa, wiederum dem eines Dimers entsprechend, bestimmt. Für reifen rh-NGF wurde eine molekulare Masse von lediglich 16,2 kDa gefunden, ein Wert, der auf den monomeren Zustand dieses Proteins hindeutet. Ein ungewöhnliches Laufverhalten des dimeren NGF wurde jedoch auch schon von anderen Autoren beobachtet (Radziejewski *et al.*, 1992).

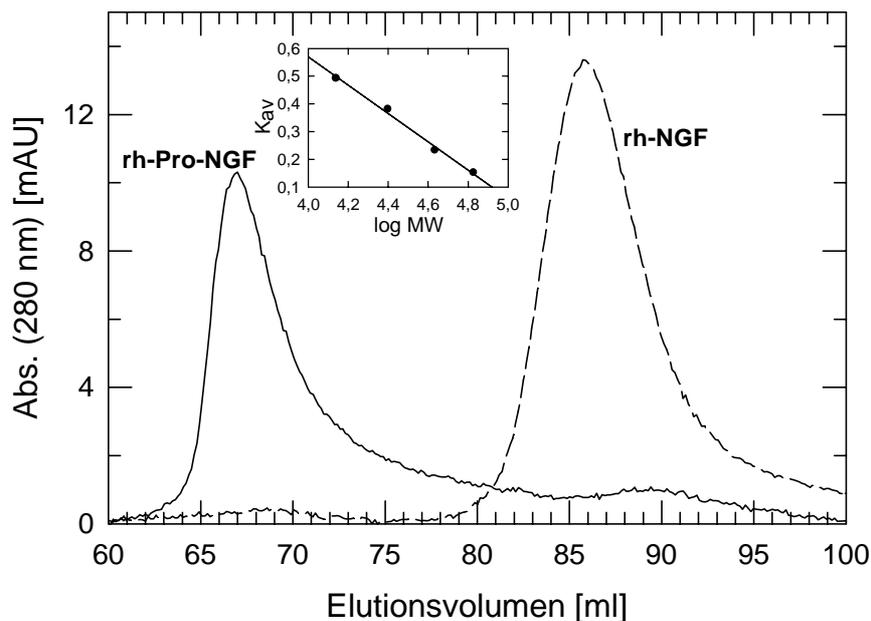


Abb. 3.2.3.2: Analytische Gelfiltration von rh-Pro-NGF (—) und rh-NGF (-----) an Superdex 75 (HiLoad 16/60-Säule von Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden). Die Läufe wurden bei 7°C durchgeführt. Die Säule wurde mit 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA äquilibriert. Der Zusatz von 100 mM NaCl zum Puffer sollte eine unspezifische Wechselwirkung der Proteine mit der Gelmatrix verhindern. Es wurden jeweils 500 µl Protein aufgetragen (rh-NGF: 310 µg; rh-Pro-NGF: 675 µg). In der kleinen Grafik ist die Eichgerade dargestellt (zur Kalibrierung s. Kap. 2.2.2.12).

3.2.3.3 Chemische Quervernetzung

Der dimere Zustand des NGF-Pro-Proteins wurde durch chemische Quervernetzung mit Glutaraldehyd bestätigt (Abb. 3.2.3.3). Auf dem SDS-PAA-Gel war lediglich eine Bande zu sehen, die dem rh-Pro-NGF-Dimer entsprach. Höhermolekulare, unspezifische *Crosslink*-Produkte konnten nicht detektiert werden. Die chemische Quervernetzung wurde auch bei niedrigeren Proteinkonzentrationen bis herunter zu 5 µg/ml durchgeführt. Auch hier lag rh-Pro-NGF als Dimer vor (Daten nicht gezeigt).

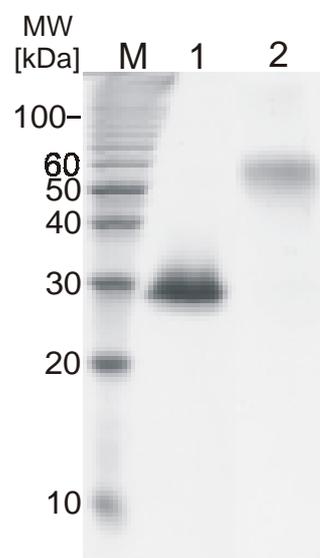


Abb. 3.2.3.3: Chemische Quervernetzung von rh-Pro-NGF mit Glutaraldehyd (Coomassiegefärbtes SDS-PAA-Gel, (15 % (w/v))). Das Protein (Endkonzentration 0,15 mg/ml) wurde 1 h bei 22°C in Gegenwart von 0,01 % (w/v) Glutaraldehyd inkubiert. Die Reaktion wurde in 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0; 1 mM EDTA durchgeführt.

Die verschiedenen Versuche zur Bestimmung des Assoziationsgrades belegen, dass das native Pro-Protein bereits dimer ist. Die Pro-Sequenz verhindert also trotz ihrer Gesamtlänge von 104 Aminosäuren eine Dimerisierung nicht. Dies bedeutet, dass die Pro-Sequenz an der Außenseite des Dimers lokalisiert sein muss. Der reife Teil des gefalteten Pro-Proteins unterscheidet sich daher wahrscheinlich kaum von demjenigen nach der Prozessierung. Die nähere Untersuchung der Sekundär- und Tertiärstruktur des Pro-Proteins und des isolierten rh-NGF-Pro-Peptids wird in Kap. 3.2.4.3 sowie 3.4.3.3 beschrieben.

3.2.4 Spektrale Eigenschaften von rh-Pro-NGF

Das NGF-Pro-Protein enthält vier Tryptophan-, zwei Tyrosin- und elf Phenylalaninreste. Davon sind ein Tryptophan sowie vier Phenylalanine in der Pro-Sequenz lokalisiert.

3.2.4.1 UV-Absorption

Das UV-Absorptionsspektrum von renaturiertem, gereinigtem rh-Pro-NGF ist in Abb. 3.2.4.1 gezeigt. Die Absorption der Phenylalanine im Bereich von etwa 255 bis 275 nm ist kaum zu erkennen. Obwohl insgesamt elf Phenylalaninreste im rh-Pro-NGF enthalten sind, ist ihre Absorption gering, da sie von der Absorption durch Tyrosine und Tryptophane überlagert ist, deren molare Extinktionskoeffizienten den des Phenylalanins jeweils um etwa eine Größenordnung übertreffen. Das Maximum bei 280 nm und die Schulter bei 290 nm werden durch die Absorption der Tryptophane hervorgerufen, welche die der Tyrosine überlagert. Das UV-Absorptionsspektrum des reifen rh-NGF ist ähnlich dem des Pro-Proteins. Auch hier wird die Gestalt des Spektrums durch die Tryptophane dominiert. Die relative Absorption des reifen Proteins ist etwas geringer als die des Pro-Proteins, eine Tatsache, die durch die zusätzlichen Phenylalanin- und Tryptophanreste in der Pro-Sequenz bedingt ist. Das in Abb. 3.2.4.1 ebenfalls dargestellte Differenzspektrum von rh-Pro-NGF und reifem rh-NGF macht dies deutlich. Die Proteinspektren der denaturierten und nativen Proteine sind nahezu identisch (Daten nicht gezeigt).

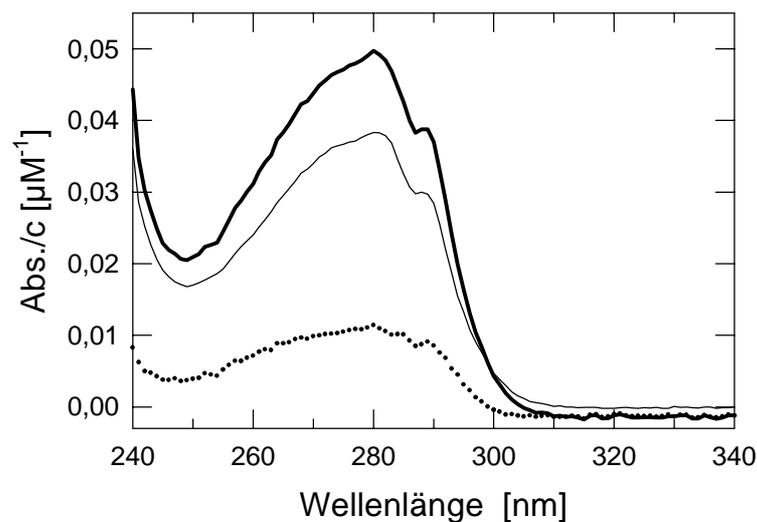


Abb. 3.2.4.1: UV-Absorptionsspektren von rh-NGF (dünne Linie) und rh-Pro-NGF (dicke Linie). Die Spektren wurden auf die molaren Konzentrationen der Proteine normiert. Sie wurden bei 22°C in 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0 aufgenommen und gegen den proteinfreien Puffer korrigiert. Die Proteinkonzentration betrug 8,08 μM für rh-NGF und 2,94 μM für rh-Pro-NGF. Die punktierte Linie stellt das Differenzspektrum der beiden Proteine dar.

3.2.4.2 Fluoreszenz-Emissionsspektren

In Abb. 3.2.4.2 sind die Fluoreszenz-Emissionsspektren von nativem und denaturiertem rh-Pro-NGF dargestellt. Die Anregungswellenlänge betrug 280 nm. Die Fluoreszenz der Phenylalanine wird im Allgemeinen aufgrund ihrer geringen Sensitivität und wegen des Energietransfers zu Tyrosinen und Tryptophanen nicht beobachtet (Schmid, 1997). Das Fluoreszenzmaximum des nativen rh-Pro-NGF liegt bei 337 nm. Im Vergleich dazu ist das Maximum des reifen rh-NGF geringfügig zu größeren Wellenlängen verschoben und beträgt 341 nm. Die Unterschiede in den Emissionsspektren sind durch den zusätzlichen Fluorophor in der Pro-Sequenz, den Tryptophanrest, bedingt. Daher ist auch die Fluoreszenzintensität des Pro-Proteins größer als die des reifen rh-NGF. Im nativen Zustand befinden sich die Tryptophane des reifen Teils in der Kontaktfläche zwischen beiden Monomeren (McDonald *et al.*, 1991). Im denaturierten Zustand sind die Fluoreszenzmaxima beider Proteine zu längeren Wellenlängen hin verschoben: 348 nm bzw. 349 nm für rh-Pro-NGF bzw. rh-NGF.

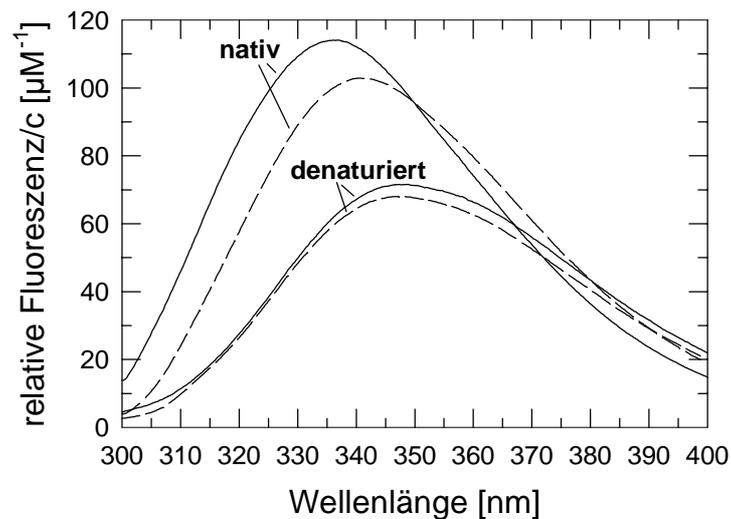


Abb. 3.2.4.2: Fluoreszenzmissionsspektren von nativem bzw. denaturiertem rh-NGF (- - -) und rh-Pro-NGF (—). Alle Messungen wurden in 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0; 1 mM EDTA bei 20°C durchgeführt. Die Puffer für die Spektren unter denaturierenden Bedingungen enthielten zusätzlich 6 M GdmCl. Die Proteine wurden sofort nach ihrer Verdünnung in Denaturierungspuffer vermessen. Die Anregungswellenlänge betrug 280 nm. Für jede Messung wurde eine Proteinkonzentration von 20 µg/ml gewählt. Die Spektren wurden pufferkorrigiert und die gemessenen Fluoreszenzen auf die molare Monomerkonzentration bezogen.

3.2.4.3 Circulardichroismus

CD-Spektren des nativen und denaturierten rh-Pro-NGF wurden im Fern-UV- (190 – 250 nm) und im Nah-UV-Bereich (250 - 350 nm) aufgenommen und mit denen des reifen rh-NGF verglichen (Abb. 3.2.4.3). Das Fern-UV-Spektrum des gefalteten reifen Proteins zeigt eine leichte Abnahme des Signals von 235 bis 210 nm, was durch die β -Faltblatt-Struktur bedingt ist. Darüber hinaus existiert ein breites Minimum bei 206 nm (vgl. auch Timm & Neet, 1992; Narhi *et al.*, 1993). Das Spektrum des nativen rh-Pro-NGF im Fern-UV ist ähnlich dem des rh-NGF in der Region von 235 bis 210 nm, besitzt jedoch ein stärker ausgeprägtes Minimum bei 202 nm. Die Pro-Sequenz besitzt daher wahrscheinlich ebenfalls keine helikale Struktur. Das Nah-UV-Spektrum des rh-Pro-NGF weist eine Feinstruktur im Bereich von 280 bis 300 nm auf, die im Spektrum des reifen Proteins nicht existiert. Dies deutet darauf hin, dass sich der Tryptophanrest der Pro-Sequenz im Pro-Protein in einer asymmetrischen Umgebung befindet. In 6 M GdmCl weist das Nah-UV-Spektrum beider Proteine noch eine geringfügige Feinstruktur auf, die darauf schließen lässt, dass die Proteine vermutlich im Bereich des Cystin-Knotens noch Reststruktur besitzen.

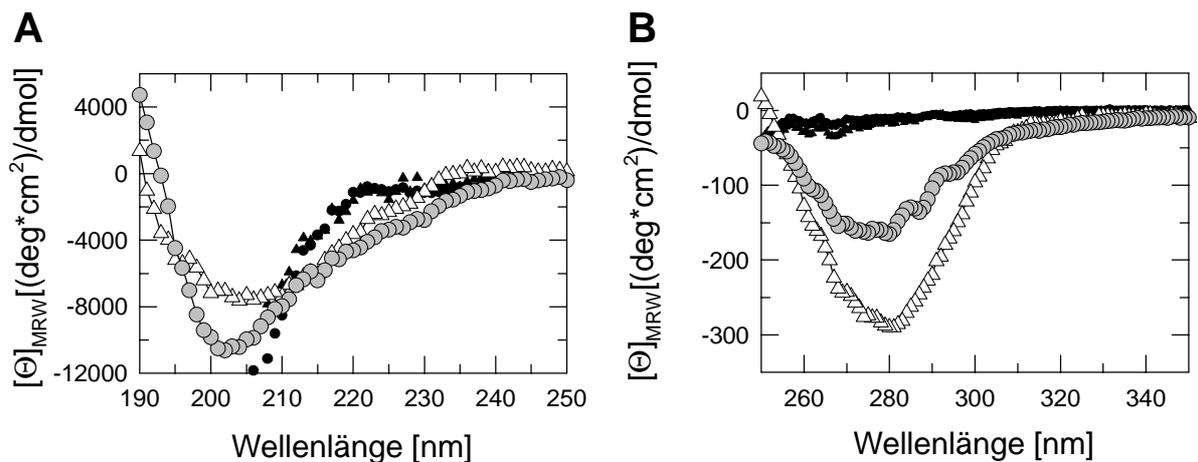


Abb. 3.2.4.3: Circular dichroismus-Spektren von rh-NGF und rh-Pro-NGF. Die Spektren wurden bei 20°C in 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0 aufgenommen und gegen den jeweiligen Puffer korrigiert. Die denaturierten Proteine wurden in 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0; 1 mM EDTA mit 6 M GdmCl gemessen. **(A) Fern-UV-Spektren** ($c(\text{rh-NGF nativ}) = 0,50 \text{ mg/ml}$; $c(\text{rh-NGF denaturiert}) = 3,08 \text{ mg/ml}$; $c(\text{rh-Pro-NGF nativ}) = 0,5 \text{ mg/ml}$; $c(\text{rh-Pro-NGF denaturiert}) = 1,87 \text{ mg/ml}$). Die Spektren der nativen Proteine wurden in Küvetten mit 0,02 cm Schichtdicke aufgenommen, die der denaturierten Proben in Küvetten mit $d = 0,01 \text{ cm}$. **(B) Nah-UV-Spektren** ($c(\text{rh-NGF nativ}) = 0,46 \text{ mg/ml}$; $c(\text{rh-NGF denaturiert}) = 0,59 \text{ mg/ml}$; $c(\text{rh-Pro-NGF nativ}) = 0,76 \text{ mg/ml}$; $c(\text{rh-Pro-NGF denaturiert}) = 1,10 \text{ mg/ml}$). Alle Spektren wurden mit Küvetten der Schichtdicke 1 cm detektiert. **Symbole:** weiße Dreiecke: nativer rh-NGF, graue Kreise: nativer rh-Pro-NGF, kleine schwarze Dreiecke: denaturierter rh-NGF, kleine schwarze Kreise: denaturierter rh-Pro-NGF.

3.2.4.4 Thermische Stabilität

Die Temperaturübergänge von reifem rh-NGF und rh-Pro-NGF wurden mittels Fluoreszenzspektroskopie analysiert (Abb. 3.2.4.4). Reifer rh-NGF entfaltet zwischen 60 und 75°C mit einem Übergangsmittelpunkt von etwa 69°C. Rh-Pro-NGF zeigte einen nicht-kooperativen Übergang in einem weiten Bereich von etwa 40 – 80°C. Vermutlich war dies auf die Anwesenheit der kovalent gebundenen Pro-Sequenz zurückzuführen, die wahrscheinlich zuerst auffaltete. Erst oberhalb von 75 bzw. 80°C aggregierten beide Proteine quantitativ und irreversibel. Die Ursache hierfür ist wahrscheinlich die starke, hydrophobe Wechselwirkung zwischen den beiden Monomeren und der starre Cystin-Knoten. Letzterer wurde vermutlich nur geringfügig durch die zunehmende Molekularbewegung aufgeweitet und behielt größtenteils seine Struktur. Erst oberhalb des Übergangsbereichs setzte Monomerisierung ein, die sofort zur Aggregation führte.

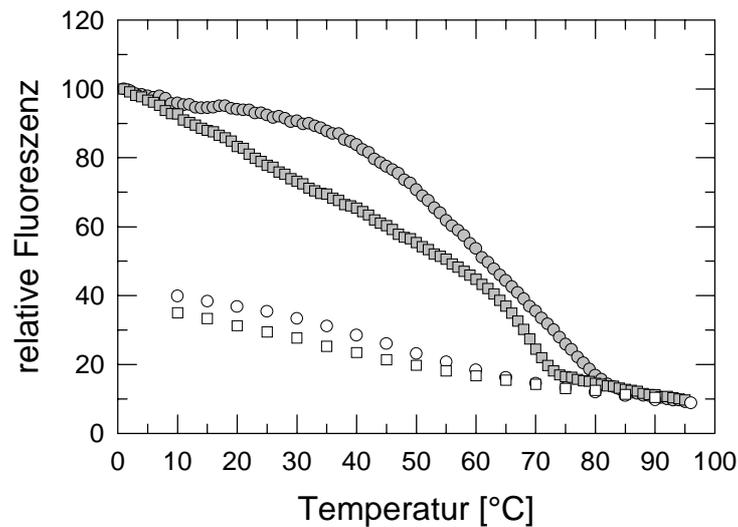


Abb. 3.2.4.4: Temperaturübergänge von rh-NGF (Quadrate) und rh-Pro-NGF (Kreise). Alle Spektren wurden in 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0; 1 mM EDTA aufgenommen. Die Anregungswellenlänge betrug in beiden Fällen 295 nm, die Fluoreszenz wurde bei 340 nm detektiert. Die grauen Symbole stellen die Aufheiz-, die weißen Symbole die Abkühlkurven dar.

3.2.4.5 Biologische Aktivität

Die biologischen Aktivitäten sowohl des rh-Pro-NGF als auch des reifen rh-NGF, welcher durch limitierte Proteolyse der Pro-Form mit Trypsin gewonnen wurde, wurden mit dem *Dorsal Root Ganglion (DRG)-Assay* bestimmt. Dabei wurden Neuronen mit verschiedenen Konzentrationen des Wachstumsfaktors für 48 h inkubiert. Die Neuronen wurden aus den Hinterwurzelganglien sieben bis acht Tage alter Hühnerembryonen isoliert. In diesem Entwicklungsstadium ist NGF für das Überleben der Nervenzellen absolut notwendig. Fehlt NGF, so gehen die Neuronen durch programmierten Zelltod zugrunde. In Anwesenheit des Wachstumsfaktors beginnen die Zellen zu differenzieren; sie flachen ab und bilden Neuriten aus. Die Anzahl der überlebenden Zellen hängt von der NGF-Konzentration ab. Der EC_{50} -Wert gibt die Konzentration an, bei der die Hälfte der Neuronen überlebt. Die Ergebnisse des *Bioassays* sind in Abb. 3.2.4.5 gezeigt. Der EC_{50} -Wert des rh-NGF-Standards betrug 119 ± 8 pg/ml. Überraschenderweise zeigte auch das Pro-Protein eine hohe biologische Aktivität: der EC_{50} -Wert betrug hier 311 ± 59 pg/ml. Berücksichtigt man die fast doppelt so große molare Masse des rh-Pro-NGF, so waren die Aktivitäten beider Spezies vergleichbar hoch. Des Weiteren ließ sich durch limitierte Proteolyse des rh-Pro-NGF mit Trypsin reifer, biologisch aktiver rh-NGF herstellen. Für diesen wurde ein EC_{50} -Wert von 138 ± 33 pg/ml bestimmt, welcher praktisch identisch war mit der biologischen Aktivität des rh-NGF-Standards.

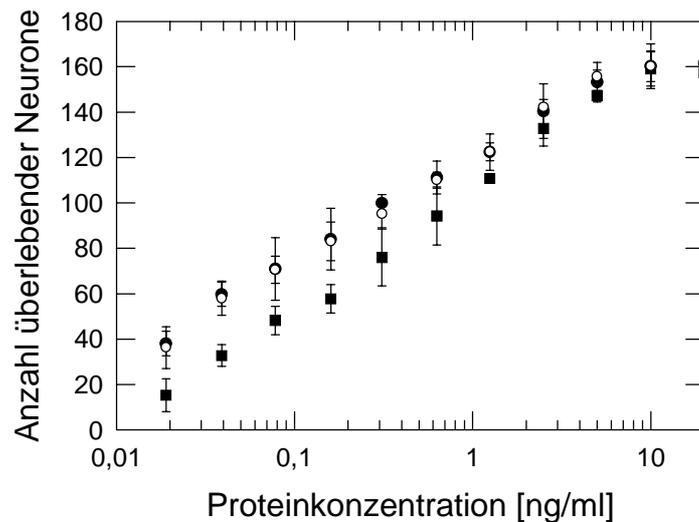


Abb. 3.2.4.5: DRG-Assay von rh-Pro-NGF (schwarze Kästchen), durch limitierte Proteolyse von rh-Pro-NGF erhaltener rh-NGF (weiße Kreise) und rh-NGF-Standard der Firma Roche Diagnostics, Mannheim (schwarze Kreise). Die dargestellten Ergebnisse sind Durchschnittswerte jeweils zweier Präparationen. Für jede Präparation wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Für den rh-NGF-Standard wurden 12 Einzelmessungen durchgeführt und daraus die Mittelwerte gebildet. Die resultierenden EC_{50} -Werte sind im vorhergehenden Absatz beschrieben.

Dass Prä-Pro-NGF biologische Aktivität aufweist, wurde bereits von Edwards und Mitarbeitern nachgewiesen (Edwards *et al.*, 1988). Allerdings war in diesen Untersuchungen die Aktivität im Vergleich zum reifen rh-NGF etwa zehnmal kleiner. Die Diskrepanz dieser Ergebnisse zu den in dieser Arbeit ermittelten könnte sich dadurch erklären lassen, dass Edwards und Mitarbeiter das Prä-Pro-Protein untersuchten. Des Weiteren wurde ein anderer Aktivitätstest verwendet, bei dem die Anzahl der Neuronen bestimmt wurde, deren Neuriten länger als der eigentliche Zellkörper war. Die Inkubationszeit betrug hier auch nur 18 - 24 h. Chen und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die runden Spermatozoen-Zellen der Ratte zwei Pro-Formen des β -NGF sekretieren: eine 22 kDa- und eine 31 kDa-Form (Molekulargewichte der Monomeren) (Chen *et al.*, 1997). Letztere induziert ein Abflachen und Neuritenbildung in PC12-Zellen, einer neuronalen Zelllinie. Die 22 kDa-Form dagegen bewirkt nur eine schwache Ausbildung der Neuriten. Offenbar stimulieren beide Formen die Rezeptoren unterschiedlich und könnten somit *in vivo* regulatorische Funktion besitzen (s. Kap. 1.2).

Das Überleben der Zellen wird über die Bindung des Wachstumsfaktors an den TrkA-Rezeptor vermittelt (s. Kap. 1.3). Offensichtlich verdeckt die Pro-Sequenz die TrkA-Bindungsstellen nicht, so dass der reife Teil des Pro-Proteins immer noch voll zur Bindung an den Rezeptor befähigt ist. Es kann aber auch sein, dass das Pro-Peptid zwar einen Teil der Oberfläche des reifen NGF überdeckt, bei teilweiser Bindung des reifen Teils an TrkA jedoch wegklappt, so dass die übrigen, an der Rezeptorbindung beteiligten Aminosäurereste freigelegt werden und dann ebenfalls binden können.

3.2.4.6 Zusammenfassung von Kapitel 3.2

Mithilfe verschiedener Techniken - analytischer Ultrazentrifugation, analytischer Gelfiltration und chemischer Quervernetzung mit Glutaraldehyd - wurde nachgewiesen, dass rh-Pro-NGF als Dimer vorliegt. Die Gestalt des UV-Absorptionsspektrums und des Fluoreszenz-Emissionsspektrums wird von den Tryptophanen des Proteins dominiert. Das Fern-UV-CD-Spektrum des rh-Pro-NGF zeigt, dass dieses Protein keine α -Helices besitzt. Das Nah-UV-CD-Spektrum hat eine Feinstruktur im Bereich von etwa 280 - 300 nm, die das Nah-UV-CD-Spektrum des reifen rh-NGF nicht aufweist. Dies ist vermutlich auf das Tryptophan der Pro-Sequenz zurückzuführen, welches sich im rh-Pro-NGF in asymmetrischer Umgebung befindet. Rh-Pro-NGF zeigte im Gegensatz zu rh-NGF einen breiten, nicht-kooperativen Temperaturübergang im Bereich von etwa 40 – 80°C, was wahrscheinlich durch den Einfluss des kovalent gebundenen Pro-Peptids hervorgerufen wurde. Durch limitierte Proteolyse von rh-Pro-NGF mit Trypsin ließ sich reifer, biologisch aktiver rh-NGF darstellen. Das unprozessierte Pro-Protein besaß ebenfalls biologische Aktivität, welche fast ebenso groß war wie die des reifen rh-NGF-Standards.

3.3 Expression und Reinigung des NGF-Pro-Peptids

Nach der Charakterisierung des rh-Pro-NGF sollte nun die Struktur des isolierten Pro-Peptids näher untersucht werden. Da sich nach limitierter Proteolyse von rh-Pro-NGF das Pro-Peptid nicht isolieren ließ (Kap. 3.2.2), wurde es ebenfalls rekombinant in *E. coli* produziert.

3.3.1 Herstellung der Expressionsplasmide

Zur Herstellung des rekombinanten, humanen NGF-Pro-Peptids wurde die entsprechende cDNA in zwei verschiedene Plasmide ligiert; zum einen in den bereits beschriebenen Vektor pET11a, zum anderen in das Plasmid pET19b. Letzteres liefert Translationsprodukte, an deren N-Termini ein Deka-His-Tag sowie eine Enterokinase-Schnittstelle fusioniert sind. Dies ermöglicht die schnelle Reinigung größerer Proteinmengen mittels Metallchelat-Affinitätschromatographie. Durch einen Mutagenese-Primer („RevPro-Peptid“; Kap. 2.1.7) wurde hinter dem letzten Codon der für die Pro-Sequenz codierenden cDNA ein Stop-Codon und eine anschließende *Bam*H I-Schnittstelle eingefügt. Als Matrize diente der Vektor pET11a-Pro-NGF. Das PCR-Produkt wurde in die multiple Klonierungsstelle der Vektoren ligiert. Die beiden Pro-Peptid-Plasmidkonstrukte sind in Abb. 3.3.1 dargestellt.

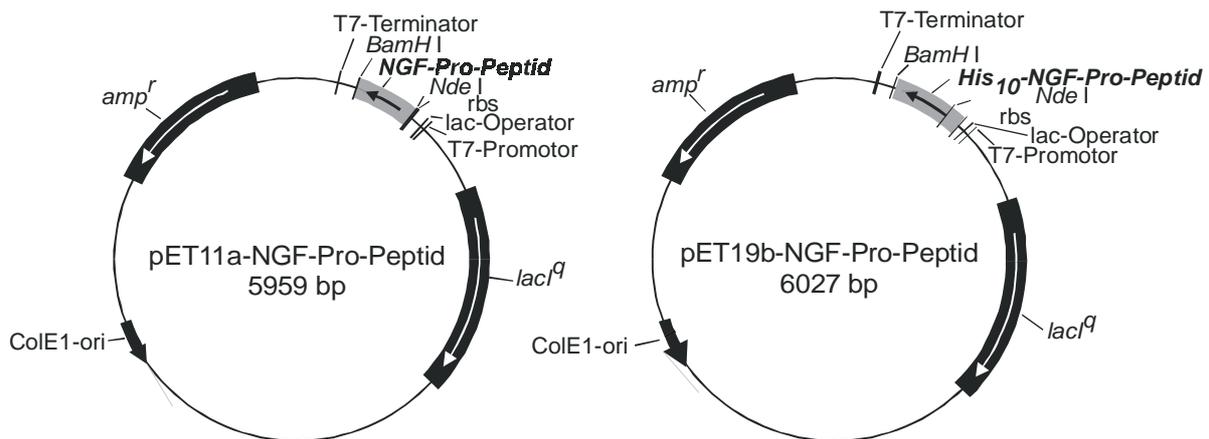


Abb. 3.3.1: Die Plasmidkonstrukte pET11a-NGF-Pro-Peptid und pET19b-NGF-Pro-Peptid. Beide Plasmide dienen der cytoplasmatischen Expression des rh-NGF-Pro-Peptids. Sie enthalten das Gen für Ampicillin-Resistenz sowie den Replikationsursprung ColE1. Die Expression der in den Vektor pET19b klonierten cDNA des NGF-Pro-Peptids führt zu einer Translation des Proteins mit einem N-terminal fusionierten Deka-His-Tag sowie einer Enterokinase-Spaltstelle. Die Primärstruktur wird damit um die folgende Sequenz verlängert: MGHHHHHHHHHSSGHIDDDDKH-.

3.3.2 Isolierung der beiden Pro-Peptide

3.3.2.1 Reinigung des rh-NGF-Pro-Peptids ohne Fusions-Tag

Im Gegensatz zum Pro-Protein wurde das rh-NGF-Pro-Peptid in *E. coli* als lösliches Protein translatiert und musste daher aus dem Rohextrakt isoliert werden. Eine Reinigung des Pro-Peptids unter nativen Bedingungen erwies sich als extrem schwierig, da es äußerst empfindlich gegenüber Hydrolyse durch Proteasen war. Es wurde selbst in Gegenwart hoher Konzentrationen EDTA (10 mM) oder Proteaseinhibitoren wie PMSF abgebaut. Glücklicherweise fand *in vivo* kaum Proteolyse statt; sie setzte erst beim Aufschluss der Zellen ein. Daher mussten der Zellaufschluss sowie der erste Reinigungsschritt (Kationenaustausch-Chromatographie) unter denaturierenden Bedingungen in 8 M Harnstoff durchgeführt werden. Wie in Kap. 3.2.2 erwähnt, ist das Pro-Peptid ein sehr basisches Protein mit einem theoretischen isoelektrischen Punkt von 11,62. Daher bindet es auch noch bei sehr hohen pH-Werten an S-Sepharose. Der erste Reinigungsschritt wurde dementsprechend bei pH 10 durchgeführt, wodurch ein Großteil der *E. coli*-Proteine abgetrennt werden konnte. Die Elutionsfraktionen wurden dann durch Dialyse gegen harnstofffreien Puffer renaturiert, wobei ein Teil der Fremdproteine aggregierte. Nach anschließender Reinigung an Phenyl-Sepharose und einer weiteren Kationenaustausch-Chromatographie bei pH 7 konnten 8 mg Pro-Peptid aus 4 l Schüttelkultur isoliert werden. Ein SDS-PAA-Gel der einzelnen Reinigungsschritte ist in Abb. 3.3.2.1.2 gezeigt.

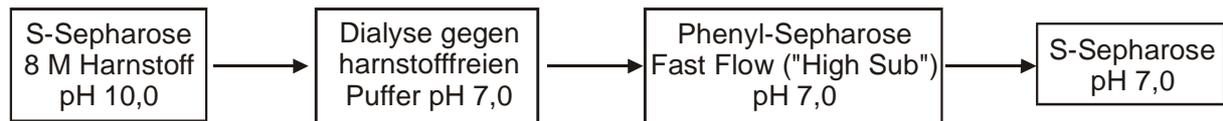


Abb. 3.3.2.1.1: Schema der Reinigung des rh-NGF-Pro-Peptids.



Abb. 3.3.2.1.2: Isolierung des rekombinanten, humanen NGF-Pro-Peptids (SDS-PAA-Gel (15 % (w/v) Acrylamid), Coomassie-Färbung). M: Molekulargewicht-Standard, 1: Rohextrakt vor Induktion, 2: Rohextrakt 3 h nach Induktion, 3: Eluat nach Kationen-Austauschchromatographie bei pH 10, 4: Eluat der hydrophoben Interaktionschromatographie, 5: Eluat der Kationen-Austauschchromatographie bei pH 7,0.

3.3.2.2 Darstellung des rh-NGF-Pro-Peptids mit Dekka-His-Tag (rh-His₁₀-NGF-Pro-Peptid)

Auch bei der Reinigung dieser Variante musste der Zellaufschluss unter denaturierenden Bedingungen in 6 M GdmCl erfolgen. Zusammen mit dem rh-His₁₀-NGF-Pro-Peptid eluierte stets auch eine etwa 28 kDa große Verunreinigung von der Nickel-Affinitätssäule. Diese ließ sich durch anschließende Kationen-Austauschchromatographie an S-Sepharose abtrennen. SDS-PAA-Gele der Reinigung des rh-His₁₀-NGF-Pro-Peptids sind in Abb. 3.3.2.2.2 dargestellt. Aus 3 l Schüttelkultur ließen sich bis zu 46 mg gereinigtes Protein isolieren.

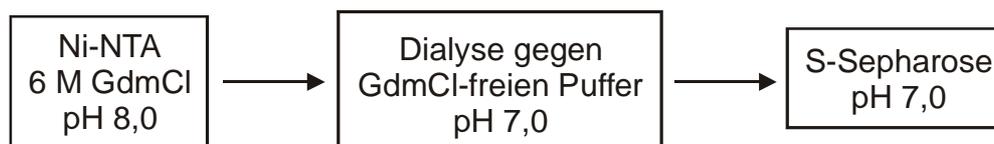


Abb. 3.3.2.2.1: Schema der Reinigung des rh-His₁₀-NGF-Pro-Peptids.

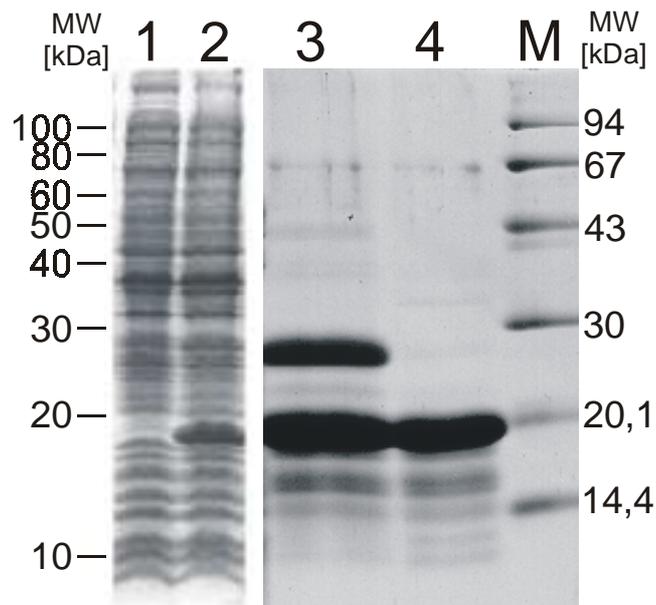


Abb. 3.3.2.2.2: Reinigung des rh-His₁₀-NGF-Pro-Peptids (15%ige (w/v) SDS-PAA-Gele, mit Coomassie gefärbt). M: Molekulargewicht-Standard, 1: Rohextrakt vor Induktion, 2: Rohextrakt 3 h nach Induktion, 3: Eluat der Ni-NTA-Säule, 4: Eluat der S-Sepharose-Säule, M: Protein-Standard.

3.4 Charakterisierung des rekombinanten, humanen NGF-Pro-Peptids

3.4.1 N-terminale Sequenzierung und massenspektrometrische Analyse

Die N-terminale Sequenzierung ergab, dass beim rh-NGF-Pro-Peptid ohne Dekahis-Tag das Start-Methionin bei einem Großteil der Präparationen *in vivo* nicht abgespalten worden war. Die gefundene Sequenz lautete also: MEPH. Daneben wurde aber auch ein Teil gefunden, bei dem das Methionin fehlte (ca. 1/20) bzw. bei dem das erste Glutamat abgespalten war (ca. 1/60). Das Elektrospray-Massenspektrum ergab ein Molekulargewicht von 11.627,4 Da (Abb. 3.4.1 A), welches mit der theoretischen Masse von 11.626,1 Da gut übereinstimmt. Für das rh-NGF-Pro-Peptid mit Dekahis-Tag wurde durch ESI-MS ein Molekulargewicht von 14.264,7 Da ermittelt (Abb. 3.4.1 B). Dies ist ebenfalls in Einklang mit dem theoretischen Wert von 14.261,8 Da.

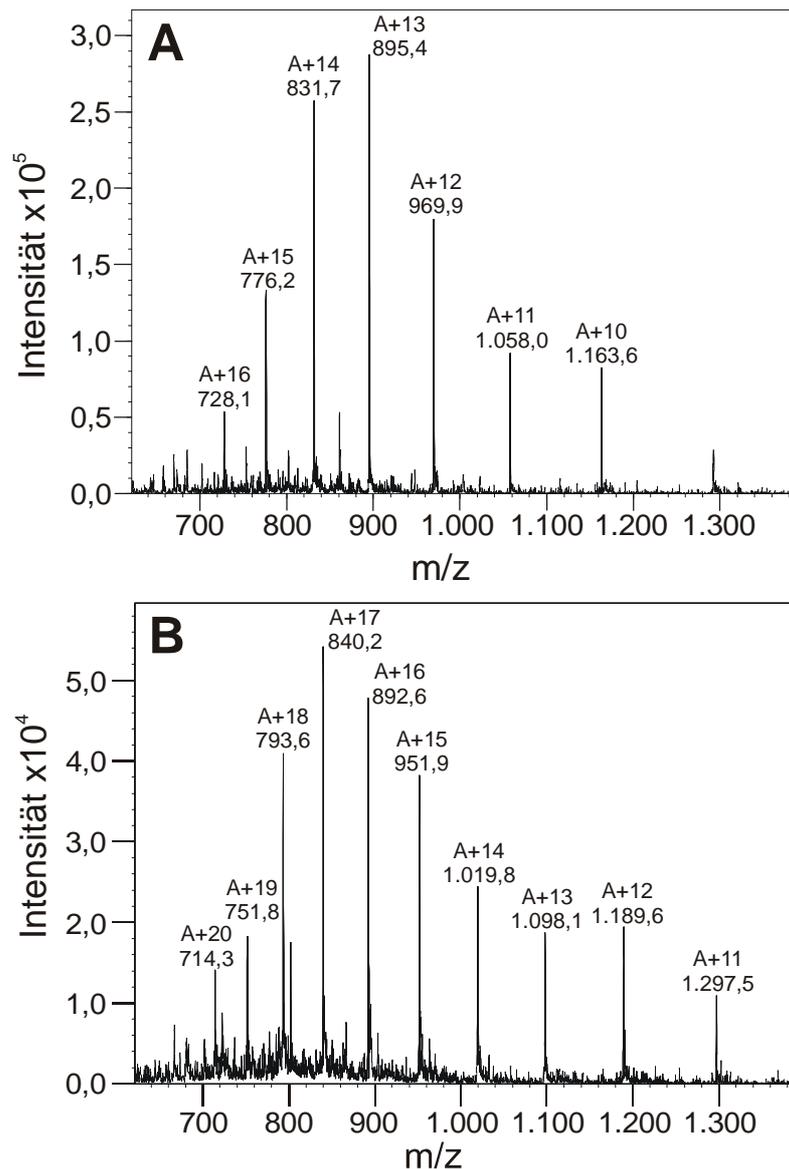


Abb. 3.4.1: Elektrospray-Massenspektren des rh-NGF-Pro-Peptids (A) und des rh-His₁₀-NGF-Pro-Peptids (B) (Ausschnitte).

3.4.2 Untersuchung der Quartärstruktur

Da rh-Pro-NGF dimer ist, galt es zu klären, ob das isolierte Pro-Peptid ebenfalls in der Lage ist, zu dimerisieren um so vielleicht die Dimerisierung des reifen Teils zu unterstützen. Auch für das Pro-Peptid wurden verschiedene Methoden zur Feststellung des oligomeren Zustands angewendet.

3.4.2.1 Analytische Ultrazentrifugation

Für das rh-NGF-Pro-Peptid ließ sich beim Sedimentationslauf (40.000 rpm) kein s-Wert ermitteln. Dies deutet schon darauf hin, dass vermutlich ein Monomer vorliegt. Das Ergebnis des Gleichgewichtslaufs ist in Abb. 3.4.2.1 dargestellt. Die Auswertung der Daten ergab ein Molekulargewicht von 11,49 kDa, welches ebenfalls für ein Monomer spricht. Eine Analyse der UZ-Probe mittels SDS-PAGE zeigte allerdings, dass trotz Zusatz von 1 mM EDTA zum Puffer das Pro-Peptid während der Zentrifugation etwa zu 40 % abgebaut war (Daten nicht gezeigt). Daher musste der oligomere Zustand des Peptids noch mit anderen Methoden analysiert werden.

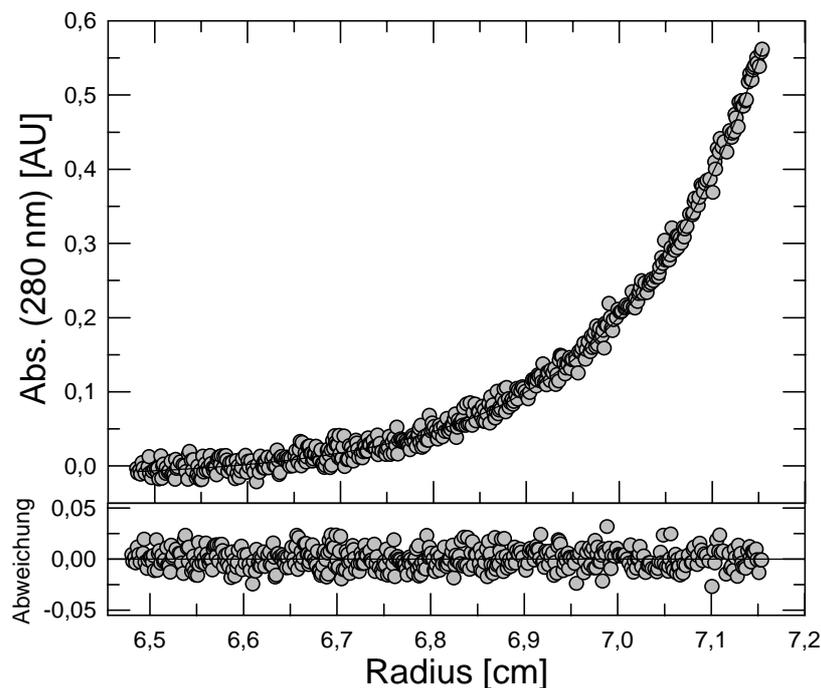


Abb. 3.4.2.1: Analytische Ultrazentrifugation (Gleichgewichtslauf) des rh-NGF-Pro-Peptids. Die Proteinkonzentration betrug 0,20 mg/ml in 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0; 1 mM EDTA. Der Lauf wurde mit 25.000 rpm bei 20°C bis zur Einstellung des Gleichgewichts durchgeführt.

3.4.2.2 Analytische Gelfiltration

Das Ergebnis der analytischen Gelfiltration ist in Abb. 3.4.2.2 dargestellt. Überraschenderweise eluierte das rh-NGF-Pro-Peptid in einem Elutionsvolumen (74,8 ml), das zwischen demjenigen des rh-NGF- (85,1 ml) und rh-Pro-NGF-Dimers (66,9 ml) lag (vgl. Kap. 3.2.3.2). Das Peptid weist also mit einem apparenten Molekulargewicht von 29,8 kDa einen größeren hydrodynamischen Radius auf als das rh-NGF-Dimer. Dies spricht für ein ebenfalls dimeres Pro-Peptid. Aus der Empfindlichkeit des Peptids gegenüber Proteasen kann jedoch geschlossen werden, dass das Protein eine aufgeweitete Struktur und damit einen für gefaltete Proteine untypisch großen hydrodynamischen Radius besitzt. Eine Interpretation des Elutionsverhaltens des Pro-Peptids bezüglich des Assoziationszustandes erscheint daher mittels

Gelfiltration nicht möglich. Während des Laufes wurde das Pro-Peptid nicht proteolytisch abgebaut (Daten nicht gezeigt).

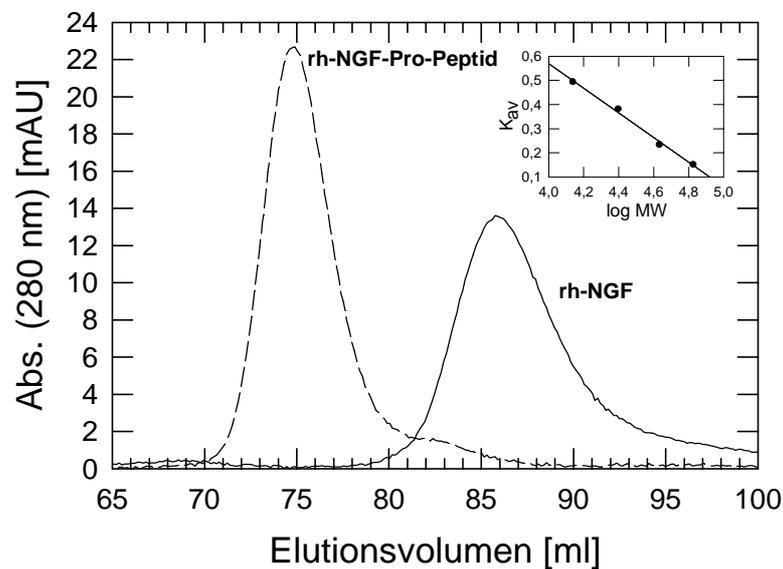
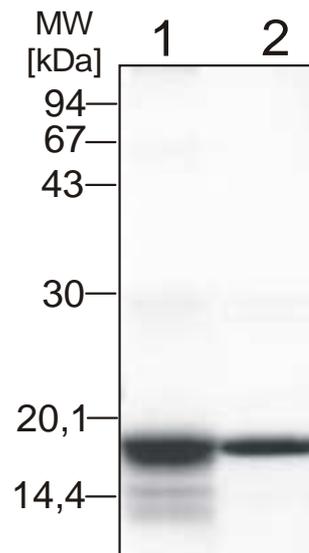


Abb. 3.4.2.2: Analytische Gelfiltration des rh-NGF-Pro-Peptids (-----) und des reifen rh-NGF (—) an Superdex 75 (HiLoad 16/60-Säule von Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden). Die Läufe wurden in 50 mM Natriumphosphat, pH, 7,0; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA bei 7°C durchgeführt. Es wurden jeweils 500 µl Protein aufgetragen (rh-NGF-Pro-Peptid: 1,52 mg; rh-NGF: 0,67 mg). In der kleinen Grafik ist die Eichgerade dargestellt (zur Kalibrierung s. Kap. 2.2.2.12).

3.4.2.3 Chemische Quervernetzung

Der monomere Zustand des rh-NGF-Pro-Peptids wurde schließlich durch chemisches *Crosslinking* mit Glutaraldehyd nachgewiesen. Das SDS-PAA-Gel ist in Abb. 3.4.2.3 dargestellt. Nach Vernetzung wurden neben der ursprünglichen Bande zahlreiche weitere Banden entsprechend kleinerer apparenter Molekulargewichte gefunden. Banden, die Dimeren oder größeren Oligomeren entsprachen, wurden nicht detektiert. Wie lassen sich nun die zusätzlichen Banden nach dem *Crosslinking* erklären? Ein Abbau durch Proteasen kann ausgeschlossen werden, da diese sofort durch Glutaraldehyd inaktiviert worden wären. Das Pro-Peptid ist wahrscheinlich als aufgeweitetes, stark basisches Protein mit sich selbst vernetzt worden. Die entstandenen *Crosslink*-Produkte mit einem geringeren hydrodynamischen Radius sollten daher im SDS-PAA-Gel auf der Höhe kleinerer Molekulargewichte wandern.

Abb. 3.4.2.3: Quervernetzung des rh-NGF-Pro-Peptides mit Glutaraldehyd (15%iges (w/v) SDS-PAA-Gel, Coomassie-Färbung). Das Protein wurde in Gegenwart von 0,01 % Glutaraldehyd über 30 min bei 22°C inkubiert. 1: Quervernetztes Pro-Peptid, 2: Pro-Peptid ohne *Crosslinker*.



3.4.2.4 Untersuchung der Wechselwirkung zwischen rh-NGF-Pro-Peptid und reifem rh-NGF

Im Unterschied zum Pro-Peptid des NGF bildet die Pro-Sequenz des TGF- β 1 ein Dimer aus, welches durch eine intermolekulare Disulfidbrücke stabilisiert wird (Gentry & Nash, 1990). TGF- β 1 ist ebenfalls ein dimerer Wachstumsfaktor mit Cystin-Knoten. Das isolierte Pro-Peptid vermag reifen TGF- β 1 zu binden, wodurch dieser inaktiviert und in eine latente Form überführt wird. *In vivo* hat die Pro-Sequenz des TGF- β 1 daher vermutlich neben seiner Funktion als Faltungshelfer (s. Kap. 1.7) die Aufgabe, die biologische Aktivität des Wachstumsfaktors zu regulieren. Es stellte sich daher die Frage, ob das isolierte Pro-Peptid wie im Falle des TGF- β an reifen NGF zu binden vermag. Da das Peptid offenbar die Faltung des reifen Teils vermittelt, muss es ja in irgendeiner Art und Weise mit diesem in Wechselwirkung treten können. Aus diesem Grund wurde eine mögliche Interaktion zwischen reifem rh-NGF und rh-NGF-Pro-Peptid mit Gelfiltration und PAA-Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen untersucht.

3.4.2.4.1 Analytische Gelfiltration eines Gemischs von reifem rh-NGF und dem Pro-Peptid

Ein Gelfiltrationslauf des Gemischs von reifem rh-NGF und dem Pro-Peptid zeigte überraschenderweise keine Komplexbildung zwischen beiden Proteinen. Es ließen sich lediglich zwei Peaks mit den Elutionsvolumina von isoliertem rh-NGF-Pro-Peptid bzw. rh-NGF detektieren (Abb. 3.4.2.4.1). Die Probe wurde während der Laufs nicht durch Proteasen degradiert (Daten nicht gezeigt).

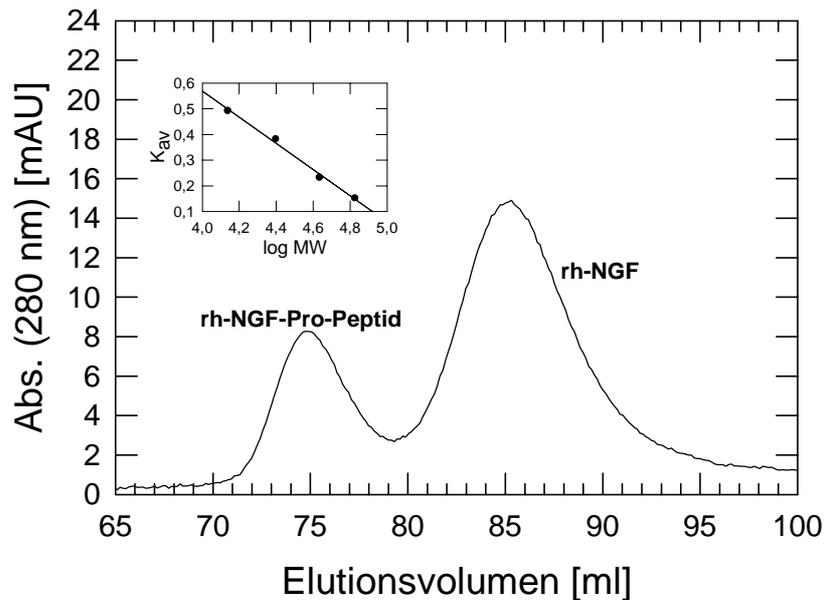


Abb. 3.4.2.4.1: Analytische Gelfiltration eines Gemischs von reifem rh-NGF und rh-NGF-Pro-Peptid an Superdex 75 (HiLoad 16/60-Säule von Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden). Der Lauf wurde in 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA bei 7°C durchgeführt. Es wurde ein Volumen von 500 µl aufgetragen (0,76 mg rh-NGF-Pro-Peptid, 0,28 mg reifer rh-NGF). Die kleine Grafik stellt die Kalibrierung der Säule dar (zur Eichung s. Kap. 2.2.2.12).

3.4.2.4.2 PAGE unter nativen Bedingungen

Eine Wechselwirkung zwischen rh-NGF und dem rh-NGF-Pro-Peptid sollte auch durch Nativ-Gelelektrophorese überprüft werden (Abb. 3.4.2.4.2). Es wurden verschiedene molare Verhältnisse von NGF-Monomer : NGF-Pro-Peptid auf das PAA-Gel aufgetragen. Bei keinem Ansatz fand sich eine zusätzliche Bande auf Höhe des rh-Pro-NGF. Es hatte also keine Komplexbildung stattgefunden. Die Tatsache, dass das Pro-Protein auf der Höhe zwischen NGF und Pro-Peptid lief, lässt sich dadurch erklären, dass bei der PAGE unter nativen Bedingungen sowohl nach Molekülgröße als auch nach Ladung aufgetrennt wird.

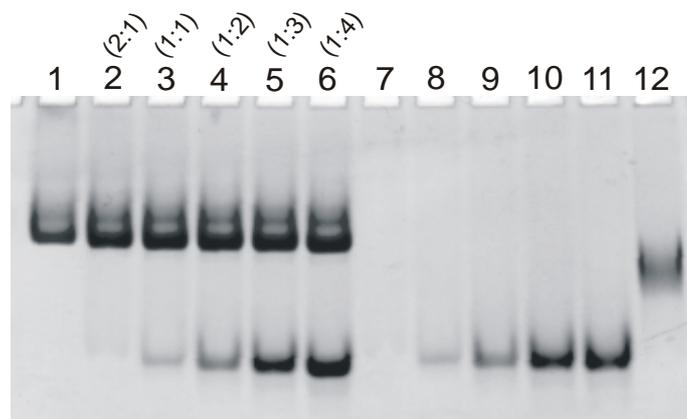


Abb. 3.4.2.4.2: Nativ-Gelelektrophorese von rh-NGF mit verschiedenen Pro-Peptid-Konzentrationen (11%iges (w/v) Acrylamidgel, Coomassie-Färbung). 1: rh-NGF, 2 bis 6: rh-NGF und verschiedene Mengen rh-NGF-Pro-Peptid (in Klammern angegeben sind die molaren Verhältnisse rh-NGF-Monomer : rh-NGF-Pro-Peptid), 7 bis 11: rh-NGF-Pro-Peptid (Auftrag gleicher Mengen Peptid wie in Proben 2 bis 6), 12: rh-Pro-NGF. Die Gemische von rh-NGF mit dem Pro-Peptid wurden vor der elektrophoretischen Auftrennung 20 min bei 22°C inkubiert.

Die bisher erhaltenen Daten zur Charakterisierung des NGF-Pro-Peptids zeigen, dass das NGF-Pro-Peptid im Gegensatz zum Pro-Protein monomer ist. Darüber hinaus besitzt es einen großen hydrodynamischen Radius, der auf eine aufgeweitete Struktur hindeutet. Dies wird auch belegt durch die vollständige Degradation des Pro-Peptids während der limitierten Proteolyse des rh-Pro-NGF durch Trypsin und die Empfindlichkeit des Pro-Peptids gegenüber Proteasen während der Isolierung aus dem *E. coli*-Rohextrakt oder während der Lagerung. Obwohl die Pro-Sequenz die Faltung des Nervenwachstumsfaktors vermittelt, ist sie jedoch überraschenderweise nicht in der Lage, an nativen, reifen NGF zu binden. Auf die Untersuchung der Wechselwirkung von isoliertem rh-NGF-Pro-Peptid mit rh-NGF-Faltungsintermediaten wird in Kap. 3.5. eingegangen.

3.4.3 Spektrale Eigenschaften des Pro-Peptids

Das rh-NGF-Pro-Peptid enthält, wie eingangs erwähnt, einen Tryptophan- sowie vier Phenylalaninreste. Die Gestalt der UV-Absorptions- sowie Fluoreszenzspektren wird folglich von diesem Tryptophanrest (Trp-85) dominiert, eine Tatsache, die eine eingehende Untersuchung der strukturellen Umgebung dieser Aminosäure durch spektroskopische Experimente ermöglicht.

3.4.3.1 UV-Absorption

Das UV-Absorptionsspektrum des Pro-Peptids ist in Abb. 3.4.3.1 dargestellt. Das Absorptionsmaximum bei 280 nm sowie die Schulter bei 290 nm werden durch das Tryptophan hervorgerufen. Die schwach ausgeprägten Schultern im Bereich von 255 bis 275 nm sind durch die Absorption der Phenylalaninreste bedingt.

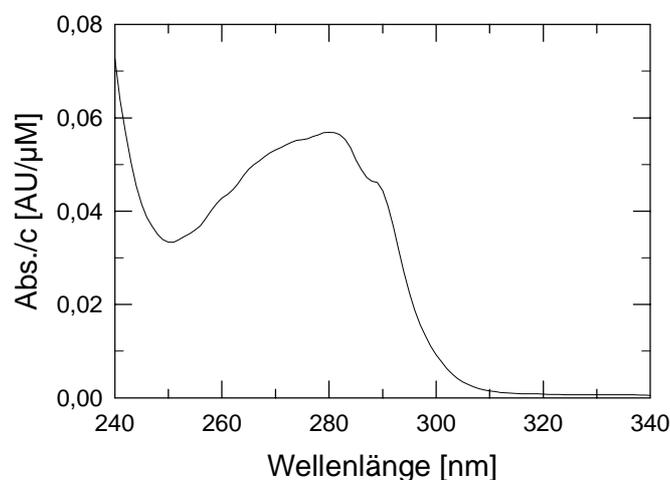


Abb. 3.4.3.1: UV-Absorptionsspektrum des rh-NGF-Pro-Peptids. Die Proteinkonzentration betrug 1,75 mg/ml. Als Puffer wurde 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0; 1 mM EDTA verwendet. Das Spektrum wurde auf die molare Konzentration normiert und gegen den Puffer korrigiert.

3.4.3.2 Fluoreszenz-Emissionsspektren

Die Fluoreszenz-Emissionsspektren des NGF-Pro-Peptids in guanidiniumfreiem Puffer und in Anwesenheit von 6 M GdmCl unterscheiden sich kaum (Abb. 3.4.3.2.1). Das Fluoreszenzmaximum des Peptids in Denaturierungspuffer ist nur um 3 nm zu längeren Wellenlängen hin verschoben: von 347 nm zu 350 nm. Die Gesamtfluoreszenz bleibt in etwa konstant. Diese Befunde belegen, dass der Tryptophanrest des isolierten Pro-Peptids lösungsmittel exponiert ist.

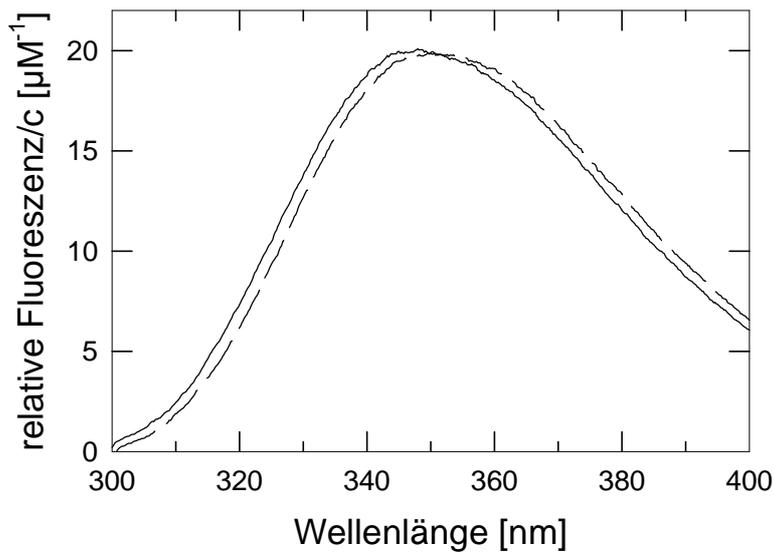


Abb. 3.4.3.2.1: Fluoreszenz-Emissionsspektren des nativen (—) und denaturierten (-----) rh-NGF-Pro-Peptids. Die Anregungswellenlänge betrug 280 nm. Die Spektren wurden in 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0; 1 mM EDTA mit bzw. ohne Zusatz von 6 M GdmCl bei 20°C aufgenommen. Die Proteinkonzentration betrug 20 μg/ml. Die Spektren wurden auf die molare Konzentration bezogen und gegen den Puffer korrigiert.

Die Empfindlichkeit gegenüber Proteasen, der große hydrodynamische Radius und der exponierte Tryptophanrest belegen die aufgeweitete Struktur des rh-NGF-Pro-Peptids. Nun war es interessant zu erfahren, ob eine Stabilisierung des Pro-Peptids zu einer Strukturänderung bzw. -induktion führt. Hierzu wurde es mit hohen Konzentrationen von Ammoniumsulfat inkubiert, was generell eine stabilisierende Wirkung auf Proteine ausübt (Creighton, 1993). Das Fluoreszenzemissionsspektrum des rh-NGF-Pro-Peptids in Anwesenheit von 1,5 M Ammoniumsulfat ist in Abb. 3.4.3.2.2 gezeigt. Tatsächlich kommt es in Gegenwart dieses Salzes zu einer Konformationsänderung im Protein: das Emissionsmaximum ist deutlich blauverschoben (von 349 nach 339 nm). Dies bedeutet, dass der Tryptophanrest sich in Anwesenheit von Ammoniumsulfat in hydrophoberer Umgebung, also weiter im Innern des Pro-Peptids befindet.

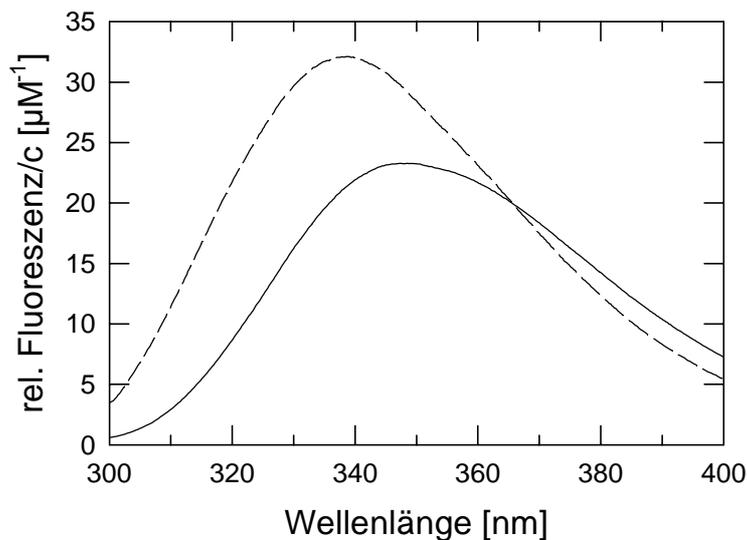


Abb. 3.4.3.2.2: Fluoreszenz-Emissionsspektrum des rh-NGF-Pro-Peptids in Anwesenheit (-----) bzw. Abwesenheit (—) von 1,5 M Ammoniumsulfat. Die Spektren wurden in 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0; 1 mM EDTA bei 20°C und einer Anregungswellenlänge von 280 nm registriert und gegen den Puffer korrigiert. Die Proteinkonzentration betrug 20 µg/ml bei der Messung ohne und 50 µg/ml bei der Bestimmung mit (NH₄)₂SO₄. Die Spektren wurden auf die molaren Konzentrationen bezogen.

3.4.3.3 Circular dichroismus

Die Circular dichroismus-Spektren des nativen und denaturierten rh-NGF-Pro-Peptids sind in Abb. 3.4.3.3.1 dargestellt. Das Fern-UV-CD-Spektrum (Grafik A) weist ein tiefes Minimum bei 201 nm sowie eine Schulter im Bereich von 215 bis 235 nm auf. Die Form deutet auf ein teilweise gefaltetes Protein hin. In Grafik A ist ebenfalls das aus der Differenz der CD-Spektren von rh-Pro-NGF und reifem rh-NGF berechnete Spektrum des rh-NGF-Pro-Peptids dargestellt (schwarze Dreiecke). Das gemessene Spektrum ist fast identisch mit dem des berechneten. Daraus lässt sich schließen, dass die Pro-Sequenz im Kontext des reifen Teils kaum an Sekundärstruktur gewinnt. Dem Nah-UV-CD-Spektrum (Grafik B) lässt sich entnehmen, dass tertiäre Kontakte zwar vorhanden sind; die geringe Amplitude könnte jedoch darauf hinweisen, dass nur ein Teil des Moleküls strukturiert ist. Die geringen Signale im Bereich von 260 – 270 nm werden wahrscheinlich durch Phenylalanine hervorgerufen, die sich in asymmetrischer Umgebung befinden. In 6 M GdmCl ist diese Feinstruktur verschwunden, was darauf hindeutet, dass das Pro-Peptid unter diesen Bedingungen vollständig denaturiert ist.

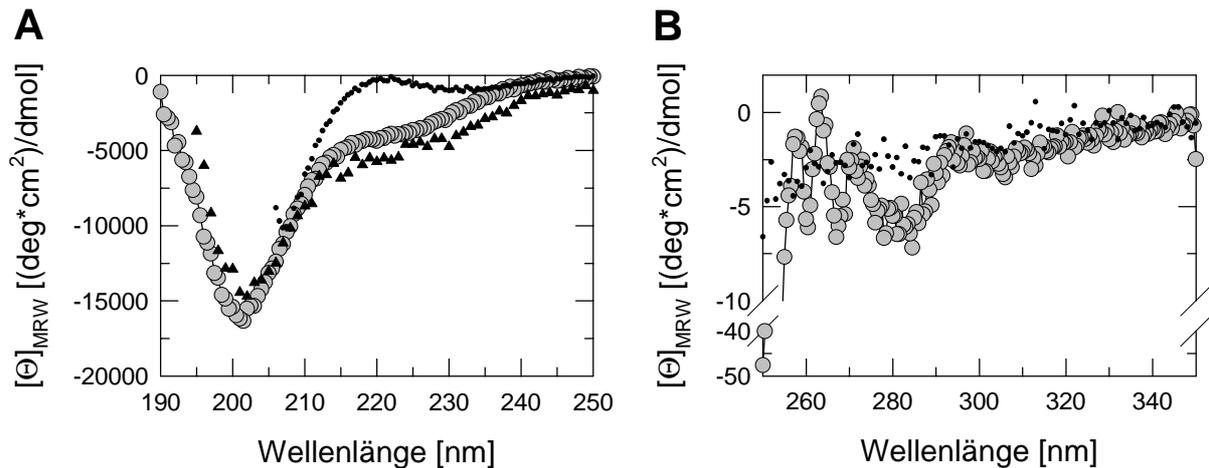


Abb. 3.4.3.3.1: Circulardichroismus-Spektren von nativem (graue Kreise) und denaturiertem (kleine schwarze Punkte) rh-NGF-Pro-Peptid. Als Puffer wurde 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0; 1 mM EDTA mit bzw. ohne 6 M GdmCl verwendet. Alle Messungen wurden bei 20°C durchgeführt und gegen den jeweiligen Puffer korrigiert. **(A) Fern-UV-CD-Spektren.** Die Spektren wurden in einer 0,1 mm-Küvette registriert. Die Proteinkonzentration der Nativ-Probe betrug 1,75 mg/ml, die der denaturierten Probe 3,29 mg/ml. Die kleinen schwarzen Dreiecke stellen das Differenzspektrum von rh-Pro-NGF und rh-NGF dar. **(B) Nah-UV-CD-Spektren.** Beide Spektren wurden in einer 1 cm-Küvette aufgenommen. Die Konzentration des nativen Peptids betrug 1,75 mg/ml, die des denaturierten 0,37 mg/ml.

Da aus den Ergebnissen der Fluoreszenzmessungen bekannt war, dass das Pro-Peptid in Gegenwart von Ammoniumsulfat an Struktur gewinnt, wurde das Fern-UV-CD-Spektrum auch in Anwesenheit dieses Salzes (1 M) untersucht. Das Resultat ist in Abb. 3.4.3.3.2 gezeigt. Die Schulter ist deutlich verstärkt (etwa doppelt so großes Signal), das Minimum ist geringfügig zu größeren Wellenlängen verschoben (202 nm) und sehr viel tiefer. Höhere Konzentrationen Ammoniumsulfat induzieren also tatsächlich eine Zunahme strukturierter Bereiche im rh-NGF-Pro-Peptid.

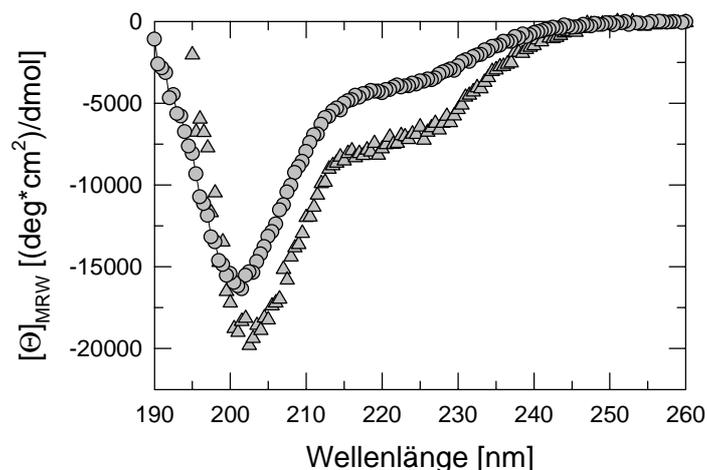


Abb. 3.4.3.3.2: Fern-UV-CD-Spektrum des rh-NGF-Pro-Peptids in Gegenwart von 1 M Ammoniumsulfat (Dreiecke). Die Messung wurde bei 20°C in einer 0,1 mm-Küvette durchgeführt. Die Proteinkonzentration betrug 1,53 mg/ml. Als Puffer wurde 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0 verwendet. Das Spektrum wurde gegen den proteinfreien Puffer korrigiert. Zum Vergleich ist das CD-Spektrum des Pro-Peptids in Abwesenheit von Ammoniumsulfat gezeigt (Kreise).

3.4.3.4 Thermische Stabilität

Da aus den CD-Messungen bekannt war, dass das rh-NGF-Pro-Peptid in Gegenwart von Ammoniumsulfat an Sekundärstruktur gewinnt, wurden die Temperaturübergänge des Peptids mit und ohne Zusatz dieses stabilisierenden Salzes untersucht (Abb. 3.4.3.4). In Anwesenheit von 1 bzw. 1,5 M Ammoniumsulfat wurde ein schwach ausgeprägter, nicht-kooperativer Übergang beobachtet, dessen Bereich sich nicht genau bestimmen ließ. Die Temperaturübergänge waren völlig reversibel. In Abwesenheit von Ammoniumsulfat (graue Kreise) zeigte das rh-NGF-Pro-Peptid jedoch überhaupt keinen Temperaturübergang: die Fluoreszenz nahm ohne sichtbares kooperatives Verhalten mit steigender Temperatur ab. Interessanterweise fand selbst beim Aufheizen des Proteins auf 95°C keine Aggregation statt. Offenbar verhinderte die hohe Dichte positiv geladener Aminosäurereste eine Zusammenlagerung hydrophober Seitenketten bei höheren Temperaturen. Diese Eigenschaft des rh-NGF-Pro-Peptids ist vergleichbar mit derjenigen der Pro-Sequenz von Carboxypeptidase Y. Hier wurde die thermische Entfaltung mittels NMR untersucht. Dieses Pro-Peptid ist beständig gegenüber vollständiger thermischer Entfaltung bis 90°C (Sørensen *et al.*, 1993).

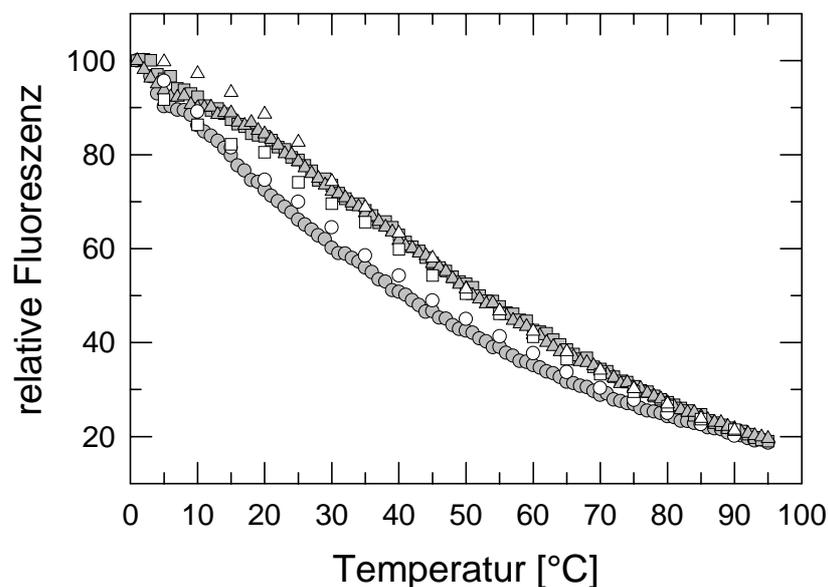


Abb. 3.4.3.4: Temperaturübergänge des rh-NGF-Pro-Peptids in An- bzw. Abwesenheit von Ammoniumsulfat. Die Messungen wurden bei 20°C in 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0; 1 mM EDTA durchgeführt. Die Proteinkonzentration betrug 20 µg/ml. Als Anregungswellenlänge wurde 280 nm gewählt, als Emissionswellenlänge 340 nm. Symbole: Kreise: kein Ammoniumsulfat-Zusatz, Quadrate: 1 M Ammoniumsulfat, Dreiecke: 1,5 M Ammoniumsulfat. Die grauen Symbole stellen die Aufheizphasen dar, die weißen die Abkühlkurven.

3.4.3.5 1D-1H-NMR-Spektren

In Abb. 3.4.3.5 A ist das 1D-1H-NMR-Spektrum des rh-NGF-Pro-Peptids mit Dekahis-*Tag* dargestellt. Das kleine Signal bei einer chemischen Verschiebung von 10,2 ppm wird durch das NH-Proton des Tryptophan-Indols hervorgerufen, welches Protonen mit dem Puffer austauschen kann. Dies belegt die Exposition dieses Aminosäurerests zum Lösungsmittel. Würde das Tryptophan im Innern des Proteins liegen, so würde das Signal aufspalten. In der Region von 6,7 bis 8,7 ppm befindet sich der Resonanzbereich aromatischer Protonen. Links und rechts davon, also im Bereich von etwa 5,0 bis 6,7 und 8,7 bis 10 ppm, werden überhaupt keine Signale detektiert. Dies wäre bei einem typischen gefalteten Protein nicht der Fall und deutet daher auf ein ungefaltetes Peptid hin. In einem gefalteten Molekül spaltet der Bereich, in dem die Resonanzen der aromatischen Ring-Protonen liegen, viel stärker auf. Dieser Befund wird durch die Tatsache belegt, dass im Bereich von 0 ppm keine Signale registriert werden. In einem kompakten, strukturierten Protein würden bei dieser chemischen Verschiebung abgeschirmte Methyl-Protonen Resonanzen hervorrufen. Geringfügige Sekundärstruktur-Anteile (bis ca. 10 % α -Helix oder β -Faltblatt) lassen sich mit der Methode der Kernspinresonanz jedoch nicht erfassen (Dr. Peter Bayer, persönliche Mitteilung).

Anders im Falle des rh-Pro-NGF (Abb. 3.4.3.5 B): Hier ist das Signal bei 10,2 ppm verschwunden. Dies bedeutet, dass das Tryptophan der Pro-Sequenz hier mehr im Innern des Proteins lokalisiert ist im Vergleich zum isolierten Pro-Peptid. Dies steht im Einklang mit der spektroskopischen Charakterisierung mittels Fluoreszenz- und CD-Spektroskopie. Auch im Bereich um 0 ppm lassen sich noch einige schwache Resonanzen detektieren, die durch CH₃-Protonen im Innern des Proteins hervorgerufen werden. Das Pro-Protein ist also im Gegensatz zum Pro-Peptid deutlich strukturiert und kompakt.

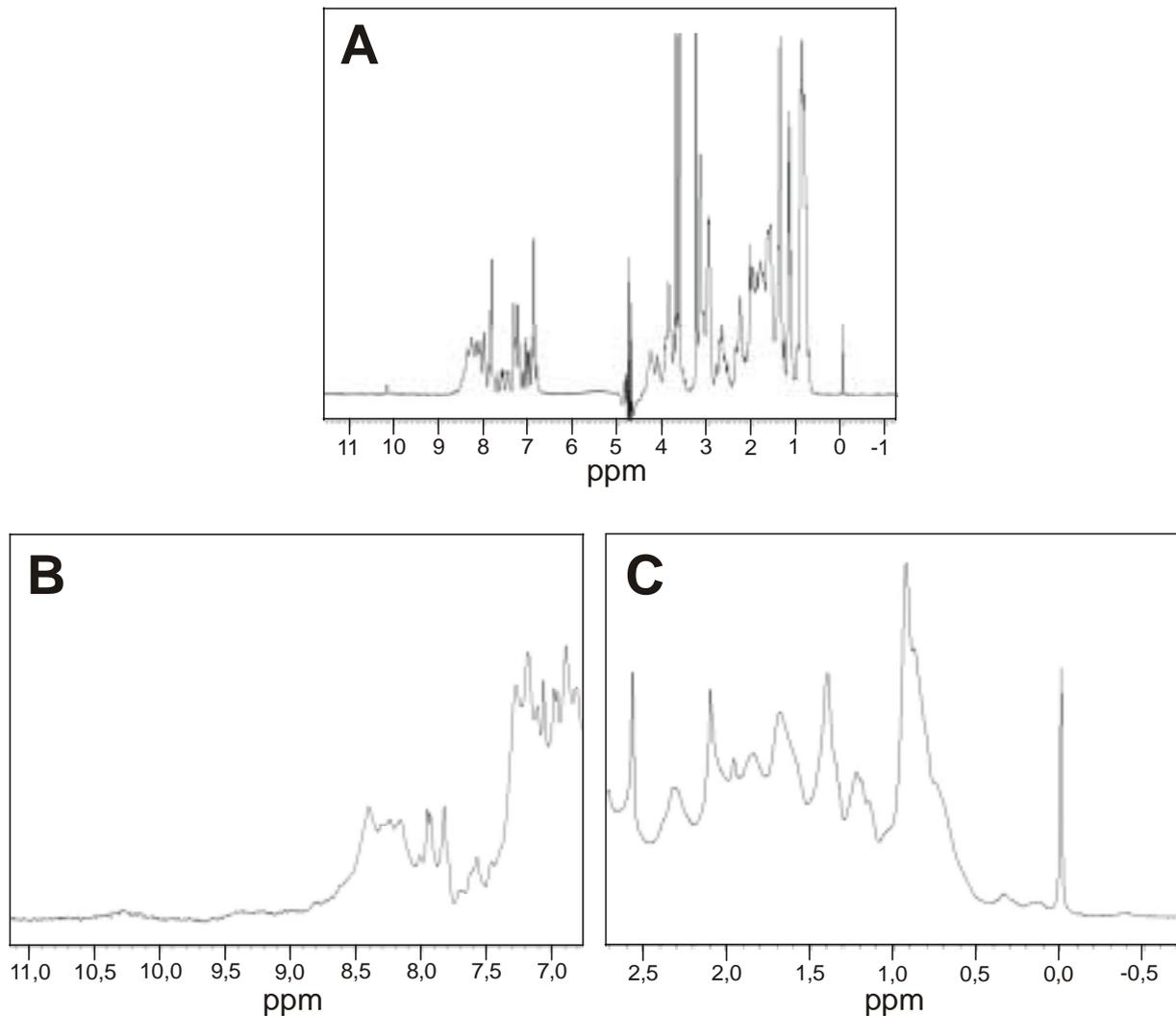


Abb. 3.4.3.5: (A) 1D-1H-NMR-Spektrum des rh-His₁₀-NGF-Pro-Peptides. Das Spektrum wurde bei 27°C aufgenommen. Die Proteinkonzentration betrug 3,64 mg/ml in 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0; 1 mM EDTA. (B) und (C) 1D-1H-NMR-Spektrum von rh-Pro-NGF (Ausschnitte). Die Messung wurde ebenfalls bei 27°C im gleichen Puffer (c = 1,43 mg/ml) durchgeführt. Als interner Standard wurde DSS (2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat) verwendet.

3.4.4 Untersuchung der biologischen Aktivität des rh-NGF-Pro-Peptides

Analog zum rh-Pro-NGF sollte nun auch die biologische Aktivität des isolierten rh-NGF-Pro-Peptides im *DRG-Assay* untersucht werden. Wie aus Abb. 3.4.4 hervorgeht, bewirkte letzteres ebenfalls ein Überleben der Neuronen. Für die Pro-Sequenz ergab sich ein EC_{50} -Wert von 596 ± 35 pg/ml. Im Vergleich dazu betrug der für rh-NGF gefundene EC_{50} -Wert 119 ± 8 pg/ml, was bedeutet, dass die Aktivität des reifen rh-NGF im *DRG-Test* 4,8-mal höher war als die des NGF-Pro-Peptides. Die Aktivität des Pro-Peptides lag aber immerhin noch in der gleichen Größenordnung. Eine genaue Identifizierung der Rezeptoren für das NGF-Pro-Peptid bzw. für die beiden Peptide sowie eine eingehende Untersuchung ihrer biologischen Funktion steht noch aus.

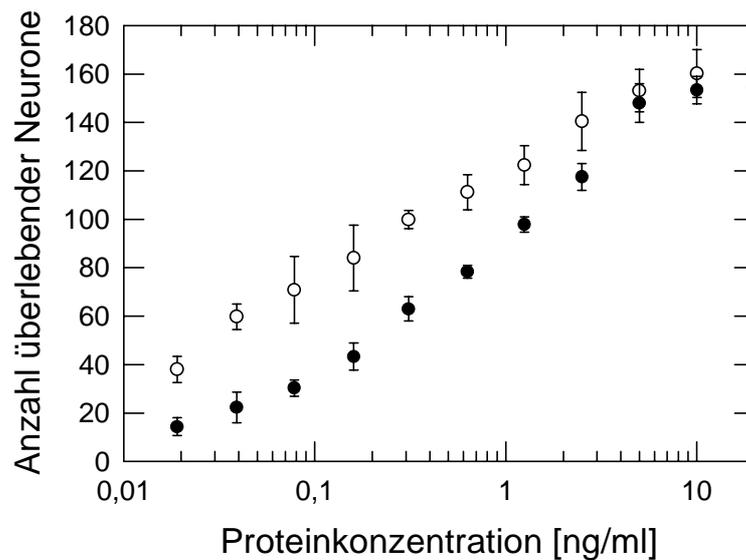


Abb. 3.4.4: Untersuchung der biologischen Aktivität des rh-NGF-Pro-Peptids mittels DRG-Assay (schwarze Kreise). Die Ergebnisse stellen die Durchschnittswerte jeweils zweier Präparationen dar. Für jede Präparation wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Zum Vergleich ist die Aktivitätsbestimmung des rh-NGF-Standards als weiße Kreise abgebildet. Die gefundenen EC_{50} -Werte sind im Text angegeben.

Die hier erhaltenen Ergebnisse sind im Einklang mit Befunden von Dicou und Mitarbeitern. In der Pro-Sequenz von NGF existieren zwei Peptidsequenzen, die von basischen Aminosäurepaaren flankiert sind (Kap. 1.2). Diese Peptide werden in Ratten auch *in vivo* gebildet und zeigen biologische Aktivität (Dicou *et al.*, 1997). Die synthetisch hergestellten Peptide Ala-71 bis Lys-43 (LIP1) bzw. Leu-40 bis Ser-3 (LIP2) aus der NGF-Pro-Sequenz der Ratte bewirken jedoch keine Neuritenbildung in der neuronalen Zelllinie PC12 oder in präparierten Hinterwurzelganglien. Sie rufen jedoch eine rasche Umverteilung von F-Aktin in PC12-Zellen hervor. Mit der Epithelzelllinie B5 wird keine entsprechende Reaktion beobachtet. Die Peptide scheinen also spezifisch auf neuronale Zellen zu reagieren. Außerdem induzieren beide Peptide eine Phosphorylierung des TrkA-Rezeptors. Intracerebroventrikuläre Injektionen der Peptide in neugeborene Ratten führen zu einem Anstieg der Cholin-Acetyltransferase- und Acetylcholinesterase-Aktivität im Vorderhirn. Werden spezifische Antikörper gegen diese Peptide appliziert, so ist die Aktivität dieser Enzyme signifikant verringert (Clos & Dicou, 1997). LIP2 bindet an B5-Zellen mit einer hoch- und einer niedrigaffinen Bindungsstelle. Durch chemische Quervernetzung wurden zwei Rezeptoren mit einer Größe von etwa 140-145 kDa bzw 93 kDa für LIP2 identifiziert (Dicou *et al.*, 1997).

3.4.5 Zusammenfassung von Kapitel 3.4

Die spektroskopischen Analysen ergaben, dass das isolierte rh-NGF-Pro-Peptid zwar Sekundärstruktur, jedoch nur wenig tertiäre Kontakte besitzt. Es enthält ein Tryptophan, das fast völlig lösungsmittlexponiert, im Kontext des maturen Teils jedoch abgeschirmt ist. In Gegenwart höherer Konzentrationen Ammoniumsulfat (1 bis 1,5 M) werden die intramolekularen Wechselwirkungen hydrophober Aminosäurereste verstärkt, und die Position des Tryptophans verlagert sich weiter ins Innere des Proteins, was eine Blauverschiebung des Fluoreszenzmaximums hervorruft. Im *DRG-Assay* zeigte das isolierte rh-NGF-Pro-Peptid biologische Aktivität. Über welchen Rezeptor diese vermittelt wird, ist noch unbekannt.

3.5 Faltung von reifem, humanen NGF in Gegenwart des isolierten rh-NGF-Pro-Peptids (Renaturierung *in trans*)

Viele Pro-Peptide, die die Faltung des jeweiligen reifen Proteins vermitteln, können ihre Wirkung auch *in trans* entfalten. Dies bedeutet, dass keine kovalente Bindung zwischen Pro-Sequenz und reifem Protein nötig ist. Im Vergleich dazu wird die Renaturierung in Gegenwart des kovalent gebundenen Pro-Peptids als Faltung *in cis* bezeichnet. Die Ausbeute der Faltung *in trans* ist jedoch im Vergleich zur Renaturierung *in cis* erheblich verringert. Die Renaturierung *in trans* wurde bisher hauptsächlich mit Proteasen wie z.B. Subtilisin (Zhu *et al.*, 1989), α -Lytischer Protease (Silen & Agard, 1989), Elastase (Braun *et al.*, 1996) und Carboxypeptidase Y (Winther *et al.*, 1994) untersucht. Bei letzterer fand eine Wechselwirkung zwischen Pro-Peptid und reifem Teil jedoch nur in Anwesenheit von 0,9 M Ammoniumsulfat statt. Ohne Zusatz dieses Salzes war die Renaturierung nicht erfolgreich. Die reifen Proteasen falten in Abwesenheit der Pro-Peptide zu löslichen, jedoch inaktiven Intermediaten. Nach Zugabe der jeweiligen Pro-Peptide gehen sie in die aktive Form über. *In trans* wurden neben den oben genannten Proteasen auch erfolgreich eine Lipase (Hobson *et al.*, 1993) sowie Activin A und TGF- β 1 renaturiert (Gray & Mason, 1990). Activin A und TGF- β 1 sind dimere Cystin-Knoten-Proteine wie β -NGF. *In vivo*-Faltung von Activin A bzw. TGF- β 1 *in trans* lieferte allerdings Sekretionsraten von lediglich 9 bzw. 2,4 %. Die Ausbeute der Sekretion *in cis* wurde dabei 100 % gesetzt.

Aus den in Kap. 3.4.2.4 beschriebenen Untersuchungen geht hervor, dass das isolierte rh-NGF-Pro-Peptid nicht an nativen reifen rh-NGF zu binden vermag. Dies weist darauf hin, dass die Funktion des Pro-Peptids als Faltungshelfer vermutlich darin besteht, die Aggregation eines bestimmten oder auch mehrerer hydrophober Faltungsintermediate zu verhindern. Aus diesem

Grund sollte die Renaturierung des reduzierten, reifen rh-NGF in Gegenwart der isolierten Pro-Sequenz analysiert werden. Dazu wurden für die entsprechenden Faltungsexperimente identische Pufferbedingungen wie für die Renaturierung *in cis* verwendet. Die NGF-Monomerkonzentration betrug ebenfalls 2 μM (26 $\mu\text{g/ml}$). Es wurde 48 h bei 10°C im Pro-NGF-Faltungspuffer inkubiert. Die Faltung wurde in Ab- sowie Anwesenheit von rh-His₁₀-NGF-Pro-Peptid untersucht (5-, 10- bzw. 15-molarer Überschuss Pro-Peptid). Als Kontrolle wurde reduzierter, reifer rh-NGF auch zusammen mit einem 15-fachen molaren Überschuss Lysozym inkubiert. Lysozym ist, wie das NGF-Pro-Peptid, ein basisches Protein mit einem theoretischen pI von 9,32. Außerdem besitzt es ein vergleichbares Molekulargewicht von 14.305,1 Da. Die Faltungsausbeute wurde mittels RP-HPLC analysiert. Es ließ sich jedoch kein positiver Einfluss des Pro-Peptids auf die Renaturierungsausbeute von rh-NGF beobachten. Frühere Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe zur *in vivo*-Faltung von β -NGF *in trans* waren ebenfalls negativ (Suter *et al.*, 1991). Im Gegensatz zu den inaktiven Faltungsintermediaten der untersuchten Proteasen aggregieren die Faltungsintermediate des NGF offenbar schnell und nahezu quantitativ. Damit stehen sie für eine Wechselwirkung mit dem Pro-Peptid nicht mehr zur Verfügung. Ein weiterer möglicher Grund könnte darin bestehen, dass unter den hier verwendeten Renaturierungsbedingungen (1 M L-Arginin) keine hinreichend stabilen Wechselwirkungen zwischen Pro-Peptid und reifem rh-NGF ausgebildet werden konnten. Bei einer kovalenten Verknüpfung der Pro-Sequenz mit dem reifen NGF können außerdem sehr viel größere molare Konzentrationen des Pro-Peptids in der Nähe des murenen Teils erreicht werden.

Weitere Möglichkeiten für eine erfolgreiche Faltung von reifem rh-NGF *in trans* und für die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Pro-Peptid und Faltungsintermediaten des rh-NGF werden in Kap. 4 (Zusammenfassung und Ausblick) diskutiert.

3.6 Vergleich der oxidativen Faltung von rh-NGF und rh-Pro-NGF

Nachdem die rh-Pro-NGF Faltungsexperimente gezeigt hatten, dass die kovalent gebundene Pro-Sequenz die Renaturierungsausbeute drastisch erhöht, sollte nun die oxidative Faltung des rh-Pro-NGF mit der des reifen rh-NGF verglichen werden.

Ein Vergleich der Faltungsausbeuten von rh-Pro-NGF und rh-NGF unter identischen Renaturierungsbedingungen ist in Abb. 3.6 dargestellt. Die Renaturierungsausbeute an rh-NGF betrug nach 25 h bei 10°C lediglich 0,5 %. Sie konnte nicht wesentlich durch Erniedrigung der

Temperatur auf 4°C erhöht werden. Im Vergleich dazu war die Faltung des rh-Pro-NGF wesentlich schneller und effizienter: Die Renaturierung war nach ca. 3 h abgeschlossen, und die Renaturierungsausbeute nach dieser Zeit betrug etwa 35 %. Offenbar kam es im Falle der oxidativen Renaturierung des reifen Proteins fast vollständig zur Ausbildung falsch gefalteter, hydrophober Spezies, die nahezu vollständig aggregierten. Aber auch im Fall von rh-Pro-NGF verlief die Renaturierung nicht quantitativ. Aggregatbildung wurde auch hier beobachtet (Daten nicht gezeigt); diese war aber im Vergleich zur Faltung des reifen Proteins deutlich verringert. Zusätzlich könnten auch lösliche *Dead End*-Intermediate zu einer Erniedrigung der Renaturierungsausbeute beigetragen haben. Um die Unterschiede der oxidativen Faltung von rh-NGF und rh-Pro-NGF näher zu untersuchen, sollten die disulfidverbrückten Intermediate analysiert werden. Diese Untersuchungen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Gennaro Marino und Prof. Piero Pucci (Università „Federico II“, Neapel, Italien) durchgeführt.

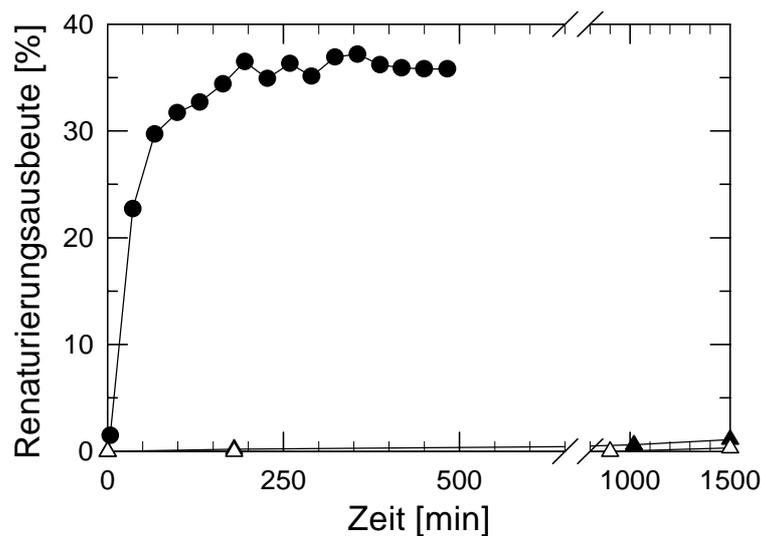


Abb. 3.6: Zeitabhängigkeit der oxidativen Faltung von rh-Pro-NGF und rh-NGF. Beide Proteine wurden ad 2 μ M (Monomerkonzentration) in 100 mM Tris/HCl, pH 9,5; 1 M L-Arginin; 5 mM GSH; 1 mM GSSG; 1 mM EDTA verdünnt und zu den angegebenen Zeiten mittels RP-HPLC analysiert. Symbole: Schwarze Kreise: Faltung von rh-Pro-NGF, weiße Dreiecke: Renaturierung von rh-NGF bei 10°C, schwarze Dreiecke: Faltungskinetik von rh-NGF bei 4°C.

Die Identifizierung disulfidverbrückter Faltungs-Zwischenprodukte erfolgte mittels Elektrospray-Massenspektrometrie (ESI-MS). Dabzu wurde die Renaturierung zu bestimmten Zeiten durch Zugabe von Iodacetamid gestoppt. Diese Substanz alkyliert freie Thiole der Intermediate durch die Einführung einer Carboxyamidomethyl-Gruppe. Dies führt zu einer Erhöhung des Molekulargewichts um 57 Da pro modifizierte SH-Gruppe. Dadurch lassen sich Intermediate mit einer unterschiedlichen Anzahl Disulfidbrücken nicht nur unterscheiden,

Spezies	gemessenes Molekulargewicht [Da]	berechnetes Molekulargewicht [Da]	Anzahl theoretisch möglicher Isomere
6H	25.218,7 ± 2,0	25.217,4	1
1G5H	25.467,8 ± 3,9	25.466,0	6
1S4H	25.101,8 ± 2,1	25.101,3	15
1S1G3H	25.352,9 ± 3,3	25.349,9	60
2S2H	24.985,9 ± 2,3	24.985,3	90
2S1G1H	25.233,9 ± 1,0	25.233,9	180
3S	24.869,8 ± 1,8	24.869,3	15

Tab. 3.6.1: ESI-MS-Analyse der bei der Renaturierung von rh-Pro-NGF gefundenen Faltungsintermediate.
Zur Bezeichnung der verschiedenen Spezies: siehe Abb. 3.6.1.1.

Der relative Anteil an löslichen Faltungsintermediaten während der Renaturierung von rh-Pro-NGF ist in Abb. 3.6.1.2 gezeigt. Vollständig reduzierter rh-Pro-NGF verschwand rasch aus dem Faltungsansatz und war bereits nach 10 min nicht mehr detektierbar. Die Bildung der vollständig oxidierten Spezies setzte erst nach etwa 10 min ein. Diese Dauer war offenbar notwendig für die Bildung der Vorläuferintermediate des produktiven rh-Pro-NGF-Faltungswegs. Nach etwa 2 h erreichte der Anteil der 3S-Spezies einen konstanten Wert von etwa 75 %. Diese Population schien in einem Gleichgewicht mit der Spezies 2S2H zu co-existieren. Es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass das/die 2S2H-Intermediat(e) ein oder mehrere *Dead End*-Intermediate darstellten, die in einem nicht-produktiven Faltungsweg gefangen waren. Die gemischten Disulfide 1G1H und 1S1G3H akkumulierten während der gesamten beobachteten Zeit nicht über einen relativen Anteil von 10 % hinaus, eine Tatsache, die darauf hindeutet, dass diese Spezies schnell zu Intermediaten mit einer größeren Anzahl intramolekularer Disulfidbrücken oxidiert wurden. Im Gegensatz dazu ließ sich die Spezies 2S1G1H auch noch zu relativ späten Zeiten (bis zu 1 h) nachweisen. Diese Spezies traten zusammen mit der 3S-Spezies auf, also nach ca. 10 min. Gemischte Disulfide mit mehr als einem Glutathionyl-Rest wurden nicht beobachtet.

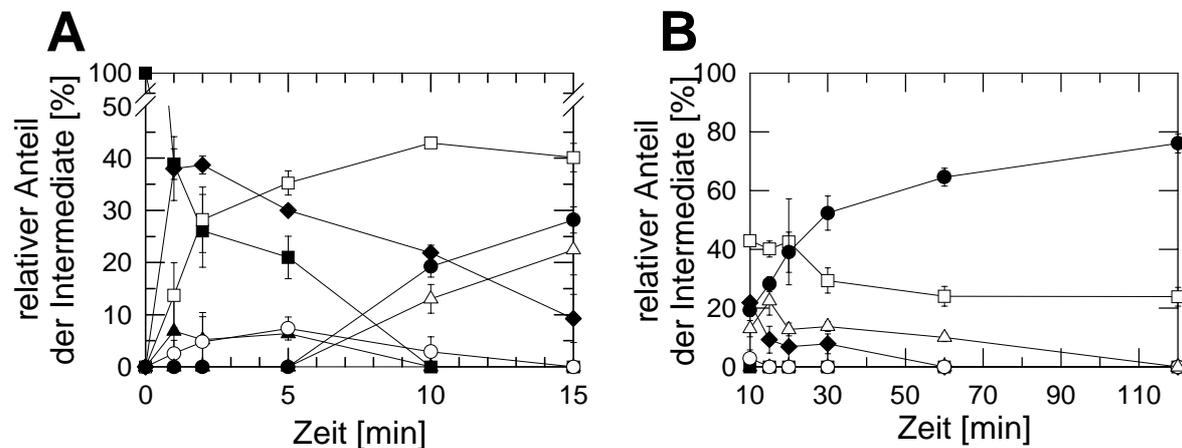


Abb. 3.6.1.2: Relativer Anteil der löslichen Intermediate bei der oxidativen Faltung von rh-Pro-NGF. Das denaturierte, reduzierte Protein wurde ad 50 µg/ml in 100 mM Tris/HCl, pH 9,5; 1 M L-Arginin; 5 mM GSH; 1 mM GSSG; 5 mM EDTA renaturiert und die Intermediate zu den angegebenen Zeiten durch Zugabe von Iodacetamid alkyliert. Anschließend wurden die Proben sofort durch RP-HPLC in einem steilen Acetonitril-Gradienten entsalzt und mit ESI-MS analysiert. Grafik A: Nachgewiesene Intermediate während der ersten 15 min nach Beginn der Faltung. Zur besseren Übersichtlichkeit ist die y-Achse geteilt worden. Grafik B: Disulfidverbrückte Spezies 10 – 120 min nach Beginn der Renaturierung. Symbole: 6H (■), 1G5H (▲), 1S4H (◆), 1S1G3H (○), 2S2H (□), 2S1G1H (△), 3S (●).

Die auftretenden Intermediate sollten nun eingehender untersucht werden. Dazu wurde die Faltung zu verschiedenen Zeiten durch Ansäuern gestoppt und die Intermediate durch RP-HPLC (s. Kap. 2.2.8.1.2) aufgetrennt. Dabei wurde ein flacherer Gradient verwendet als bei den Untersuchungen im vorhergehenden Abschnitt, um nach Möglichkeit einzelne Spezies voneinander trennen zu können. Anschließend wurden die einzelnen Fraktionen mit Iodacetamid alkyliert, erneut entsalzt und durch ESI-MS analysiert. Die RP-HPLC-Chromatogramme sind in Abb. 3.6.1.3 dargestellt.

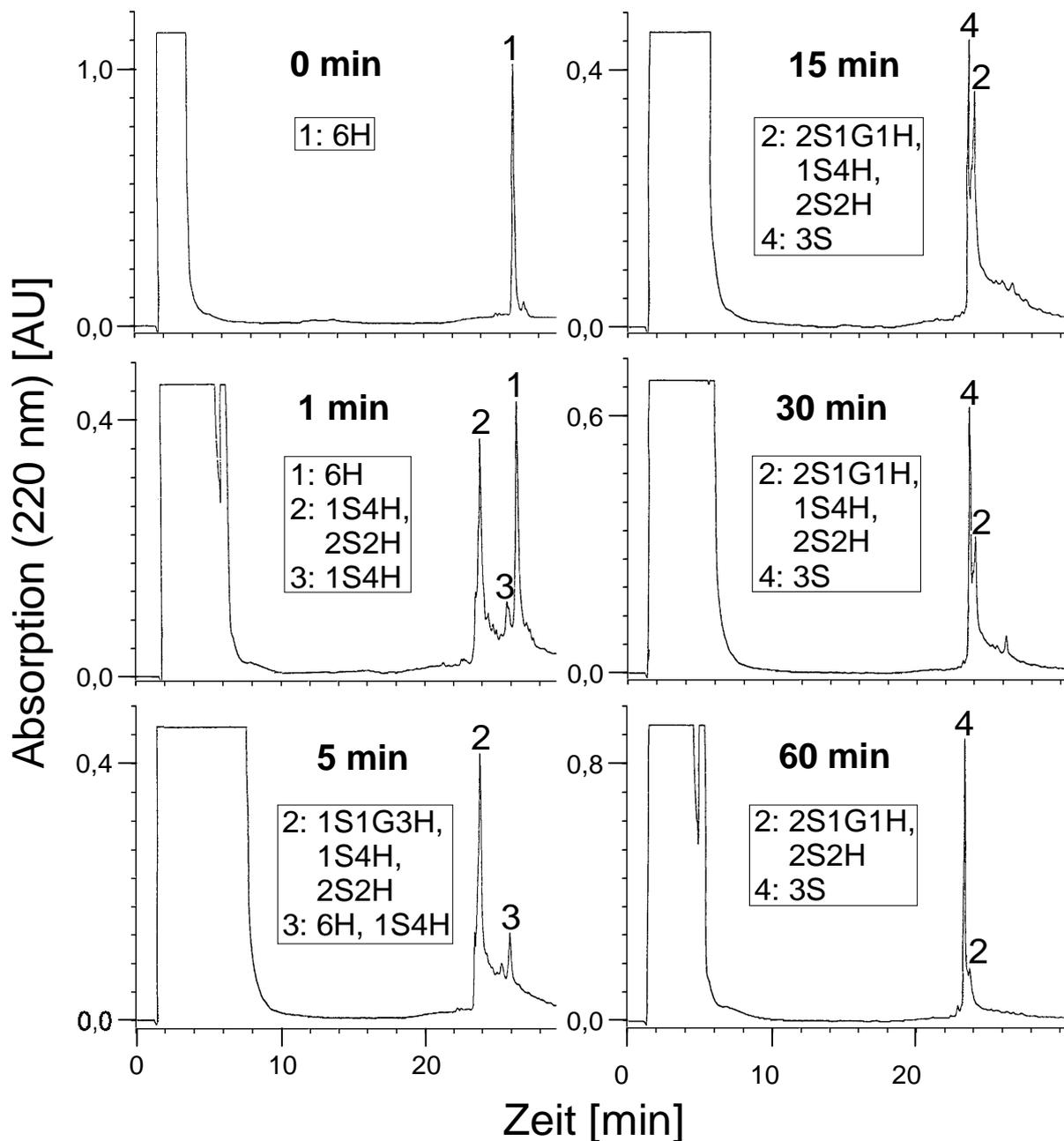


Abb. 3.6.1.3: RP-HPLC-Chromatogramme der Renaturierung von rh-Pro-NGF. Das Protein wurde unter den gleichen Bedingungen wie im vorigen Experiment gefaltet. Die in den einzelnen Peaks gefundenen Spezies sind angegeben.

Die in diesem Versuch erhaltenen Ergebnisse korrelieren gut mit denen im vorherigen Experiment. Peak 1, der den komplett reduzierten rh-Pro-NGF enthielt, ließ sich bereits nach 5 min nicht mehr nachweisen. Im ersten Versuch war die 6H-Spezies nach 10 min nicht mehr detektierbar. Nach einer Minute tauchten zwei weitere Peaks mit kürzeren Retentionszeiten neben anderen, kleineren Peaks auf. Peak 2 setzte sich zusammen aus Spezies mit einer und zwei Disulfidbrücken. Peak 3 enthielt Intermediate mit einer Disulfidbrücke. Die Tatsache, dass 1S4H-

Intermediate mit zwei unterschiedlichen Retentionszeiten eluierten, lässt sich durch unterschiedlich disulfidverbrückte Isomere mit unterschiedlichen Konformationen erklären. Hydrophobere Spezies eluieren gewöhnlich bei späteren Retentionszeiten als hydrophilere. Peak 3 war bereits nach 15 min praktisch vollständig verschwunden. Entweder handelte es sich hierbei um Intermediate des produktiven Faltungswegs oder aber um nicht-produktive Zwischenprodukte, die aus dem Renaturierungsansatz aggregiert waren und daher nicht weiter erfasst werden konnten. Die Spezies 1S4H ließ sich im ersten Versuch bis zu einer Zeit von 30 min nachweisen. In Peak 2 wurde nach 5 min ein zusätzliches Intermediat der Zusammensetzung 1S1G3H identifiziert. Nach 15 min wurde ein neuer Peak (4) im Elutionsprofil detektiert. Dieser enthielt vollständig oxidierten rh-Pro-NGF. Zu diesem Zeitpunkt wurden im Peak 2 folgende Spezies nachgewiesen: 2S1G1H, 2S2H, 1S4H. Diese waren auch nach 30 min noch vorhanden, jedoch zu unterschiedlichen Anteilen. Nach einer Stunde wurden im Peak 2 weiterhin die Intermediate 2S2H und 2S1G1H identifiziert; die Größe dieses Peaks nahm jedoch über den Zeitraum von 5 bis 60 min kontinuierlich ab. Nach zwei Stunden enthielt Peak 2 nur noch die Spezies 2S2H, welche auch im ersten Versuch (Abb. 3.6.1.2) noch zu diesem Zeitpunkt gefunden wurde (Daten nicht gezeigt). Peak 4 mit dem 3S-Intermediat war auch nach einer bzw. zwei Stunden vorherrschend.

Es galt nun zu klären, ob der im Peak 4 nachgewiesene, vollständig oxidierte rh-Pro-NGF die native Disulfidverbrückung enthielt bzw. ob neben dem nativen rh-Pro-NGF auch noch andere 3S-Isomere existierten. Um die Lage der Disulfidbrücken analysieren zu können, mussten die 3S-Spezies durch eine Protease geeigneter Spezifität gespalten werden. Durch Analyse der Primärstruktur kennt man die Lage der Spaltstellen. Folglich entstehen nur bestimmte Fragmente, deren Massen bekannt sind. Sind nun zwei Peptide durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden, so entsteht eine neue Spezies, die ein Molekulargewicht aufweist, das der Summe der beiden Fragmente entspricht. Die Massen der beiden isolierten Peptide findet man jedoch nicht im Massenspektrum. Zur Durchführung der Analyse wurde das Protein im gesammelten Peak 4 alkylert (nach 15, 30, 60 und 120 min) und zunächst mit Trypsin vollständig gespalten. Anschließend wurden die Fragmente mittels MALDI-MS analysiert. In Abb. 3.6.1.4 ist das MALDI-Spektrum des Peptidgemischs nach 15 min Faltungszeit dargestellt.

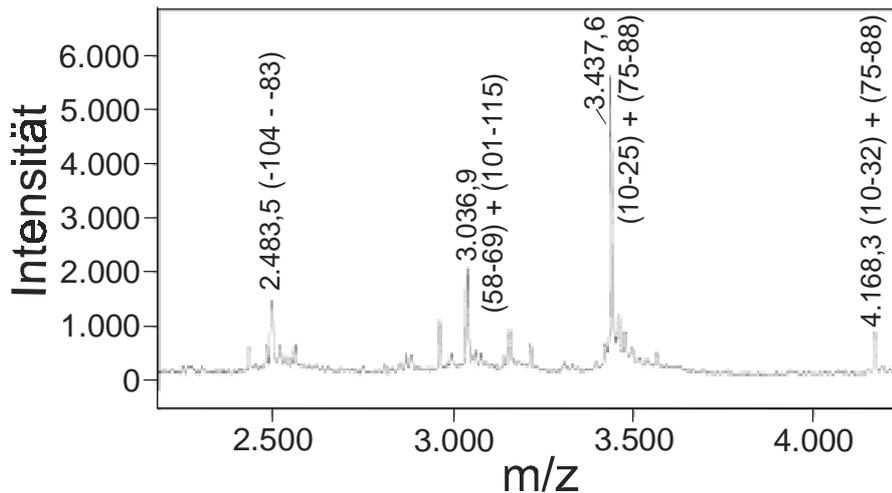


Abb. 3.6.1.4: MALDI-Spektrum (Ausschnitt) des durch Trypsinolyse entstandenen Peptidgemischs (Peak 4 der Renaturierung von rh-Pro-NGF nach 15 min). Die Zuordnung der Peptide zu den jeweiligen Signalen ist angegeben.

Die Signale bei einem m/z -Verhältnis von 4.168,3 Da bzw. 3.437,6 Da entsprachen dem Peptid (75-88), welches mit den Peptiden (10-32) bzw. (10-25) über die native Disulfidbrücke Cys15-Cys80 verbunden war. Des Weiteren ließ sich ein weiteres Signal mit $m/z = 3.036,9$ Da detektieren, welches zwei Peptiden zugeordnet werden konnte, die durch zwei Disulfidbrücken miteinander verknüpft waren: (58-69) und (101-115). Diese Fragmente enthielten Disulfidbrücken, an denen Cys58, Cys68, Cys108 und Cys110 beteiligt waren. Für eine exakte Zuordnung der Disulfidbrücken wurde das 3.036,9 Da-Fragment daher durch RP-HPLC isoliert und einer erneuten Proteolyse, diesmal durch die unspezifische Protease Subtilisin, unterzogen. Die entstandenen Fragmente wurden erneut mit MALDI-MS untersucht (Spektrum nicht gezeigt). Das 3.036,9 Da-Fragment wurde durch die zweite Proteolyse gespalten. Es wurde ein neues Signal mit $m/z = 1.638,8$ Da erhalten, das dem Peptid (58-69), verknüpft mit (108-110), zugeordnet werden konnte. Das 1.638,8 Da-Fragment trug nun Cys58 und Cys108 an den jeweiligen N-Termini. Diese wurden durch Edman-Abbau (1 Zyklus) entfernt und erneut mit MALDI-MS untersucht. Das Signal bei $m/z = 1.638,8$ Da verschwand, was auf eine Disulfidbrücke zwischen Cys58 und Cys108 hindeutete. Ein neuer Peak bei $m/z = 1.434,6$ Da wurde sichtbar, der dem Peptid (59-69), verknüpft mit (109-110) über die Verbrückung Cys68-Cys110, entsprach. Die in Peak 4 gefundene 3S-Spezies bestand demnach nur aus dem Isomer mit nativen Disulfidbrücken. Die nach 30 min, 1 h und 2 h in Peak 4 isolierten 3S-Spezies trugen ebenfalls die korrekt geknüpften Disulfidbrücken. Der produktive Faltungsweg von rh-Pro-NGF liefert folglich die direkte Ausbildung nativer Disulfidbrücken. Es findet keine Isomerisierung eventuell falsch disulfid-verbrückter 3S-Spezies statt.

3.6.2 Oxidative Faltung von rh-NGF

Nachdem erwiesen war, dass die Faltung des rh-Pro-NGF in der Tat effektiv zum nativen Protein führt, sollte die oxidative Renaturierung des reifen Proteins näher untersucht werden. Dabei galt vor allem zu klären, welche Rolle die Pro-Sequenz während der Faltung des Pro-Proteins spielt. Die theoretisch möglichen, mit Massenspektrometrie unterscheidbaren Intermediate der oxidativen Faltung von rh-NGF sind in Abb. 3.6.2.1 aufgelistet.

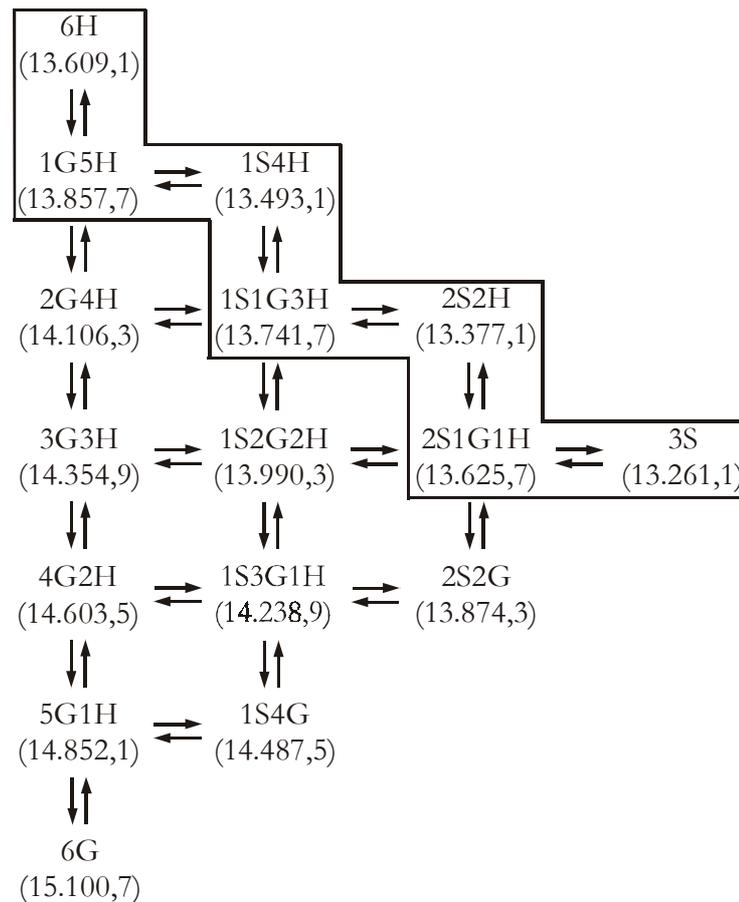


Abb. 3.6.2.2.1: Theoretisch mögliche, durch Massenspektrometrie unterscheidbare Intermediate des reifen rh-NGF nach Carboxyamidomethylierung. Zur verwendeten Symbolik siehe Abb. 3.6.1.1. Die umrahmten Spezies befinden sich auf einem Faltungsweg, der nur gemischte Disulfide mit einem Glutathionyl-Rest beinhaltet.

Um die Faltungsausbeute zu verbessern, wurde die oxidative Faltung des rh-NGF unter modifizierten Bedingungen durchgeführt. Aliquots des Faltungsansatzes wurden analog zur Renaturierung des rh-Pro-NGF alkyliert und massenspektrometrisch analysiert. Dazu wurden die carboxyamidomethylierten Intermediate des rh-NGF jedoch mit einer anderen Ionisationstechnik, dem *Ion Spray*, ionisiert. Diese Methode ermöglicht die Untersuchung thermisch labiler, aggregationsempfindlicher Proben, da die Ionisierung bei Raumtemperatur erfolgt. Auf diese Weise wurden qualitativ gute Massenspektren von rh-NGF-Intermediaten erhalten. Eine Quantifizierung der Zwischenprodukte wie im Falle des Pro-Proteins ließ die

Software an diesem Gerät jedoch nicht zu. Das Elektrospray-Massenspektrum der rh-NGF-Faltungsintermediate nach 2 min ist in Abb. 3.6.2.2 A dargestellt. Es zeigt vorwiegend das völlig reduzierte Protein (6H), aber auch Spezies mit einer und zwei Disulfidbrücken (1S4H und 2S2H). Daneben ließ sich auch ein gemischtes Disulfid (1G5H) nachweisen. Völlig oxidiertes, jedoch nicht-nativer rh-NGF wurde erstmals 10 min nach Beginn der Faltung detektiert (Daten nicht gezeigt). Dies war auch etwa der Zeitpunkt, bei dem das vollständig oxidierte Pro-Protein im Renaturierungsansatz präsent war. Nach 2 h war völlig reduzierter rh-NGF im Gegensatz zur Faltung der Pro-Form immer noch nachweisbar (Spektrum nicht gezeigt). Zu dieser Zeit war die Renaturierung des Pro-Proteins bereits abgeschlossen. Damit wurde die am Anfang von Kap. 3.6 beschriebene langsamere Renaturierung des reifen rh-NGF gegenüber rh-Pro-NGF bestätigt. Abb. 3.6.2.2 B zeigt das Massenspektrum des rh-NGF-Faltungsansatzes nach 24 h. Neben der 3S-Spezies waren zu diesem Zeitpunkt immer noch die Intermediate 2S2H und 2S1G1H nachweisbar. Im Falle des rh-Pro-NGF ließ sich das gemischte Disulfid bereits nach 1 h nicht mehr detektieren.

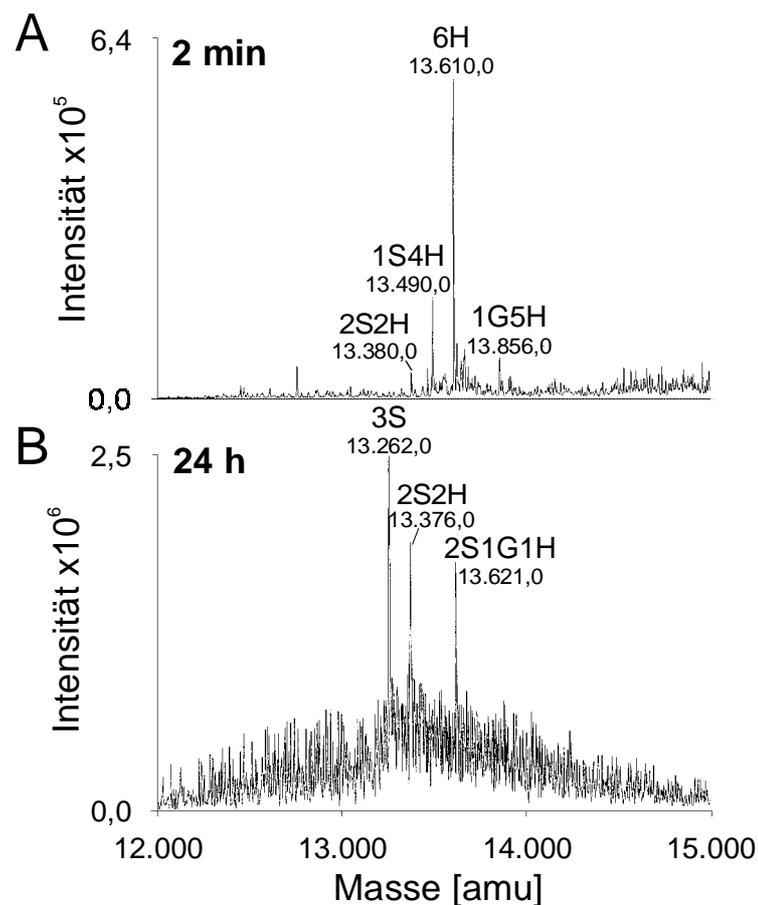


Abb. 3.6.2.2: Elektrospray-Massenspektren (nach Dekonvolution) der Faltungsintermediate von rh-NGF nach 2 min (A) und 24h (B). Die Renaturierung des reifen Proteins erfolgte bei 10°C und einer Konzentration von 26 µg/ml. Eine Verringerung der Proteinkonzentration führte zu keiner signifikanten Verbesserung der Faltungsausbeute. Als Renaturierungspuffer wurde 2 M Triethanolamin/HCl, pH 9,0; 0,5 M L-Arginin; 0,2 M NaCl; 5 mM GSH; 1 mM GSSG; 1 mM EDTA verwendet. Die Restkonzentration an GdmCl war kleiner als 100 mM. S: intramolekulare Disulfidbrücke, G: gemischtes Disulfid mit Glutathion, H: freie SH-Gruppe.

Analog zum rh-Pro-NGF sollte auch das Disulfidmuster der rh-NGF-Faltungsintermediate analysiert werden. Dazu wurden die Faltungsansätze nach 2 min, 10 min, 1 h, 4 h und 24 h alkyliert, mit Trypsin verdaut und das resultierende Peptidgemisch mit MALDI-MS untersucht. Die Identifizierung disulfid-verbrückter Peptide ist in Tab. 3.6.2 aufgelistet.

Zeit	gemessenes Molekulargewicht [Da]	disulfid-verbrückte Peptide	Spezies	Position der Disulfidbrücken
2 min	5.622,9	(10-25) + (26-59)	1S	Cys15-Cys58
	4.975,5	(1-32) + (104-114)	1S1G	Cys15-Cys108 oder Cys15-Cys110
	3.210,1	(75-88) + (104-114)	1S1G	Cys80-Cys108 oder Cys80-Cys110
10 min	5.622,8	(10-25) + (26-59)	1S	Cys15-Cys58
	4.975,0	(1-32) + (104-114)	1S1G	Cys15-Cys108 oder Cys15-Cys110
	3.210,3	(75-88) + (104-114)	1S1G	Cys80-Cys108 oder Cys80-Cys110
1 h	4.976,3	(1-32) + (104-114)	1S1G	Cys15-Cys108 oder Cys15-Cys110
	3.210,5	(75-88) + (104-114)	1S1G	Cys80-Cys108 oder Cys80-Cys110
	2.494,2	(58-69) + (104-114)	2S	Cys58-Cys108 und Cys68-Cys110
4 h	4.976,3	(1-32) + (104-114)	1S1G	Cys15-Cys108 oder Cys15-Cys110
	3.210,5	(75-88) + (104-114)	1S1G	Cys80-Cys108 oder Cys80-Cys110
	2.493,9	(58-69) + (104-114)	2S	Cys58-Cys108 und Cys68-Cys110
24 h	4.976,3	(1-32) + (104-114)	1S1G	Cys15-Cys108 oder Cys15-Cys110
	3.437,7	(10-25) + (75-88)	1S	Cys15-Cys80
	3.210,3	(75-88) + (104-114)	1S1G	Cys80-Cys108 oder Cys80-Cys110
	2.494,4	(58-69) + (104-114)	2S	Cys58-Cys108 und Cys68-Cys110

Tab. 3.6.2: Disulfid-verbrückte Peptide von rh-NGF-Faltungsintermediaten nach Trypsinolyse. Die Renaturierung wurde unter den gleichen Bedingungen wie in Abb. 3.6.2.2 beschrieben durchgeführt. Im Gegensatz zum rh-Pro-NGF wurde der gesamte Faltungsansatz der Proteolyse mit Trypsin unterworfen. S: Disulfidbrücke, G: gemischtes Disulfid mit Glutathion. Die fett dargestellten 1S- bzw. 2S-Spezies sind Peptide, die native Disulfidbrücken aufweisen.

Die MALDI-Spektren der rh-NGF-Faltungsproben nach 2 und 10 min wiesen beide ein Signal bei $m/z = 5.622,9$ Da auf, entsprechend dem Fragment (10-25), verbunden mit (26-59) über die nicht-native Disulfidbrücke Cys15-Cys58. Die Signale bei $m/z = 4.975,5$ Da und $3.210,1$ Da korrelierten mit einer Verknüpfung des Peptids (104-114) mit den Fragmenten (1-32) bzw. (75-88). Für einen eindeutigen Nachweis wurden die Fragmente, analog zur Disulfidmuster-Analyse des Pro-Proteins, einer weiteren Proteolyse mit Subtilisin unterzogen und erneut mit MALDI-MS analysiert. Nach der Behandlung mit Subtilisin ließen sich die Signale bei $4.975,5$ und $3.210,1$ Da nicht mehr detektieren. Dafür wurden zwei neue Spezies mit einem Molekulargewicht von $m/z = 4.120,8$ Da bzw. $2.351,9$ Da gebildet, die dem Peptid (108-110), verbrückt mit (1-32), und dem Fragment (108-110), verbunden mit (75-88), entsprachen. Die Proben wurden daher, ähnlich wie bei der Analyse des rh-Pro-NGF, einem Edman-Abbau unterworfen (1 Zyklus). Beim Fragment mit einer Masse von $m/z = 4.120,8$ Da (Peptid (108-110), verknüpft mit Fragment (1-32)) wurde durch die Entfernung der beiden N-terminalen

Aminosäuren die Disulfidverbrückung zerstört. Dies bedeutet, dass in dieser Spezies Cys15 und Cys108 über eine nicht-nativen Disulfidbrücke verknüpft gewesen waren. Die Masse des Peptids (108-110), verbrückt mit Fragment (75-88), verkleinerte sich nach dem Edman-Abbau von $m/z = 2.351,9$ Da auf $1.806,9$ Da. Offensichtlich kam es durch die Abspaltung der beiden N-terminalen Aminosäurereste nicht zu einer Zerstörung der Disulfidbrücke. Diese bestand folglich zwischen Cys80 und Cys110, und war damit nicht-nativ.

Die MALDI-Spektren nach 1 und 4 h zeigten neben den vorher bereits beobachteten Fragmenten die Anwesenheit einer neuen Spezies mit einem Molekulargewicht von $m/z = 2.494,2$ Da bzw. $2.493,9$ Da. Diese Masse ließ sich dem Fragment (58-69), über zwei Disulfidbrücken verknüpft mit Peptid (104-114), zuordnen. Dass hier zwei Disulfidbrücken vorlagen, ließ sich daraus erkennen, dass die beiden Peptide kein durch Iodacetamid alkyliertes Cystein enthielten. Um die genaue Lage der Disulfidbrücken zu analysieren, wurde dieses Fragment ebenfalls einer zweiten Proteolyse durch Subtilisin unterworfen und das entstandene Peptidgemisch mittels MALDI-MS untersucht. Die Spektren zeigten ein neues Signal bei $m/z = 1.639,1$ bzw. $1.638,8$, was dem Peptid (58-69), verbunden mit (108-110), entsprach. Beide Peptide besaßen nun ein Cystein an ihren jeweiligen N-Termini. Anschließend wurde wiederum ein Edman-Abbau-Schritt durchgeführt. Dadurch wurden die beiden N-terminalen Cysteine zwar entfernt, die zweite Disulfidbrücke jedoch nicht zerstört: es ließ sich eine neue Spezies mit einem Molekulargewicht von $m/z = 1.433,6$ Da detektieren. Diese bestand folglich aus Peptid (59-69), verknüpft mit Fragment (109-110) über die native Disulfidbrücke Cys68-Cys110. Demnach musste auch zwischen Cys58 und Cys108 eine native Brücke gebildet worden sein. Wären beide Disulfidbrücken falsch geknüpft gewesen, so wären durch den Edman-Abbau beide Bindungen zerstört worden. Das MALDI-Spektrum nach 24 h Faltung zeigte schließlich ein zusätzliches Signal bei $m/z = 3.437,7$ Da, was einer Verknüpfung zwischen Peptid (10-25) und (75-88) über die native Disulfidbrücke mit Cys15-Cys80 entsprach. Zu diesem Zeitpunkt ließ sich folglich erstmals nativer rh-NGF detektieren. Offensichtlich wird diese Verbrückung zuletzt gebildet. Sie entspricht der Disulfidbrücke, die im Cystin-Knoten durch den Ring fädelt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich bei der Renaturierung von rh-NGF nach 2 und 10 min drei nicht-native Disulfidbrücken ausgebildet hatten, nämlich Cys15-Cys58, Cys15-Cys108 und Cys80-Cys110. Zu diesen Zeitpunkten ließen sich keine nativen Disulfidbrücken detektieren. Nach 1 h wurde neben den zuvor entdeckten nicht-nativen Spezies eine native Verbrückung zwischen Cys58-Cys108 und Cys68-Cys110 gefunden. Erst nach 24 h schließlich ließ sich neben nicht-nativen Verknüpfungen auch korrekt disulfidverbrückter rh-NGF

nachweisen. Die Faltungsintermediate mit falsch verknüpften Cysteinen waren entweder Spezies, die den Faltungsprozess noch nicht abgeschlossen hatten oder aber *Dead End*-Intermediate, die nicht weiterreagieren konnten. Des Weiteren war die Faltung des reifen rh-NGF im Vergleich zum rh-Pro-NGF deutlich langsamer; erst nach 1 h ließen sich zwei der nativen Disulfidbrücken detektieren, nämlich diejenigen des Rings im Cystin-Knoten. Die Existenz der dritten Brücke zwischen Cys15 und Cys80 wurde erst nach 24 h beobachtet. Vermutlich kann diese erst geknüpft werden, nachdem sich der Peptidring im Cystin-Knoten ausgebildet und das NGF-Monomer teilweise strukturiert hat. Ob dies auch für die Renaturierung des rh-Pro-NGF zutrifft, müssen zukünftige, nähere Untersuchungen zum Faltungsmechanismus dieses Proteins ergeben. Neben den nativen Disulfidbrücken wurden im Falle der rh-NGF-Faltung auch mehrere nicht-native Verbrückungen beobachtet. Offenbar findet hier eine zufällige Oxidation der sechs Cysteine statt. Dies könnte auch die äußerst geringe Faltungsausbeute erklären. Im Gegensatz dazu führte die Faltung des rh-Pro-NGF effizient und schnell zur Ausbildung der nativen 3S-Spezies. Diese ließ sich bereits nach 15 min im Faltungsansatz nachweisen. Allerdings wurde auch bei der Renaturierung der Pro-Form keine 100%ige Ausbeute erreicht. Auch hier wurde Aggregatbildung beobachtet. Außerdem wurde eine Spezies mit zwei Disulfidbrücken detektiert, die auch nach 2 h Faltungsdauer noch im Renaturierungsansatz vorhanden war. Ob dieses Intermediat falsch geknüpfte Disulfidbrücken enthält, muss noch geklärt werden. Es könnte sein, dass die Pro-Sequenz bei der Ausbildung der ersten beiden Disulfidbrücken im Ring des Cystin-Knotens unterstützend eingreift. Sind jedoch falsch verbrückte Cysteine vorhanden, können diese nicht mehr in die native Verbrückung übergehen.

3.7 Untersuchungen zur langsamen Faltung und Entfaltung des oxidierten Nervenwachstumsfaktors

Die in Kap. 1.6 beschriebene langsame Entfaltung des reifen rh-NGF sollte nun näher untersucht und mit der des Pro-Proteins verglichen werden. Dazu wurden die De- und Renaturierungsübergänge in GdmCl-haltigem Puffer aufgenommen und die Renaturierungskinetik der Pro-Form der des reifen rh-NGF gegenübergestellt.

3.7.1 Guanidiniumchlorid-abhängige Übergänge von rh-NGF und rh-Pro-NGF

Für die Denaturierungsübergänge wurde nativer rh-Pro-NGF über Nacht (10 h) bzw. acht Tage bei 22°C in Gegenwart verschiedener Guanidinium-Konzentrationen inkubiert. Zum Vergleich wurde reifer rh-NGF-Standard über Nacht (17 h) und sieben Tage bei 20°C denaturiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.7.1.1 dargestellt.

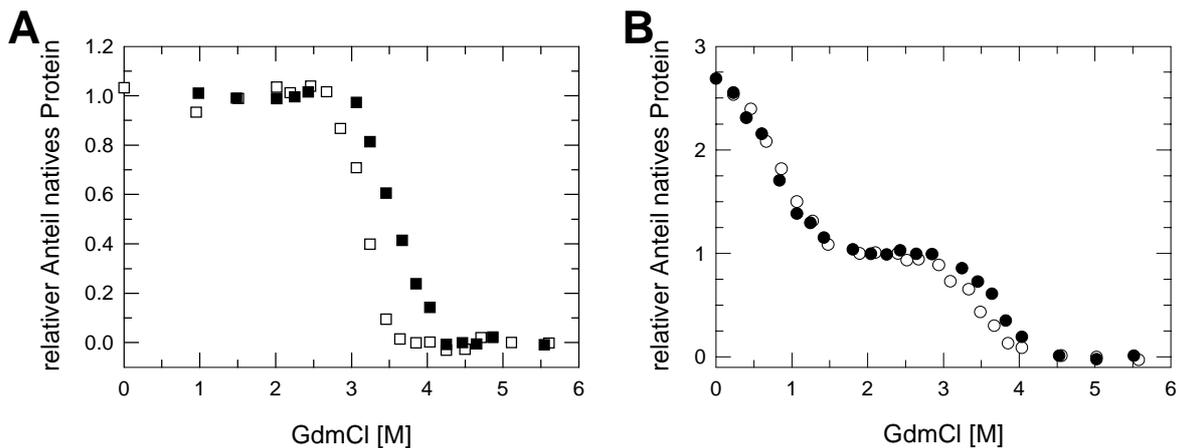


Abb. 3.7.1.1: Denaturierungsübergänge von rh-NGF (A) und rh-Pro-NGF (B) (Fluoreszenzmessungen; normierte Daten). Für rh-Pro-NGF bezieht sich der relative Anteil an nativem Protein auf den reifen Teil. Die Proteine wurden zu je 20 µg/ml in 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0; 1 mM EDTA mit der jeweiligen GdmCl-Konzentration verdünnt und bei 20 - 22°C inkubiert. Die Proben wurden bei 280 nm angeregt und die Emission bei 331 nm (rh-NGF) bzw. 326 nm (rh-Pro-NGF) bestimmt. Die Symbole: Schwarze Quadrate: rh-NGF nach 17 h, weiße Quadrate: rh-NGF nach sieben Tagen, schwarze Kreise: rh-Pro-NGF nach 10 h, weiße Kreise: rh-Pro-NGF nach acht Tagen Inkubation. Die Messungen wurden bei 20°C durchgeführt.

Die Denaturierungskurve des Pro-Proteins zeigt zwei Übergänge im Gegensatz zum reifen rh-NGF. Der erste Übergang im Bereich von 0 bis 2 M GdmCl ist auf die Pro-Sequenz zurückzuführen, welche eine eigene Domäne darstellt, die als Erstes auffaltet. Der Bereich, in dem das Pro-Peptid denaturiert, verschiebt sich nicht bei längeren Inkubationszeiten. Anders hingegen der Übergangsbereich des reifen Teils: hier wird der Übergangsmittelpunkt nach längerer Denaturierungszeit zu etwas geringeren GdmCl-Konzentrationen verschoben, nämlich von etwa 3,75 M GdmCl nach 10 h zu etwa 3,5 M GdmCl nach acht Tagen. Der Übergangsmittelpunkt der Entfaltung von reifem rh-NGF wird im vergleichbaren Zeitraum von etwa 3,75 M zu ca. 3,25 M GdmCl verschoben. Nach Ablauf von acht Tagen ist jedoch immer noch keine Gleichgewichtseinstellung erfolgt. Dieses Phänomen ist bereits von De Young und Mitarbeitern eingehend beschrieben worden (De Young *et al.*, 1996). Es lässt sich durch einen weiteren langsamen Entfaltungsschritt des denaturierten Monomers von M1 zu M2 (s. Kap. 1.6; Gl. 1.2) erklären. Bei hohen GdmCl-Konzentrationen können alle Proteinmoleküle den langsamen Entfaltungsschritt durchlaufen. Am Denaturierungsmittelpunkt kann dies nur die Hälfte. Bei längerer Inkubationszeit geht ein weiterer Teil der partiell entfalteten Moleküle (Zustand M1) in den völlig entfalteten Zustand (M2) über. Aufgrund des Massenwirkungsgesetzes wird mehr natives Protein denaturiert und geht in M1 über. Der Großteil des Proteins in den denaturierten Zuständen M1 und M2 nimmt folglich mit der Zeit zu, so dass die Übergangsmittelpunkte zu kleineren GdmCl-Konzentrationen verschoben werden. Mithilfe der Fluoreszenz kann nur zwischen nativem (dimerem) und denaturiertem rh-

NGF unterschieden werden, nicht jedoch zwischen den beiden denaturierten Zuständen M1 und M2. Diese lassen sich jedoch durch RP-HPLC- und SEC-*Double Jump*-Experimente erfassen (De Young *et al.*, 1996; De Young *et al.*, 1999) (s. Kap. 3.7.2). Das isolierte rh-NGF-Pro-Peptid zeigt mit GdmCl oder Harnstoff keinen Denaturierungsübergang (Daten nicht gezeigt). Offenbar tritt die Pro-Sequenz im rh-Pro-NGF mit dem maturen NGF in Wechselwirkung. Diese kann jedoch nicht sehr stark ausgeprägt sein, da das isolierte Pro-Peptid bekanntermaßen nicht an nativen, reifen rh-NGF bindet (s. Kap. 3.4.2.4).

Wie oben erwähnt, lassen sich die beiden Zustände M1 und M2 unter anderem mittels RP-HPLC unterscheiden. Daher sollten die Renaturierungsübergänge von rh-NGF sowie rh-Pro-NGF, ausgehend vom Zustand M2, untersucht werden. Die Proteine wurden mehrere Tage bei 40°C in 6 M GdmCl inkubiert, bis in der RP-HPLC nur noch das spät eluierende Monomer M2 beobachtet wurde. Dann wurden die Ansätze über Nacht bzw. sieben Tage bei 20°C renaturiert. Die Übergänge sind in Abb. 3.7.1.2 dargestellt.

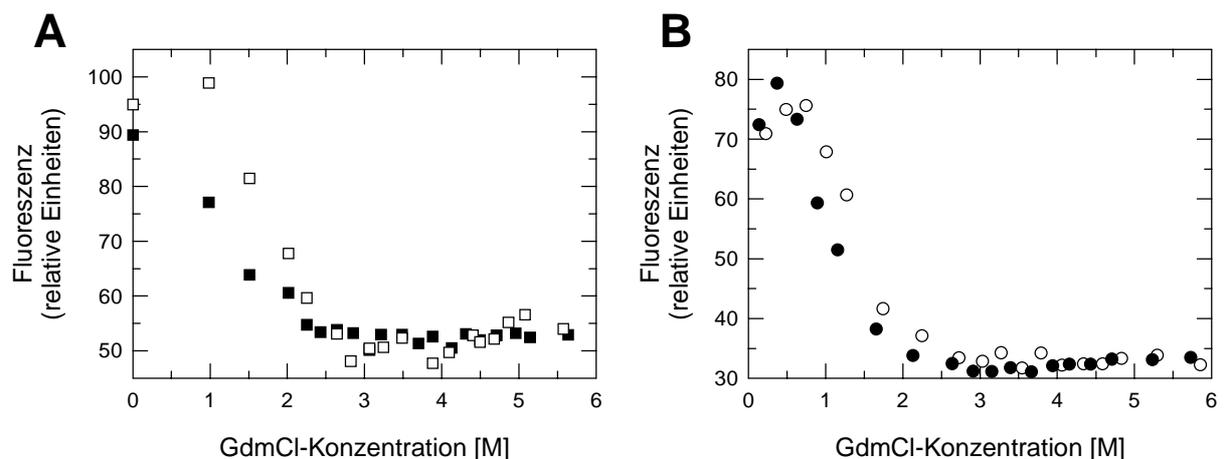


Abb. 3.7.1.2: Renaturierungsübergänge von rh-NGF (A) und rh-Pro-NGF (B) aus dem Zustand M2 (nicht-normierte Daten). Die denaturierten Proteine wurden zu je 20 µg/ml in 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0; 1 mM EDTA mit der angegebenen GdmCl-Konzentration verdünnt und bei 20°C inkubiert. Die Proben wurden bei 280 nm angeregt und die Fluoreszenzintensität bei 331 nm (rh-NGF) bzw. 326 nm (rh-Pro-NGF) detektiert. Symbole: Schwarze Quadrate: rh-NGF nach 18 h, weiße Quadrate: rh-NGF nach sieben Tagen, schwarze Kreise: rh-Pro-NGF nach 15 h, weiße Kreise: rh-Pro-NGF nach sieben Tagen. Die Übergänge wurden bei 20°C gemessen.

Sowohl nach der Inkubation über Nacht als auch nach sieben Tagen ließ sich kein Plateau beobachten, das dem Übergang vorangeht. Nach Inkubation über Nacht (18 bzw. 15 h) waren beide Proteine nach Inkubation in GdmCl-freiem Puffer noch nicht wieder vollständig renaturiert (vgl. auch Abb. 3.7.2.3). Es wurde ein breiter Übergangsbereich von 0 bis 2 M GdmCl ohne „natives“ Plateau beobachtet. Nach siebentägiger Inkubation war immer noch kein

Gleichgewicht erreicht. Zu diesem Zeitpunkt war ein sehr kleines Anfangsplateau detektierbar, und der Übergangsbereich leicht zu größeren GdmCl-Konzentrationen verschoben (ca. 1 bis 2,5 M GdmCl). Bei allen Messungen waren die Proteine oberhalb von 2,5 M gemäß Fluoreszenzmessung noch vollständig denaturiert. Im Falle der Denaturierungsübergänge war das reife Protein nach sieben bis acht Tagen bei 2,5 M GdmCl noch vollständig nativ.

Die Renaturierungsübergänge verschiedener Neurotrophine wurden ebenfalls beschrieben (Timm & Neet, 1992; Timm *et al.*, 1994). Dabei beobachteten die Autoren eine rasche Denaturierung (< 1 min) in Gegenwart hoher GdmCl-Konzentrationen (≥ 4 M). Für die Aufnahme von Renaturierungskurven denaturierten sie die Neurotrophine daher zunächst maximal 8 h in 4 bis 7 M GdmCl und renaturierten anschließend bei verschiedenen Rest-Guanidinium-Gehalten für 72 h. Wahrscheinlich befanden sich die Neurotrophine nach der Denaturierung hauptsächlich im Zustand M1 und nur ein kleiner Teil war in M2 übergegangen. Für die Denaturierungsübergänge wurden die Ansätze 48 - 72 h inkubiert (Timm & Neet, 1992; Timm *et al.*, 1994). Unter diesen Bedingungen erreichten die Autoren nach relativ kurzer Inkubationszeit eine Übereinstimmung der De- und Renaturierungskurven.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl die Denaturierung als auch die Renaturierung (ausgehend vom vollständig entfalteten Protein M2) von rh-Pro-NGF und rh-NGF ein sehr langsamer Prozess ist. Insbesondere die Gleichgewichtseinstellung bei intermediären GdmCl-Konzentrationen (zwischen 1 und 4 M) bei 20°C benötigt mehr als eine Woche. Nach dieser Zeit ließ sich noch keine Übereinstimmung von De- und Renaturierungskurve beobachten. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von De Young und Mitarbeitern. Hier konnte nach 120 h bei 25°C noch keine Gleichgewichtseinstellung des Denaturierungsüberganges von rh-NGF beobachtet werden (De Young *et al.*, 1996). Als Ursache hierfür wird ein weiterer, langsamer Entfaltungsprozess des denaturierten Proteins vom monomeren Zustand M1 zum monomeren Zustand M2 postuliert (s. Kap. 1.6).

3.7.2 Vergleich der langsamen Faltung von oxidiertem rh-NGF und rh-Pro-NGF

Ein Vergleich der Denaturierungskinetiken N-terminal verkürzter rh-NGF-Mutanten ergab, dass die Geschwindigkeit der Überführung von M1 zu M2 mit abnehmender Länge des N-Terminus zunahm (De Young *et al.*, 1996, Kap. 1.6). Dabei wurden Varianten untersucht, denen die ersten fünf bzw. neun Aminosäuren fehlten. Eine Abhängigkeit der

Entfaltungsgeschwindigkeit von der Länge des N-Terminus war für De Young und Mitarbeiter ein weiterer Beleg für die Richtigkeit der „*Loop Threading*“-Hypothese (s. Kap. 1.6).

Rh-Pro-NGF hat einen im Vergleich zum rh-NGF um 104 Aminosäuren verlängerten N-Terminus. Ist die „*Loop Threading*“-Theorie korrekt, so sollte die Faltung des Pro-Proteins sehr viel langsamer ablaufen als die des reifen Neurotrophins. Inkubiert man rh-Pro-NGF für kurze Zeit (2 h) in Gegenwart von 6 M GdmCl, so zeigt das Protein im RP-HPLC-Chromatogramm die gleiche Retentionszeit wie nativer rh-Pro-NGF (Abb. 3.7.2.1). Das Pro-Protein verhält sich hier ähnlich wie reifer rh-NGF: unter den Bedingungen der RP-HPLC monomerisiert das native Neurotrophin (Spezies N₂ aus Gl. 1.1) sofort, verliert einen Großteil seiner Sekundärstruktur und zeigt somit das gleiche Laufverhalten wie das vorher kurzzeitig GdmCl-denaturierte Protein (Spezies M1). Nach längerer Inkubationsdauer in 6 M GdmCl geht M1 quantitativ in die später eluierende Spezies M2 über. Mit der Methode der RP-HPLC lässt sich also nur M2 direkt erfassen, da sich dessen Laufverhalten von M1 bzw. N₂ unterscheidet. M1 und N₂ lassen sich zwar mittels RP-HPLC nicht trennen; da der Übergang von M2 zu M1 jedoch der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, wurde die Geschwindigkeit der Bildung von N₂ aus M1 bei den nachfolgenden Untersuchungen vernachlässigt.

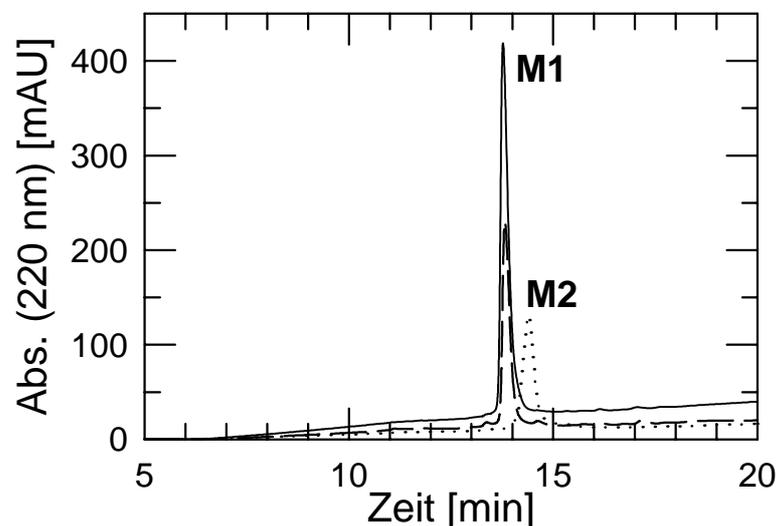


Abb. 3.7.2.1: RP-HPLC-Chromatogramme von nativem rh-Pro-NGF (—) sowie von in 6 M GdmCl kurzzeitig denaturiertem rh-Pro-NGF (2 h 22°C) (-----). Beide Spezies eluieren bei der gleichen Retentionszeit und lassen sich daher mittels RP-HPLC nicht unterscheiden. Beobachtet wird folglich eine Spezies M1. Denaturiert man rh-Pro-NGF über mehrere Tage in 6 M GdmCl, so eluiert das Protein (Spezies M2) bei einer späteren Retentionszeit. Die Elutionsbedingungen sind in Kap.2.2.11.1 beschrieben.

Die Geschwindigkeiten der Überführung von M2 zu M1 (Renaturierung) des reifen rh-NGF und der Pro-Form unter vergleichbaren Bedingungen sollten nun mittels RP-HPLC analysiert werden. Wird das Pro-Protein hinreichend lange in 6 M GdmCl inkubiert, so geht es wie reifer

rh-NGF vollständig in das später eluierende Monomer M2 über (s. Abb. 3.7.2.1). Nach Verdünnung des Proteins in guanidiniumfreien Puffer faltet das Pro-Protein langsam zurück zu M1. Die RP-HPLC-Chromatogramme des Renaturierungsansatzes zu ausgewählten Zeitpunkten sind in Abb. 3.7.2.2 dargestellt.

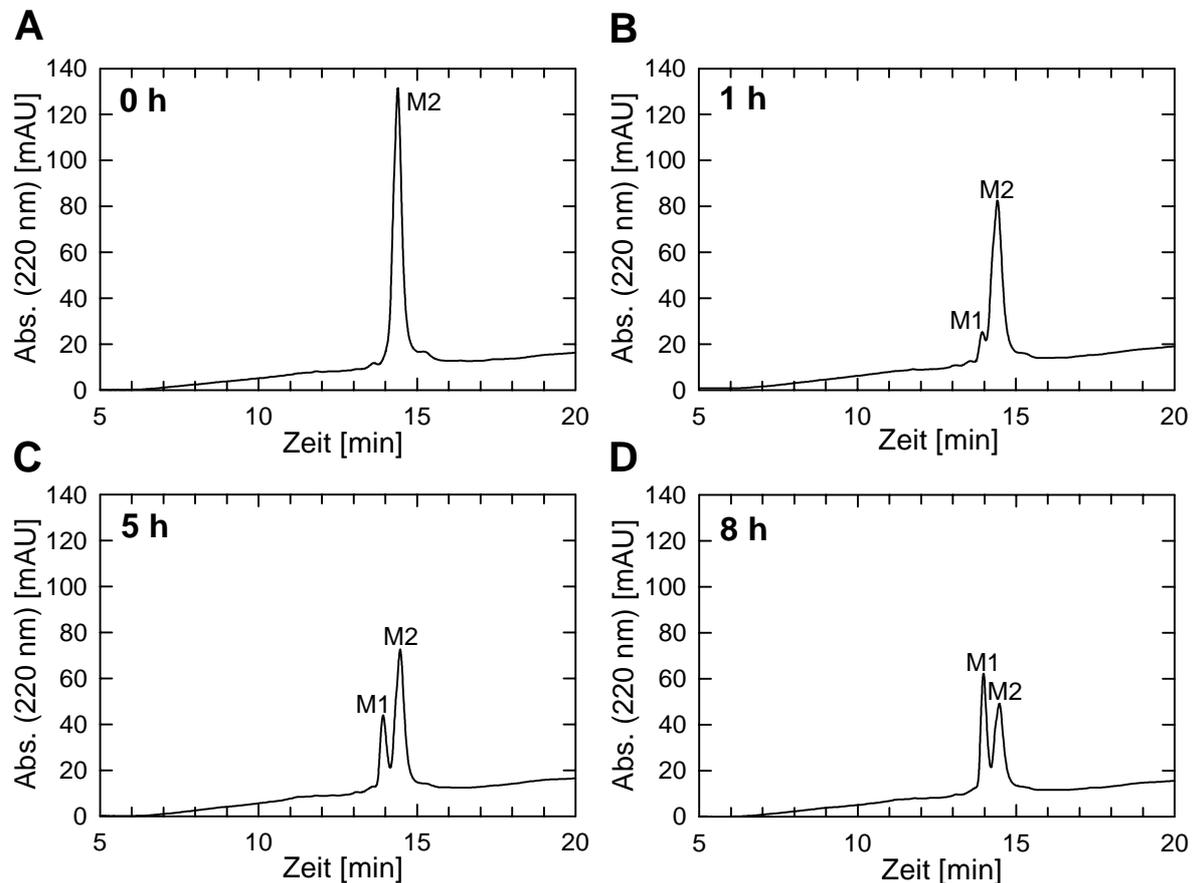


Abb. 3.7.2.2: RP-HPLC-Chromatogramme der Renaturierung von rh-Pro-NGF (M2 → M1). Das Protein wurde zunächst in 6 M GdmCl; 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0; 1 mM EDTA bei 40°C denaturiert, bis es vollständig in das spät eluierende Monomer M2 überführt worden war. Danach wurde es ad 20 µg/ml in GdmCl-freien Puffer verdünnt und bei 20°C renaturiert. Die Konzentration an Rest-Guanidinium betrug 140 mM. **(A)** Chromatogramm nach 0 h, **(B)** 1 h, **(C)** 5 h, **(D)** 8 h.

Die Geschwindigkeit der Renaturierung wurde nun aus den jeweiligen Chromatogrammen anhand des Verhältnisses der Peakflächen von M1 und M2 bestimmt. Entsprechend wurde auch die Renaturierung von reifem rh-NGF untersucht. Die Resultate sind in Abb. 3.7.2.3 gezeigt.

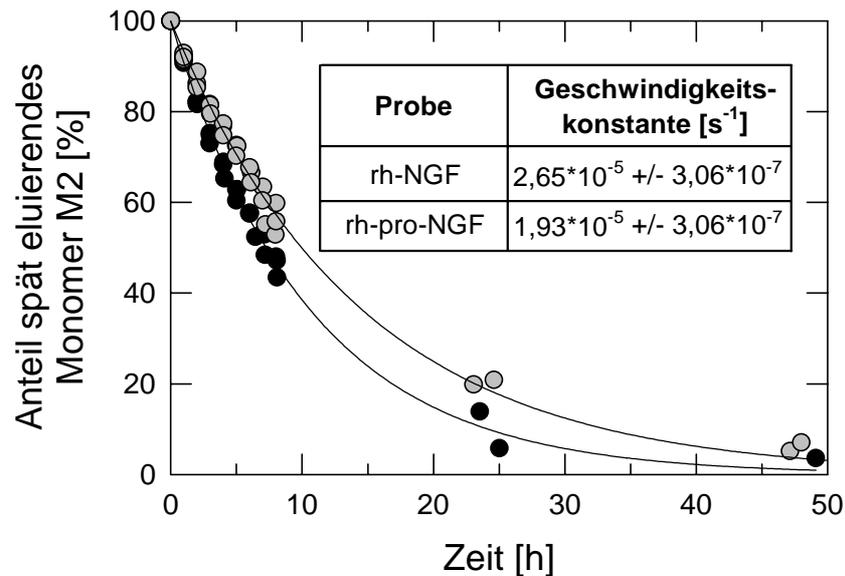


Abb. 3.7.2.3: Geschwindigkeiten der Renaturierung (M2 → M1) von rh-NGF (schwarze Kreise) und rh-Pro-NGF (graue Kreise) bei 20°C. Die Proteine wurden, wie oben beschrieben, zunächst vollständig denaturiert und dann zu 20 µg/ml in 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0; 1 mM EDTA verdünnt. Die Rest-Konzentration an GdmCl betrug 140 mM. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Proben mittels RP-HPLC untersucht und das Verhältnis der Peakflächen von M1 und M2 bestimmt. Die Messwerte wurden mit einer Kinetik erster Ordnung angepasst. Die jeweiligen Reaktionsgeschwindigkeiten sind in der eingefügten Tabelle angegeben.

Wie sich der Tabelle in Abb. 3.7.2.3 entnehmen lässt, verlief die Renaturierung des rh-Pro-NGF zwar etwas langsamer als die des reifen Proteins, lag aber immer noch in der gleichen Größenordnung. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Länge der N-terminalen Sequenz keine Bedeutung bei der langsamen Faltung von oxidiertem rh-NGF hat. Im Widerspruch dazu stehen Untersuchungen von rh-NGF-Deletionsmutanten. So war die Entfaltung der Mutante Δ5-NGF bei 5°C etwa fünfmal schneller als die des Wildtyps (De Young *et al.*, 1996). Δ9-NGF war so instabil, dass bei dieser Temperatur nur etwa 10 % des Proteins bereits in Abwesenheit von GdmCl als Dimer vorlagen. Bei der Δ5-NGF-Mutante besitzt der N-Terminus bis zur durchfädelnden Disulfidbrücke (Cys15-Cys81) zehn Aminosäurereste, bei der Δ9-NGF-Mutante sind es sechs. Es wurde postuliert, dass durch die Verkürzung der N-Termini die Geschwindigkeit der Bildung von M2 zunimmt, da die Anzahl der Aminosäurereste, die laut „Loop Threading“-Hypothese durch den Ring des Cystin-Knotens hindurchfädeln müssen, kleiner wird. Da jedoch mit abnehmender Länge des N-Terminus auch die Stabilität des Proteins abzunehmen scheint, könnte die Entfaltung der Mutanten auch nach einem ganz anderen Mechanismus erfolgen, so dass die Daten nicht vergleichbar sind. Ist die „Loop Threading“-Hypothese korrekt, so sollte man bei einer Verlängerung des N-Terminus durch die 104 Aminosäuren lange Pro-Sequenz eine drastische Verzögerung des Durchfädelns beobachten. Dies ist jedoch nicht der Fall. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass sowohl der N-

Terminus des Pro-Proteins als auch der des rh-NGF aus sterischen Gründen nicht vollständig durch den Ring des Cystin-Knotens hindurchfädeln können und stets an einer bestimmten Stelle kurz vor der Prozessierungsstelle hängenbleiben, so dass bei der Renaturierung immer nur ein Teil des N-Terminus zurückfädeln.

Eine alternative und wahrscheinlichere Erklärung für die fast identischen Geschwindigkeitskonstanten der Renaturierung von oxidiertem rh-NGF und rh-Pro-NGF (M2→M1) ist jedoch eine *cis/trans*-Isomerisierung von Peptidyl-Prolyl-Bindungen im Cystin-Knoten. De Young und Mitarbeiter schlossen aufgrund der erhöhten Aktivierungsenergie eine Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung als Ursache für die langsame Entfaltung von NGF aus (De Young *et al.*, 1996). Zwei der Proline des rh-NGF befinden sich im Ring des Cystin-Knotens, also in sterisch eingeschränkter Umgebung. Daher könnte die Aktivierungsenergie für die Isomerisierung dieser Peptidyl-Prolyl-Bindungen höher sein als der Literaturwert von 18 - 22 kcal/mol, welcher für sterisch nicht eingeschränkte Peptide bestimmt wurde (Schmid & Baldwin, 1979). In der Tat ist der für rh-NGF gefundene Wert von 26 - 27 kcal/mol (De Young *et al.*, 1996) nur geringfügig höher als der Literaturwert für Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierungen von Peptiden. Die Neurotrophine NGF aus der Maus (mu-NGF), rh-NT-3 und rh-BDNF zeigen ebenfalls eine langsame Entfaltung von M1 nach M2. Für die Entfaltung dieser Proteine errechneten die Autoren Aktivierungsenergien von 22, 24 und 24 kcal/mol (De Young *et al.*, 1999). Diese Werte liegen noch näher am Literaturwert als der von rh-NGF. Ein weiteres Indiz, dass Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung die tatsächliche Ursache für die langsame Entfaltung von rh-NGF sein könnte, liefert ein Vergleich der Entfaltungskinetiken von rh-NGF und NGF aus der Maus (mu-NGF). Die Bestimmung der Entfaltungskinetiken bei 25°C ergab für rh-NGF eine Geschwindigkeitskonstante von 0,033 h⁻¹, im Falle von mu-NGF betrug sie 0,30 h⁻¹ (DeYoung *et al.*, 1996; DeYoung *et al.*, 1999). Trotz gleich langer N-Termini lief die Bildung von M2 bei mu-NGF also zehnmal schneller ab. Rh-NGF und mu-NGF unterscheiden sich in insgesamt zwölf von 118 Aminosäureresten (Ullrich *et al.*, 1983). Drei dieser nicht-konservierten Aminosäuren sind in den 15 N-terminalen Aminosäureresten lokalisiert, und drei in den Aminosäureresten 59-67 im Ring des Cystin-Knotens. Rh-NGF enthält zwei Proline im Ring des Cystin-Knotens, mu-NGF nur eines. Diese sind im rh-NGF außerdem nur durch ein Asparagin voneinander getrennt, befinden sich also in fast unmittelbarer Nachbarschaft, müssen daher sterisch relativ stark konformell behindert sein und sollten deshalb auch langsamer isomerisieren. Rh-BDNF und rh-NT-3 besitzen jeweils einen Prolin-Rest im Ring des Cystin-Knotens (s. Abb. 3.7.2.4). Proline, die sich dabei näher an einer der beiden Disulfidbrücken befinden, sind sterisch stärker eingeschränkt als solche, die weiter entfernt von den Disulfidbrücken lokalisiert sind und

sollten daher langsamer isomerisieren. Im mu-NGF und rh-NT-3 liegt das Prolin genau in der Mitte zwischen zwei Cysteinen, im rh-BDNF ist der Prolin-Rest zwei Aminosäuren von einer Disulfidbrücke entfernt. Die theoretische Geschwindigkeit der Entfaltung der Neurotrophine sollte aufgrund der vorhergehenden Überlegungen daher in der folgenden Reihenfolge zunehmen: rh-NGF < mu-NGF = rh-NT-3 < rh-BDNF. Dies kommt den tatsächlich beobachteten Kinetiken recht nahe: rh-NGF < mu-NGF < rh-NT-3 < rh-BDNF.

h-NGF	1	SSSHPIFHRGEFSVCDSVSVVW--GDKTTATDIKGKEVMVLGEVN-IN
mu-NGF	1	SSTHPVFHMGFEFSVCDSVSVVW--GDKTTATDIKGKEVTVLAEVN-IN
h-BDNF	1	-HSDPA-RRGELSVCDSEWVTAADKKTAVDMSGGTVTVLEKVP-VS
h-NT3	1	-YAEHKSHRGEYSVCDSSESLWV--TDKSSAIDIRGHQVTVLGEIK-TG
h-NGF	46	NSVFKQYFFETK CRDPNPVDSG CRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTM
mu-NGF	46	NSVFRQYFFETK CRASN PV ESG CRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTT
h-BDNF	46	KGQLKQYFYETK CNPMGYTKEG CRGIDKRHWNSQCRRTTQSYVRALTM
h-NT3	45	NSPVKQYFYETR CKEARPVKNG CRGIDDKHWNSQCKTSQTYVRALTSE
h-NGF	94	-GKQAARFIRIDT CV CVLSRKAVRRA
mu-NGF	94	-EKQAARFIRIDT CV CVLSRKATRRA
h-BDNF	94	SKKRIGWRFIRIDT CV CTLTIKRGR--
h-NT3	93	NNKLVGWRWIRIDT CV CALSRKIGRT-

Abb. 3.7.2.4: Alignment der Aminosäuresequenzen einiger Neurotrophine. Die Aminosäurereste des Cystin-Knotens sind fett gedruckt (nach De Young *et al.*, 1999).

Abb. 3.7.2.5 zeigt ein Strukturmodell des Cystin-Knotens im rh-NGF. In der Kristallstruktur des rh-NGF sind die Aminosäurereste 61 - 66 des Rings interessanterweise ungeordnet und daher nicht aufgelöst (Wiesmann *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu sind diese Aminosäuren im mu-NGF zwar auch lösungsmittel exponiert, aber dennoch aufgelöst. Vermutlich beruht dieser Unterschied auf Sequenz-Unterschieden zwischen h-NGF und mu-NGF in dieser Region. Die Größe des Rings im Modell beträgt ca. $16,0 \times 8,4 \text{ \AA}$. Laut „Loop Threading“-Hypothese kann der N-Terminus nicht allein, sondern muss stets im Kontext mit der Peptidkette N- und C-terminal von Cys15 durch den Ring fädeln. Außerdem sind die durchzufädelnden Aminosäurereste zusätzlich noch von einer Hydrathülle umgeben, die ebenfalls mitgeführt werden muss. Diese Fakten, zusammen mit den bisher gemachten Beobachtungen, macht unsere Hypothese wahrscheinlich, dass Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung allein für die langsame Entfaltung der Neurotrophine verantwortlich ist. Bei M2 könnte es sich demnach um eine Spezies handeln, bei der die Proline im Ring des Cystin-Knotens in eine andere Konformation, d.h. in *cis*, übergegangen sind. Dadurch wird der Knoten aufgeweitet, so dass M2 ein anderes Elutionsverhalten auf der RP-HPLC-Säule zeigt als M1. Zur Überprüfung dieser Vermutung sollte nun der Einfluss verschiedener PPIasen auf die Geschwindigkeit der Reaktion $M2 \rightarrow M1$ untersucht werden.

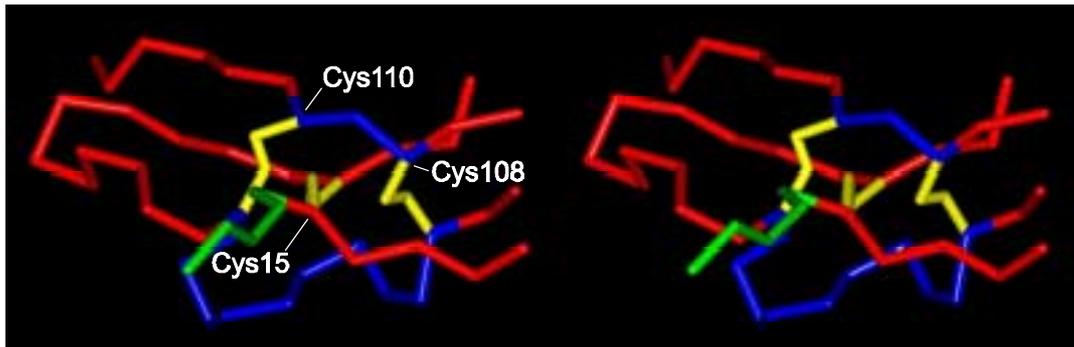


Abb. 3.7.2.5: Strukturmodell des Cystin-Knotens im rh-NGF (Stereodarstellung). Gezeigt sind lediglich die C_{α} -Atome des Peptidrückgrats (Ausschnitt). Der Ring des Cystin-Knotens ist blau dargestellt, die Disulfidbrücken gelb und der N-Terminus (beginnend mit Val10) grün. Das Modell wurde ausgehend von der Kristallstruktur des mu-NGF (McDonald *et al.*, 1991; PDB-Eintrag 1BET) mithilfe des Programms „InsightII“ (Version 2000) an einem Silicon Graphics Computer „Indigo 2“ erstellt. Die Stereodarstellung wurde mit dem Programm „Prepi“ generiert (Version 0.9; Biomolecular Modelling Laboratory, London, UK).

3.7.3 Untersuchung der langsamen Faltung von rh-NGF in Gegenwart verschiedener PPIasen

Als PPIasen wurden rh-FKBP 12, rh-Cyp 18, sowie SlyD und Parvulin 10 aus *E. coli* gewählt und den Faltungsansätzen in 10-molarem Überschuss zu rh-NGF zugesetzt. Keines der vier Enzyme konnte den langsamen Faltungsschritt von rh-NGF beschleunigen (Abb. 3.7.3 und Tab. 3.7.3).

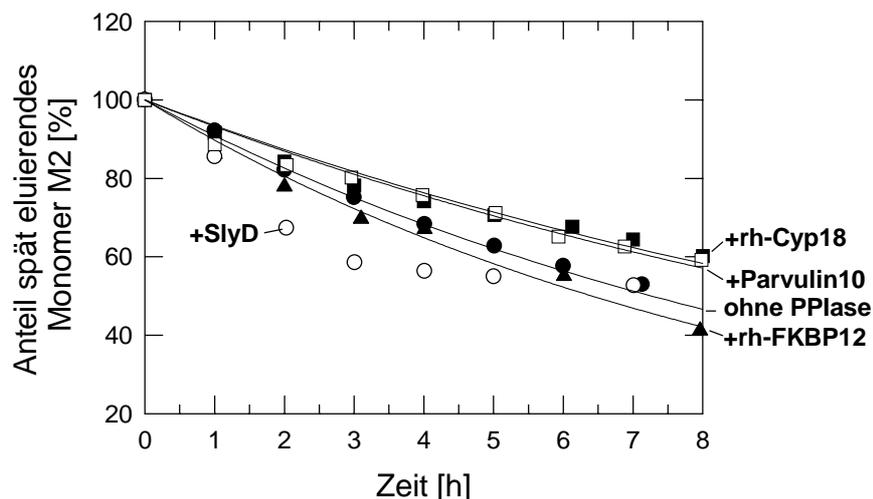


Abb. 3.7.3: Kinetiken der langsamen Faltung von rh-NGF (M2 → M1) in Anwesenheit verschiedener PPIasen. Die rh-NGF-Konzentration betrug 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Jede PPIase wurde jeweils in einem 10-fach molaren Überschuss zugesetzt. Als Faltungspuffer wurde 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0; 1 mM EDTA verwendet. Die Temperatur betrug 20°C. Der Rest-Gehalt an GdmCl betrug etwa 20 mM. Alle Kinetiken wurden bis auf diejenige mit SlyD-Zusatz mit einer Reaktion erster Ordnung angepasst. Die Faltung in Gegenwart von SlyD (weiße Kreise) erfolgte nach einer Reaktion höherer Ordnung. Symbolle: schwarze Kreise: kein PPIase-Zusatz; weiße Quadrate: + rh-Cyp18; schwarze Quadrate: + Parvulin10; schwarze Dreiecke: + rh-FKBP12.

zugesezte PPIase	Geschwindigkeitskonstante [s ⁻¹]
ohne PPIase	$2,65 \times 10^{-5} \pm 3,06 \times 10^{-7}$
rh-Cyp18	$1,87 \times 10^{-5} \pm 6,67 \times 10^{-7}$
Parvulin10	$1,94 \times 10^{-5} \pm 6,67 \times 10^{-7}$
rh-FKBP12	$3,00 \times 10^{-5} \pm 1,16 \times 10^{-7}$
SlyD	nicht bestimmt

Tab. 3.7.3: Berechnete Geschwindigkeitskonstanten der langsamen Faltung von rh-NGF (M2 → M1) in Gegenwart der verschiedenen PPIasen.

Ein Grund dafür könnte in der Substratspezifität der Enzyme liegen. Bei den Aminosäureresten, die den Prolinen im Ring des Cystin-Knotens vorangehen, handelt es sich um Asp60 und Asn62. Während FKBP eine große Substratspezifität zeigt - die $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werte variieren bis zu einem Faktor von 1000 - besitzt Cyclophilin nur geringe Spezifität bezüglich der dem Prolin vorangehenden Aminosäure (Harrison & Stein, 1990). Die Aktivität von SlyD ist generell geringer als diejenige, die von anderen PPIasen mit dem gleichen Substrat gefunden wurde (Hottenrott *et al.*, 1997). Parvulin bevorzugt ähnlich wie FKBP hydrophobe Aminosäuren wie Leu und Phe vor dem Prolin, lässt sich jedoch nicht durch FK506 inhibieren (Rahfeld *et al.*, 1994). Rh-Cyp18 war ein guter Kandidat für eine Katalyse der Faltung von rh-NGF (vgl. Golbik *et al.*, 1999). Jedoch auch mit diesem Enzym wurde keine Beschleunigung des Übergangs von M2 nach M1 beobachtet. Die Ursache hierfür liegt vermutlich in der starken Reststruktur, die der Cystin-Knoten auch in 6 M GdmCl aufgrund sterischer Einschränkungen noch besitzt. Generell ist auch die Katalyse von Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierungen durch PPIasen in Proteinen sehr viel ineffizienter als die Katalyse der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung in Modellpeptiden. Dies gilt insbesondere für stabile, für PPIasen sterisch unzugängliche Faltungsintermediate, wie der hier vorliegende starre Knoten. In der Tat kennt man einige langsame Faltungsreaktionen von Proteinen, die auf Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierungen beruhen, und die nicht durch PPIasen katalysiert werden (Nall, 1994). Es erstaunt daher nicht, dass der $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert einer PPIase bei der Proteinfaltung häufig um den Faktor 1000 kleiner ist als bei der Isomerisierung kleiner Peptidsubstrate (Schmid *et al.*, 1991; Scholz *et al.*, 1997).

Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung kann also als Ursache für den langsamen Faltungsschritt von rh-NGF nicht ausgeschlossen werden. Ein „Loop Threading“-Mechanismus ist unwahrscheinlich aufgrund der Enge des Rings im Cystin-Knoten und der Tatsache, dass die Kinetiken des Übergangs von M2 nach M1 vergleichbar sind, kann bislang aber nicht widerlegt werden.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Die Produktion von rekombinantem, humanen Pro-NGF in *E. coli* führte zur Bildung von *Inclusion Bodies*. Diese wurden isoliert, solubilisiert und anschließend mit einem optimierten Verfahren renaturiert. Voraussetzung für die Renaturierung war die Anwesenheit eines Redoxsystems, bestehend aus oxidiertem und reduziertem Glutathion, hoher Konzentrationen an L-Arginin (mindestens 0,75 M) sowie ein alkalisches Milieu. Mit einer Proteinkonzentration von 50 µg/ml wurden nach einer Zeit von 3 h bei 10°C Ausbeuten an renaturiertem rh-Pro-NGF von bis zu etwa 35 % erzielt. Im Gegensatz dazu konnte reifer rh-NGF mit einem optimierten industriellen Produktionsverfahren nur bei extrem niedriger Proteinkonzentration (2 µg/ml) renaturiert werden. Nach ≥ 100 h wurde eine Faltungsausbeute von maximal 10 % erhalten. Die Ergebnisse zeigen, dass die Pro-Sequenz von NGF in der Tat die Faltung des maturen Teils vermittelt.

Die Untersuchung der Quartärstruktur von rh-Pro-NGF ergab, dass dieses Protein wie der reife rh-NGF ebenfalls Dimere bildet. Untersuchungen zur Entfaltung von rh-NGF und rh-Pro-NGF in Gegenwart verschiedener GdmCl-Konzentrationen ergab, dass in beiden Proteinen die Stabilität des reifen Teils gleich oder sehr ähnlich ist. Obwohl die Pro-Sequenz fast ebenso groß wie der mature Teil ist, wird eine Dimerisierung durch das kovalent gebundene Pro-Peptid nicht verhindert. Die Pro-Sequenz muss also an der Außenseite des rh-Pro-NGF-Dimers lokalisiert sein. Das Fern-UV-CD-Spektrum von rh-Pro-NGF weist auf ein β -Faltblatt-Protein ohne α -helikale Anteile hin. Das Nah-UV-CD-Spektrum zeigt eine zusätzliche Feinstruktur im Bereich von 280 – 300 nm, die im Spektrum des reifen Proteins nicht vorhanden ist. Diese Feinstruktur könnte auf den einzigen Tryptophanrest in der Pro-Sequenz zurückzuführen sein, welcher sich in einer asymmetrischen Umgebung befindet. Versuche, rh-Pro-NGF zu kristallisieren, waren bisher ohne Erfolg (Daten nicht gezeigt).

Durch limitierte Proteolyse von rh-Pro-NGF mit Trypsin ließ sich reifer rh-NGF herstellen. Auf diese Weise dargestellter rh-NGF zeigte die gleiche biologische Aktivität (EC_{50} -Wert: 138 ± 33 pg/ml) im *DRG-Assay* wie der rh-NGF-Standard der Firma Roche Diagnostics (119 ± 8 pg/ml). Aber auch unprozessierter rh-Pro-NGF wies einen EC_{50} -Wert auf, der in der gleichen Größenordnung lag wie der des rh-NGF-Standards (311 ± 59 pg/ml). Dass sowohl Prä-Pro-NGF als auch Pro-NGF biologisch aktiv sind, wurde auch von anderen Autoren beschrieben (Edwards *et al.*, 1988; Chen *et al.*, 1997). Offenbar verhindert die kovalent gebundene (Prä-)Pro-Sequenz die Bindung an den TrkA-Rezeptor nicht. Zukünftige Untersuchungen könnten die biologische Funktion der Aktivität des Pro-Proteins aufklären.

Das humane NGF-Pro-Peptid wurde ebenfalls rekombinant in *E. coli* hergestellt. Es ließ sich als ein im Cytosol von *E. coli* lösliches Protein aus dem Rohextrakt isolieren. Das separate Pro-Peptid ist im Unterschied zu rh-Pro-NGF monomer und besitzt zwar Sekundärstruktur, jedoch nur wenig tertiäre Kontakte. Für zwei Peptide der NGF-Pro-Sequenz konnte in früheren Arbeiten biologische Aktivität nachgewiesen werden (Dicou *et al.*, 1997). Auch das rh-NGF-Pro-Peptid zeigte im *DRG-Assay* biologische Aktivität (EC_{50} -Wert = 596 ± 35 pg/ml). Ob diese ebenfalls durch Wechselwirkung mit TrkA erfolgt, und, wenn ja, über welche Bindungsepitope, ist bislang unbekannt.

Analytische Gelfiltration und PAGE unter nativen Bedingungen zeigten, dass das isolierte rh-NGF-Pro-Peptid nicht an nativen maturen rh-NGF zu binden vermag. Seine Funktion als Faltungsvermittler von rh-NGF besteht wahrscheinlich in der Wechselwirkung mit hydrophoben, zur Aggregation neigenden Faltungsintermediaten. Daher wurde untersucht, ob die Renaturierungsausbeute von maturem rh-NGF in Anwesenheit des separaten Pro-Peptids erhöht werden konnte. Dies war nicht der Fall. Entweder war die Aggregation der rh-NGF-Intermediate zu schnell, um durch eine Wechselwirkung mit der Pro-Sequenz inhibiert zu werden, oder die Wechselwirkung des Pro-Peptids mit dem maturen Protein war unter den gewählten Bedingungen nicht ausreichend stabil, um die Renaturierung des reifen rh-NGF zu unterstützen. Damit ist eine Analyse des Einflusses der Pro-Sequenz auf die rh-NGF-Renaturierung durch die Methode der Faltung *in trans* nicht möglich. Eine Möglichkeit, um dennoch den molekularen Mechanismus der Wirkung der Pro-Sequenz untersuchen zu können, besteht in der Konstruktion von Punkt- oder Deletionsmutationen im Pro-Peptid des rh-Pro-NGF. *In vivo*-Studien zeigten, dass zwei konservierte Bereiche der Pro-Sequenz für die Sekretion von biologisch aktivem NGF wichtig sind (Suter *et al.*, 1991). Des Weiteren könnte man Pro-NGF-Konstrukte mit unterschiedlich langen *Linkern* zwischen Pro-Peptid und reifem Teil herstellen oder die Pro-Sequenz an den C-Terminus des maturen NGF fusionieren. Um die Spezifität der Wechselwirkung des Pro-Peptids mit der reifen Sequenz zu untersuchen, könnte man Chimären aus den Pro-Sequenzen anderer Neurotrophine und dem reifen NGF konstruieren. Ein paarweiser Austausch der Cysteine im rh-Pro-NGF und rh-NGF gegen Serine oder Alanine könnte Aufschluss darüber geben, ob die Ausbildung der Disulfidbrücken für die Faltung kritisch ist. Vermutlich führt die Deletion jedoch bereits einer der drei Disulfidbrücken zur Aggregation des Wachstumsfaktors, da der Cystin-Knoten die Struktur des Proteins erheblich stabilisiert.

Eine Untersuchung disulfidverbrückter Faltungsintermediate von rh-Pro-NGF mittels Massenspektrometrie zeigte, dass bereits 15 min nach Beginn der Renaturierung natives Protein vorhanden war. Die Faltung war nach etwa 2 h abgeschlossen. Neben dem korrekt disulfid-

verbrückten Monomer ließen sich ein oder mehrere Isomere mit zwei Disulfidbrücken detektieren. Ob diese nicht-native Disulfidbrücken enthalten, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen. Im Gegensatz zur oxidativen Faltung von rh-Pro-NGF wurden im Falle des rh-NGF während der Renaturierung viele nicht-native Intermediate nachgewiesen. Erst nach 24 h wurde natives Monomer im Faltungsansatz detektiert. Nach 1 h wurde ein Faltungsintermediat nachgewiesen, das zwei native Disulfidbrücken enthielt, nämlich die des Rings im Cystin-Knoten. Ob diese Disulfidbrücken auch im rh-Pro-NGF zuerst gebildet werden, muss noch analysiert werden.

Die Entfaltung des oxidierten rh-NGF ist durch eine sehr langsame Kinetik charakterisiert. Als molekulare Ursache hierfür wird von De Young *et al.* ein Durchfädeln des N-Terminus durch den Ring des Cystin-Knotens postuliert („*Loop Threading*“-Hypothese; De Young *et al.*, 1996). Da der N-Terminus des rh-Pro-NGF aufgrund der Pro-Sequenz 103 Aminosäurereste (bzw. 104 mit nicht-prozessiertem Start-Methionin) länger ist als rh-NGF, sollte dies laut „*Loop Threading*“-Hypothese zu einer deutlich langsameren Faltung des oxidierten rh-Pro-NGF im Vergleich zum rh-NGF führen. Überraschenderweise war dies nicht der Fall. Daher wird angenommen, dass es sich beim langsamen Entfaltungs- bzw. Faltungsschritt um eine Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung handelt. Eine Untersuchung der Renaturierung von rh-NGF in Anwesenheit verschiedener PPIasen ergab jedoch keine Beschleunigung der Faltungsreaktion. Es ist allerdings möglich, dass die Enzyme aufgrund der Reststruktur im Bereich des Cystin-Knotens nicht mit dem Peptid-Rückgrat in Wechselwirkung treten konnten. Um zu überprüfen, ob Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung verantwortlich ist für die langsame Faltungsphase, könnte man die beiden Proline im Ring des rh-NGF sukzessive durch Alanine austauschen. Ist diese Isomerisierung tatsächlich Ursache für die extrem langsame Faltung, so sollte die Renaturierung der Mutanten deutlich schneller sein.

Neurotrophine spielen in Zukunft möglicherweise eine wichtige therapeutische Rolle bei der Behandlung peripherer und zentraler Neuropathien. Da sie untereinander eine hohe Sequenzhomologie aufweisen, ist es sehr wahrscheinlich, dass sich neben rh-NGF auch die anderen Vertreter dieser Proteinfamilie aus rekombinantem *Inclusion Body*-Material leicht und mit hohen Ausbeuten in ihrer Pro-Form *in vitro* renaturieren lassen. Dies stellt eine attraktive, preiswerte Variante zur rekombinanten Herstellung in Eukaryonten dar. Falls die Pro-Proteine der anderen Neurotrophine ebenfalls biologisch aktiv sind, könnte man auch auf eine anschließende limitierte Proteolyse zur Gewinnung der reifen Proteine verzichten und die Pro-Formen direkt als Therapeutikum einsetzen.

5 Literatur

- Ahmed, A. K., Schaffer, S. W. & Wetlaufer, D. B. (1975). Nonenzymic reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by air oxidation and by glutathione oxidoreduction buffers. *J. Biol. Chem.* **250**, 8477-8482.
- Aloyz, R. S., Bamji, S. X., Pzniak, C. D., Toma, J. G., Atwal, J., Kaplan, D. R. & Miller, F. D. (1998). p53 is essential for developmental neuron death as regulated by the TrkA and p75 neurotrophin receptors. *J. Cell. Biol.* **143**, 1691-1703.
- Andersson, E., Hellman, L., Gullberg, U. & Olsson, I. (1998). The role of the propeptide for processing and sorting of human myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.* **273**, 4747-4753.
- Anfinsen, C. B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**, 223-230.
- Apfel, S.C., Arezzo, J. C., Lipson, L. & Kessler, J. A. (1992). Nerve growth factor prevents experimental cisplatin neuropathy. *Ann. Neurol.* **31**, 76-80.
- Apfel, S. C. & Kessler, J. A. (1996). Neurotrophic factors in the treatment of peripheral neuropathy. In: *Growth Factors as Drugs for Neurological and Sensory Disorders. Ciba Foundation Symposium 196*, pp 98-108, Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore.
- Apfel, S. C., Kessler, J. A., Adornato, B. T., Litchy, W. J., Sanders, C. & Rask, C. A. (1998). Recombinant human nerve growth factor in the treatment of diabetic polyneuropathy. NGF study group. *Neurology*, **51**, 695-702.
- Apfel, S. C., Lipton, R. B., Arezzo, J. C. & Kessler, J. A. (1991). Nerve growth factor prevents toxic neuropathy in mice. *Ann. Neurol.* **29**, 87-90.
- Arakawa, T., Haniu, M., Narhi, L. O., Miller, J. A., Talvenheimo, J., Philo, J. S., Chute, H. T., Matheson, C., Carnahan, J., Louis, J.-C., Yan, Q., Welcher, A. A. & Rosenfeld, R. (1994). Formation of heterodimers from three neurotrophins, nerve growth factor, neurotrophin-3, and brain-derived neurotrophic factor. *J. Biol. Chem.* **269**, 27833-27839.
- Arnold, U. & Ulbrich-Hofmann, R. (1999). Quantitative protein precipitation from guanidine hydrochloride-containing solutions by sodium deoxycholate/trichloroacetic acid. *Anal. Biochem.* **271**, 197-199.
- Aylward G. H. & Findlay, G. H. (1986). Datensammlung Chemie in SI-Einheiten. 2. Auflage. Verlag Chemie, Weinheim.
- Baker, D., Sohl, J. L. & Agard, D. A. (1992). A protein-folding reaction under kinetic control. *Nature* **356**, 263-265.
- Bamji, S. X., Majdan, M., Pozniak, C. D., Belliveau, D. J., Aloyz, R., Kohn, J., Causing C. G. & Miller, F. D. (1998). The p75 neurotrophin receptor mediates neuronal apoptosis and is essential for naturally occurring sympathetic neuron death. *J. Cell. Biol.* **140**, 911-923.
- Barbacid M. (1994). The Trk family of neurotrophin receptors. *J. Neurobiol.* **25**, 1386-1403.
- Barde, Y.-A. (1990). The nerve growth factor family. *Prog. Growth Factor Res.* **2**, 237-248.
- Barnett, J., Chow, J., Nguyen, B., Eggers, D., Osen, E., Jarnagin, K. Saldou, N., Straub, K., Gu, L., Erdos, L., Chaing, H.-S., Fausnaugh, J., Townsend, R. R., Lile, J., Collins, F. & Chan, H. (1991). Physicochemical characterization of recombinant human nerve growth factor produced in insect cells with a baculovirus vector. *J. Neurochem.* **57**, 1052-1061.
- Bax, B., Blundell, T. L., Murray-Rust, J. & McDonald, N. Q. (1997). Structure of mouse 7S NGF: a complex of nerve growth factor with four binding proteins. *Structure* **5**, 1275-1285.
- Belliveau, D. J., Krivko, I., Kohn, J., Lachance, C., Pozniak, C., Rusakov, D., Kaplan, D. & Miller, F. D. (1997). NGF and neurotrophin-3 both activate TrkA on sympathetic neurons but differentially regulate survival and neuritogenesis. *J. Cell. Biol.* **136**, 375-388.
- Berger, E. A. & Shooter, E. M. (1977). Evidence for pro- β -nerve growth factor, a biosynthetic precursor to β -nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 3647-3651.
- Berkemeier, L. R., Winslow, J. W., Kaplan, D. R., Nikolics, K., Goeddel, D. V. & Rosenthal A. (1991). Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron* **7**, 857-66.
- Bibel, M., Hoppe, E. & Barde, Y.-A. (1999). Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75^{NTR}. *EMBO J.* **18**, 616-622.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.

- Borasio, G. D., Markus, A., Wittinghofer, A., Barde, Y.-A. & Heumann, R.** (1993). Involvement of ras p21 in neurotrophin-induced response of sensory, but not sympathetic neurons. *J. Cell. Biol.* **121**, 665-672.
- Bothwell, M. A. & Shooter, E. M.** (1977). Dissociation equilibrium constant of beta nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* **252**, 8532-8536.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Bradshaw, R. A., Blundell, T. L., Lapatto, R., McDonald, N. Q. & Murray-Rust, J.** (1993). Nerve growth factor revisited. *Trends Biochem. Sci.* **18**, 48-52.
- Braun, P., Tommassen, J. & Filloux, A.** (1996). Role of the propeptide in folding and secretion of elastase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **19**, 297-306.
- Bresnahan, P. A., Leduc, R., Thomas, L., Thorner, J., Gibson, H. L., Brake, A. J., Barr, P. J. & Thomas, G.** (1990). Human *fur* gene encodes a yeast KEX2-like endoprotease that cleaves pro-beta-NGF *in vivo*. *J. Cell Biol.* **111**, 2851-2859.
- 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.
- Brumbaugh, J. A., Middendorf, L. R., Grone, D., Reiser, G., Morgan, C. & Ruth, J.** (1987). Continuous on-line DNA sequencing. *J. Cell Biol.* **105**, 155a.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J., & Greenberg, M. E.** (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor. *Cell* **96**, 857-868.
- Buchner, J. & Rudolph, R.** (1991). Renaturation, purification and characterization of recombinant Fab-fragments produced in *Escherichia coli*. *Bio/Technology* **9**, 157-162.
- Burton, L. E., Schmelzer, C. H., Szonyi, E., Yedinak, C. & Gorrell, A.** (1992). Activity and biospecificity of proteolyzed forms and dimeric combinations of recombinant human and murine nerve growth factor. *J. Neurochem.* **59**, 1937-1945.
- Carter, B. D., Kaltschmidt, C., Kaltschmidt, B., Offenhauser, N., Böhm-Matthaei, R., Bäuerle, P. A. & Barde, Y.-A.** (1996). Selective activation of NF- κ B by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. *Science* **272**, 542-545.
- Casaccia-Bonnel, P., Carter, B. D., Dobrowsky, R. T. & Chao, M. V.** (1996). Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. *Nature*, **383**, 716-719.
- Chapman, B. S. & Kuntz, I. D.** (1995). Modeled structure of the 75-kDa neurotrophin receptor. *Prot. Sci.* **4**, 1696-707.
- Chen, Y., Dicou, E. & Djakiew, D.** (1997). Characterization of nerve growth factor precursor protein expression in rat round spermatids and the trophic effects of nerve growth factor in the maintenance of Sertoli cell viability. *Mol. Cell. Endocrinol.* **127**, 129-136.
- Clos, J. & Dicou, E.** (1997). Two peptides derived from the nerve growth factor precursor enhance cholinergic enzyme activities *in vivo*. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **99**, 267-270.
- Cordon-Cardo, C., Tapley, P., Jing, S. Q., Nanduri, V., O'Rourke, E., Lamballe, F., Kovary, K., Klein, R., Jones, K. R., Reichardt, L. F. & Barbacid, M.** (1991). The trk tyrosine protein kinase mediates the mitogenic properties of nerve growth factor and neurotrophin-3. *Cell* **66**, 173-183.
- Creighton, T. E.** (1993). *Proteins. Structures and Molecular Properties* (2nd edn.). Freeman, New York.
- Davey, F. & Davies, A. M.** (1998). TrkB signalling inhibits p75-mediated apoptosis induced by nerve growth factor in embryonic proprioceptive neurons. *Curr. Biol.* **8**, 915-918.
- Davies, A. M.** (1989). Neurotrophic factor bioassay using dissociated neurons. In: *Nerve Growth Factors* (Rusch, R. A., ed.), pp 95-109, Wiley & Sons, Boston.
- 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* **257**, 369-373.
- Datta, S. R., Brunet, A. & Greenberg, M. E.** (1999). Cellular survival: a play in three Acts. *Genes Dev.* **13**, 2905-2927.
- De Bernardez-Clark, E., Schwarz, E. & Rudolph, R.** (1999). Inhibition of aggregation side reactions during *in vitro* protein folding. *Methods Enzymol.* **309**, 217-236.
- Dechant, G. & Barde, Y.-A.** (1997). Signalling through the neurotrophin receptor p75^{NTR}. *Curr. Opin. Neurobiol.* **7**, 413-418.

- Del Sal, G., Manfioletti, G. & Schneider, C.** (1989). The CTAB-DNA precipitation method: a common mini-scale preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing. *Biotechniques* **7**, 514-520.
- De Young, L. R., Burton, L. E., Liu, J., Powell, M. F., Schmelzer, C. H. & Skelton, N. J.** (1996). RhNGF slow unfolding is not due to proline isomerization: possibility of a cystine knot loop-threading mechanism. *Prot. Sci.* **5**, 1554-1566.
- De Young, L. R., Schmelzer, C. H. & Burton, L. E.** (1999). A common mechanism for recombinant human NGF, BDNF, NT-3, and murine NGF slow unfolding. *Prot. Sci.* **8**, 2513-2518.
- Dicou, E., Pflug, B., Magazin, M., Lehy, T., Djakiew, D., Ferrara, P., Nerrière, V. & Harvie, D.** (1997). Two peptides derived from the nerve growth factor precursor are biologically active. *J. Cell. Biol.* **136**, 389-398.
- Eder, J., Rheinacker, M. & Fersht, A. R.** (1993). Folding of subtilisin BPN': characterization of a folding intermediate. *Biochemistry* **32**, 18-26.
- Edman, P. & Begg, G.** (1967). A protein sequenator. *Eur. J. Biochem.* **1**, 80-91.
- Edwards, R. H. & Rutter, W. J.** (1997). Recombinant nerve growth factor. *US-Pat.* 5,683,894.
- Edwards, R. H., Selby, M. J., Garcia, P. D. & Rutter, W. J.** (1988). Processing of the native nerve growth factor precursor to form biologically active nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* **263**, 6810-6815.
- Eilers, A., Whitfield, J., Babij, C., Rubin, L. L. & Ham, J.** (1998). Role of the jun kinase pathway in the regulation of c-Jun expression and apoptosis in sympathetic neurons. *J. Neurosci.* **18**, 1713-1724.
- Eriksdotter-Jonhagen, M., Nordberg, A., Amberla, K., Bäckman, L., Ebendal, T., Meyerson, B., Olson, L., Seiger, Å., Shigeta, M., Theodorsson, E., Viitanen, M., Winblad, B. & Wahlund, L. O.** (1998). Intracerebroventricular infusion of nerve growth factor in three patients with Alzheimer's disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **9**, 246-257.
- Ernfors, P., Ibáñez, C. F., Ebendal, T., Olson, L. & Persson, H.** (1990). Molecular cloning and neurotrophic activities of a protein with structural similarities to nerve growth factor: developmental and topographical expression in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 5454-5458.
- Farhadi, H., Pareek, S., Day, R., Dong, W., Chrétien, M., Bergeron, J. J., Seidah, N.G. & Murphy, R. A.** (1997). Prohormone convertases in mouse submandibular gland: co-localization of furin and nerve growth factor. *J. Histochem. Cytochem.* **45**, 795-804.
- Fox, T., de Miguel, E., Mort, J. S. & Storer, A. C.** (1992). Potent slow-binding inhibition of cathepsin B by its propeptide. *Biochemistry* **31**, 12571-12576.
- Frade, J. M., Rodríguez-Tébar, A. & Barde, Y.-A.** (1996). Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature* **383**, 166-168.
- Freeman, R.** (1999). Human studies of recombinant human nerve growth factor and diabetic peripheral neuropathy. *Eur. Neurol.* **41**, 20-26.
- Fusek, M., Mares, M., Vagner, J., Voburka, Z. & Baudys, M.** (1991). Inhibition of aspartic proteinases by propeptide of human procathepsin D and chicken pepsinogen. *FEBS Lett.* **287**, 160-162.
- 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.
- Gilbert, H. F.** (1990). Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv. Enzymol.* **63**, 69-172.
- Gill, S. C. & von Hippel, P. H.** (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319-326.
- Golbik, R., Fischer, G. & Fersht, A. R.** (1999). Folding of barstar C40A/C82A/P27A and catalysis of the peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerization by human cytosolic cyclophilin (Cyp18). *Prot. Sci.* **8**, 1505-1514.
- Götz, R., Köster, R., Winkler, C., Raulf, F., Lottspeich, F., Schartl, M. & Thoenen, H.** (1994). Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature* **372**, 266-269.
- Gray, A. M. & Mason, A. J.** (1990). Requirement for activin A and transforming growth factor-beta 1 pro-regions in homodimer assembly. *Science* **247**, 1328-1330.
- Gray, T. E., Eder, J., Bycroft, M., Day, A. G. & Fersht, A. R.** (1993). Refolding of barnase mutants and pro-barnase in the presence and absence of GroEL. *EMBO J.* **12**, 4145-4150.
- Gray, W. R.** (1993). Disulphide structures of highly bridged peptides: a new strategy for analysis. *Prot. Sci.* **2**, 1732-1748.

- Grewal, S. S., York, R. D. & Stork, P. J. S. (1999). Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons. *Curr. Opin. Neurobiol.* **9**, 544-553.
- Grodberg, J. & Dunn, J. J. (1988). *OmpT* encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J. Bacteriol.* **170**, 1245-1253.
- Habeeb, A. F. S. A. (1972). Reaction of protein sulfhydryl groups with Ellman's reagent. *Meth. Enzymol.* **25**, 457-464.
- Hallböök, F., Ibáñez, C. F. & Persson, H. (1991). Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron* **6**, 845-858.
- Harding, S.E. (1997). Hydrodynamic properties of proteins. In: *Protein Structure: A Practical Approach* (2nd edn., Creighton, T. E., ed.), pp 219-251. IRL-Press, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo.
- Harrison, R. K. & Stein, R. L. (1990). Substrate specificities of the peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase activities of cyclophilin and FK-506 binding protein: evidence for the existence of a family of distinct enzymes. *Biochemistry* **29**, 3813-3816.
- Hefti, F. (1994). Neurotrophic factor therapy for nervous system degenerative diseases. *J. Neurobiol.* **25**, 1418-1435.
- Hetman, M., Cananaugh, J. E., Kimelman, D. & Xia, Z. (2000). Role of glycogen synthase kinase-3 β in neuronal apoptosis induced by trophic withdrawal. *J. Neurosci.* **20**, 2567-2574.
- Hillger, F. (1999). Humanes proBMP-2: Rekombinante Expression und Rückfaltung aus Einschlußkörpern. Diplomarbeit, Universität Halle-Wittenberg.
- Hobson, A. H., Buckley, C. M., Aamand, J. L., Jørgensen, S. T., Diderichsen, B. & McConnell, D. J. (1993). Activation of a bacterial lipase by its chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 5682-5686.
- Hohn, A., Leibrock, J., Bailey, K. & Barde, Y.-A. (1990). Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* **344**, 339-341.
- Holden, P. H., Asopa, V., Robertson, A. G., Clarke, A. R., Tyler, S., Bennett, G. S., Brain, S. D., Wilcock, G. K., Allen, S. J., Smith, S. K. & Dawbarn, D. (1997). Immunoglobulin-like domains define the nerve growth factor binding site of the TrkA receptor. *Nat. Biotechnol.* **15**, 668-672.
- Holgado-Madruga, M., Moscatello, D. K., Emlet, D. R., Dieterich, R. & Wong, A. J. (1997). Grb-2 associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 12419-12424.
- Hottenrott, S., Schumann, T., Plückthun, A., Fischer, G. & Rahfeld, J. U. (1997). The *Escherichia coli* SlyD is a metal ion-regulated peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase. *J. Biol. Chem.* **272**, 15697-15701.
- Ibáñez, C. F., Ebendal, T., Barbany, G., Murray-Rust, J., Blundell, T. L., & Persson, H. (1992). Disruption of the low affinity receptor-binding site in NGF allows neuronal survival and differentiation by binding to the *trk* gene product. *Cell* **69**, 329-341.
- Ibáñez, C. F., Ilag, L. L., Murray-Rust, J. & Persson, H. (1993). An extended surface of binding to Trk tyrosine kinase receptors in NGF and BDNF allows the engineering of a multifunctional pan-neurotrophin. *EMBO J.* **12**, 2281-2293.
- Ido, Y., Vindigni, A., Chang, K., Stramm, L., Chance, R., Heath, W F., DiMarchi, R. D., Di Cera E. & Williamson, J. R. (1997). Prevention of vascular and neural dysfunction in diabetic rats by C-peptide. *Science* **277**, 563-566.
- Ikemura, H., Takagi, H. & Inouye, M. (1987). Requirement of pro-sequence for the production of active subtilisin E in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **262**, 7859-7864.
- Ilag, L. L., Lonnerberg, P., Persson, H. & Ibáñez, C. F. (1994). Role of variable beta-hairpin loop in determining biological specificities in neurotrophin family. *J. Biol. Chem.* **269**, 19941-19946.
- Inouye, M. (1991). Intramolecular chaperone: the role of the pro-peptide in protein folding. *Enzyme* **45**, 314-321.
- Ip, N. Y., Ibáñez, C. F., Nye, S. H., McClain, J., Jones, P. F., Gies, D. R., Belluscio, L., Le Beau, M. M., Espinosa, R., Suinto, S. P., Persson, H. & Yancopoulos, G. D. (1992). Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 3060-3064.
- Isackson, P. J. & Bradshaw, R. A. (1984). The alpha-subunit of mouse 7 S nerve growth factor is an inactive serine protease. *J. Biol. Chem.* **259**, 5380-5383.
- Kahle, P., Burton, L. E., Schmelzer, C. H. & Hertel, C. (1992). The amino terminus of nerve growth factor is involved in the interaction with the receptor tyrosine kinase p140^{trkA}. *J. Biol. Chem.* **267**, 22707-22710.

- Kaplan, D. R., Hempstead, B. L., Martin-Zanca, D., Chao, M. V. & Parada, L. F. (1991). The *trk* proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science* **252**, 554-558.
- Kaplan, D. R. & Miller, F. D. (2000). Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* **10**, 381-391.
- Khursigara, G., Orlinick, J. R. & Chao, M. V. (1999). Association of the p75 neurotrophin receptor with TRAF6. *J. Biol. Chem.* **274**, 2597-2600.
- Kimpinski, K., Jelinski, S. & Mearow, K. (1999). The anti-p75 antibody, MC192, and brain-derived neurotrophic factor inhibit nerve growth factor-dependent neurite growth from adult sensory neurons. *Neurosci.* **93**, 253-263.
- King, J. & Laemmli, U. K. (1971). Polypeptides of the tail fibres of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* **62**, 465-477.
- Klein, R., Jing, S. Q., Nanduri, V., O'Rourke, E. & Barbacid, M. (1991a). The *trk* proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell* **65**, 189-197.
- Klein, R., Nanduri, V., Jing, S. A., Lamballe, F., Tapley, P., Bryant, S., Cordon-Cardo, C., Jones, K. R., Reichardt, L. F. & Barbacid, M. (1991b). The *trkB* tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell* **66**, 395-403.
- Klein, R., Parada, L. F., Coulier, F. & Barbacid M. (1989). *trkB*, a novel tyrosine protein kinase receptor expressed during mouse neural development. *EMBO J.* **8**, 3701-3709.
- Korhonen, J. M., Said, F. A., Wong, A. J. & Kaplan, D. R. (1999). *Gab1* mediates neurite outgrowth, DNA synthesis, and survival in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 37307-37314.
- Korsching, S., Auburger, G., Heumann, R., Scott, J. & Thoenen, H. (1985). Levels of nerve growth factor and its mRNA in the central nervous system of the rat correlate with cholinergic innervation. *EMBO J.* **4**, 1389-1393.
- Kraulis, P. J. (1991). MOLSCRIPT: A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **24**, 946-950.
- Krishnan, B. R., Blakesley, R. W. & Berg, D. E. (1991). Linear amplification DNA sequencing directly from single phage plaques and bacterial colonies. *Nucleic Acids Res.* **19**, 1153.
- Krüttgen, A., Heymach, J. V. Jr., Kahle, P. J. & Shooter, E. M. (1997). The role of the nerve growth factor carboxyl terminus in receptor binding and conformational stability. *J. Biol. Chem.* **272**, 29222-29228.
- Kullander, K., Kaplan, D. & Ebendal, T. (1997). Two restricted sites on the surface of the nerve growth factor molecule independently determine specific *TrkA* receptor binding and activation. *J. Biol. Chem.* **272**, 9300-9307.
- Ladiwala, U., Lachance, C., Simoneau, S. J. J., Bhakar, A., Barker, P. A. & Antel, J. P. (1998). p75 neurotrophin receptor expression on adult human oligodendrocytes: signaling without cell death in response to NGF. *J. Neurosci.* **18**, 1297-1304.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lai, K. O., Fu, W. Y., Ip, F. C. & Ip, N. Y. (1998). Cloning and expression of a novel neurotrophin, NT-7, from carp. *Mol. Cell. Neurosci.* **11**, 64-76.
- Lamballe, F., Klein, R. & Barbacid, M. (1991). *trkC*, a new member of the *trk* family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* **66**, 967-979.
- Lehmann, M., Fournier, A., Selles-Navarro, I., Dergham, P., Sebok, A., Leclerc, N., Tigyi, G. & McKerracher, L. (1999). Inactivation of Rho signaling pathway promotes CNS axon regeneration. *J. Neurosci.* **19**, 7537-7547.
- Le-Niculescu, H., Bonfoco, E., Kasuya, Y., Claret, F.-X., Green, D. R. & Karin, M. (1999). Withdrawal of survival factors results in activation of the JNK pathway in neuronal cells leading to Fas ligand induction and cell death. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 751-763.
- Levi-Montalcini, R. (1987). The nerve growth factor 35 years later. *Science* **237**, 1154-1162.
- Levinson, A. D. (1999). Phase III trial with nerve growth factor did not reach ist goal. Genentech- Presseerklärung vom 8. April (http://www.gene.com/news/1999/19990408_115600.html).
- Li, Y. & Inouye, M. (1996). The mechanism of autoprocessing of the propeptide of prosubtilisin E: intramolecular or intermolecular event? *J. Mol. Biol.* **262**, 591-594.
- Maisonpierre, P. C., Belluscio, L., Squinto, S., Ip, N. Y., Furth, M. E., Lindsay, R. M. & Yancopoulos, G.D. (1990). Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science* **247**, 1446-1451.

- Marie-Claire, C., Roques, B. P. & Beaumont, A. (1998). Intramolecular processing of prothermolysin. *J. Biol. Chem.* **273**, 5697-5701.
- Marie-Claire, C., Ruffet, E., Beaumont, A. & Roques, B.P. (1999). The prosequence of thermolysin acts as an intramolecular chaperone when expressed *in trans* with the mature sequence in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **285**, 1911-1915.
- Martin-Zanca, D., Oskam, R., Mitra, G., Copeland, T. & Barbacid, M. (1989). Molecular and biochemical characterization of the human *trk* proto-oncogene. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 24-33.
- McArthur, J. C., Yiannoutsos, C., Simpson, D. M., Adornato, B. T., Singer, E. J., Hollander, H., Marra, C., Rubin, M., Cohen, B. A., Tucker, T., Navia, B. A., Schifitto, G., Katzenstein, D., Rask, C., Zaborski, L., Smith, M. E., Shriver, S., Millar, L. & Clifford, D. B. (2000). A phase II trial of nerve growth factor for sensory neuropathy associated with HIV infection. AIDS linical trials group team 291. *Neurology* **54**, 1080-1088.
- McDonald, N. Q. & Hendrickson, W. A. (1993). A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell* **73**, 421-424.
- McDonald, N. Q., Lapatto, R., Murray-Rust, J., Gunning, J. Wlodawer, A. & Blundell, T. L. (1991). New protein fold revealed by a 2.3 Å resolution crystal structure of nerve growth factor. *Nature* **354**, 411-414.
- McLellan, T. (1982). Electrophoresis buffers for polyacrylamide gels at various pH. *Anal. Biochem.* **126**, 94-99.
- Merritt, E. A. & Bacon, D. J. (1997). Raster3D – photorealistic molecular graphics. *Methods Enzymol.* **277**, 505-524.
- Mobley, W. C, Schenker, A. & Shooter, E. M. (1976). Characterization and isolation of proteolytically modified nerve growth factor. *Biochemistry* **15**, 5543-5552.
- Moore, J. B. Jr., Mobley, W. C. & Shooter, E. M. (1974). Proteolytic modification of the beta nerve growth factor protein. *Biochemistry* **13**, 833-840.
- Mowla, S. J., Pareek, S., Farhadi, H. F., Petrecca, D., Fawcett, J. P., Seidah, N. G., Morris, S. J., Sossin, W. S. & Murphy, R. A. (1999). Differential sorting of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **19**, 2069-2080.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335-350.
- Nall, B. T. (1994). Proline isomerization as a rate-limiting step. In: *Mechanisms of Protein Folding* (Pain, R. H. ed.), pp 80-103. IRL Press, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo.
- Narhi, L. O., Rosenfeld, R., Talvenheimo, J., Prestrelski, S. J., Arakawa, T., Lary, J. W., Kolvenbach, C. G., Hecht, R., Boone, T. & Miller, J. A. (1993). Comparison of the biophysical characteristics of human brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* **268**, 13309-13317
- Nesterenko, M. V., Tilley, M. & Upton, S. J. (1994). A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **28**, 239-242.
- Nobes, C. D. & Tolkovsky, A. M. (1995). Neutralizing anti-p21ras Fabs suppress rat sympathetic neuron survival induced by NGF, LIF, CNTF and cAMP. *Eur. J. Neurosci.* **7**, 344-350.
- O'Connell, L., Hongo, J. A., Presta, L. G. & Tsoulfas, P. (2000). TrkA amino acids controlling specificity for nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* **275**, 7870-7877.
- Oefner, C., D'Arcy, A., Winkler, F. K., Eggimann, B. & Hosang, M. (1992). Crystal structure of human platelet-derived growth factor BB. *EMBO J.* **11**, 3921-3926.
- Ohta, Y., Hojo, H., Aimoto, S., Kobayashi, T., Zhu, X., Jordan, F. & Inouye, M. (1991). Pro-peptide as an intramolecular chaperone: renaturation of denatured subtilisin E with a synthetic pro-peptide. *Mol. Microbiol.* **5**, 1507-1510.
- Orsini, G. & Goldberg, M. E. (1978). The renaturation of reduced chymotrypsinogen A in guanidine HCl. Refolding versus aggregation. *J. Biol. Chem.* **253**, 3453-3458.
- Pace, C. N. (1986). Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol.* **131**, 266-280.
- Pallaghy, P. K., Nielsen, K. J., Craik, D. J. & Norton, R. S. (1994). A common structural motif incorporating a cystine knot and a triple-stranded beta-sheet in toxic and inhibitory polypeptides. *Prot. Sci.* **3**, 1833-1839.
- Perry-O'Keefe, H. & Kissinger, C.M. (1995). Enzymatic manipulation of DNA and RNA. In: *Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I* (Ausubel, F.M. et al., eds.), pp 3.1.16, Wiley & Sons, New York.

- Pharmacia LKB Biotechnology (ed.)** (1993). Gel filtration – Principles and Methods (6th edn.). Uppsala, Sweden.
- Posse de Chaves, E. I., Bussiere, M., Vance, D. E., Campenot, R. B. & Vance, J. E.** (1997). Elevation of ceramide within distal neurites inhibits neurite growth in cultured rat sympathetic neurons. *J. Biol. Chem.* **272**, 3028-3035.
- Price-Carter, M., Gray, W. R. & Goldenberg, D. P.** (1996). Folding of omega-conotoxins. 1. Efficient disulfide-coupled folding of mature sequences *in vitro*. *Biochemistry* **35**, 15537-15546.
- Radziejewski, C. & Robinson, R. C.** (1993). Heterodimers of the neurotrophic factors: formation, isolation, and differential stability. *Biochemistry* **32**, 13350-13356.
- Radziejewski, C., Robinson, R. C., DiStefano, P. S. & Taylor, J. W.** (1992). Dimeric structure and conformational stability of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Biochemistry* **31**, 4431-4436.
- Rahfeld, J. U., Schierhorn, A., Mann, K. & Fischer, G.** (1994). A novel peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **343**, 65-69.
- Ramer, M. S., Priestley, J. V. & McMahon, S. B.** (2000). Functional regeneration of sensory axons into the adult spinal cord. *Nature* **403**, 312-316.
- Reinshagen, M., Geerling, I., Eysselein, V. E., Adler, G., Huff, K. R., Moore, G. P. & Lakshmanan, J.** (2000). Commercial recombinant human beta-nerve growth factor and adult rat dorsal root ganglia contain an identical molecular species of nerve growth factor prohormone. *J. Neurochem.* **74**, 2127-2133.
- Riccio, A., Ahn, S., Davenport, C. M., Blendy, J. A. & Ginty, D. D.** (1999). Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons. *Science* **286**, 2358-2361.
- Rodriguez-Viciano, P., Warne, P. H., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Fry, M. J., Waterfield, M. D. & Downward, J.** (1994). Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* **370**, 527-532.
- Rosenthal, A., Goeddel, D. V., Nguyen, T., Lewis, M., Shih, A., Laramee, G. R., Nikolics, K. & Winslow, J. W.** (1990). Primary structure and biological activity of a novel human neurotrophic factor. *Neuron* **4**, 767-773.
- Rudolph, R., Böhm, G., Lilie, H. & Jaenicke, R.** (1997). Folding proteins. In: *Protein Function: A Practical Approach* (Creighton, T.E., ed.), pp 57-99, IRL-Press, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo.
- Rudolph, R. & Fischer, S.** (1990). Process for obtaining renatured proteins. *US-Pat.* 4,933,434.
- Rudolph, R., Fischer, S. & Mattes, R.** (1995). Process for the activation of t-PA or Ing after genetic expression in prokaryotes. *US-Pat.* 5,453,363.
- Rudolph, R. & Lilie, H.** (1996). *In vitro* folding of inclusion body proteins. *FASEB J.* **10**, 49-56.
- Ruoppolo M., Torella C., Kanda F., Panico M., Pucci P. Marino G. & Morris H. R.** (1996). Identification of disulphide bonds in the refolding of bovine pancreatic RNase A. *Folding & Design* **1**, 381-390.
- Rydén, M. & Ibáñez, C. F.** (1997). A second determinant of binding to the p75 neurotrophin receptor revealed by alanine-scanning mutagenesis of a conserved loop in nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* **272**, 33085-33091.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 5463-5467.
- Schaumburg, H. H., Berger, A. R. & Thomas, P. K.** (1992). Diabetic neuropathy. In *Disorders of Peripheral nerves* (Schaumburg, H. H., Berger, A. R. & Thomas, P. K., eds.), pp 91-109, FA Davis, Philadelphia.
- Schmelzer, C. H., Burton, L. E., Chan, W.-P., Martin, E., Gorman, C., Canova-Davis, E., Ling, V. T., Sliwkowski, M. B., McCray, G., Briggs, J. A., Nguyen, T. H. & Polastri, G.** (1992). Biochemical characterization of recombinant human nerve growth factor. *J. Neurochem.* **59**, 1675-1683.
- Schmid, F. X.** (1997) Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes. In: *Protein Structure: A Practical Approach* (2nd edn., Creighton, T. E., ed.), pp 261-297, IRL-Press, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo.
- Schmid, F.X. & Baldwin, R. L.** (1979). The rate of interconversion between the two unfolded forms of ribonuclease A does not depend on guanidinium chloride concentration. *J. Mol. Biol.* **133**, 285-287.
- Schmid, F. X., Lang, K., Kiefhaber, T., Mayer, S. & Schönbrunner, E. R.** (1991). Prolyl isomerase: its role in protein folding and speculation on its function in the cell. In: *Conformations and Forces in Protein*

- Folding* (Nall, B. T. & Dill, K. A. eds.), p 198, American Association for the Advancement of Science, Washington, D. C.
- Scholz, C., Rahfeld, J., Fischer, G. & Schmid, F. X. (1997). Catalysis of protein folding by parvulin. *J. Mol. Biol.* **273**, 752-762.
- Seidah, N. G., Benjannet, S., Pareek, S., Savaria, D., Hamelin, J., Goulet, B., Laliberté, J., Lazure, C., Chrétien, M. & Murphy, R. A. (1996). Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases. *Biochem. J.* **314**, 951-960.
- Seiger, Å., Nordberg, A., von Holst, H., Bäckman, L., Ebendal, T., Alafuzoff, I., Amberla, K., Hartvig, P., Herlitz, A., Lilja, A., Lundqvist, H., Långström, B., Meyerson, B., Persson, A., Viitanen, M., Winblad, B. & Olson, L. (1993). Intracranial infusion of purified nerve growth factor to an Alzheimer patient: the first attempt of a possible future treatment strategy. *Behav. Brain Res.* **57**, 255-261.
- Shen, S., Wiemelt, A. P., McMorris, F. A. & Barres, B. A. (1999). Retinal ganglion cells lose trophic responsiveness after axotomy. *Neuron* **23**, 285-295.
- Shih, A., Laramée, G. R., Schmelzer, C. H., Burton, L. E. & Winslow, J. W. (1994). Mutagenesis identifies amino-terminal residues of nerve growth factor necessary for Trk receptor binding and biological activity. *J. Biol. Chem.* **269**, 27679-27686.
- Shinde, U. P., Liu, J. J. & Inouye, M. (1997). Protein memory through altered folding mediated by intramolecular chaperones. *Nature* **389**, 520-522. (Erratum in *Nature* **392**, 210)
- Silen, J. L. & Agard, D. A. (1989). The alpha-lytic protease pro-region does not require a physical linkage to activate the protease domain *in vivo*. *Nature* **341**, 462-464.
- Sohl, J. L., Jaswal, S. S. & Agard, D. A. (1998). Unfolded conformations of alpha-lytic protease are more stable than its native state. *Nature* **395**, 817-819.
- Soilu-Hanninen, M., Ekert, P., Bucci T., Syroid, D., Bartlett, P. F. & Kilpatrick, T. J. (1999). Nerve growth factor signaling through p75 induces apoptosis in Schwann cells via a Bcl2-independent pathway. *J. Neurosci.* **19**, 4828-4838.
- Soppet, D., Escandon, E., Maragos, J., Middlemas, D. S., Reid, S. W., Blair, J., Burton, L. E., Stanton, B. R., Kaplan, D. R., Hunter, T., Nikolics, K. & Parada, L. F. (1991). The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the trkB tyrosine kinase receptor. *Cell* **65**, 895-903.
- Sørensen, P., Winther, J. R., Kaarsholm, N. C. & Poulsen, F. M. (1993). The pro region required for folding of carboxypeptidase Y is a partially folded domain with little regular structural core. *Biochemistry* **32**, 12160-12166.
- Steiner, D. F. & Clark, J. L. (1986). The spontaneous reoxidation of reduced beef and rat proinsulins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **60**, 622-629.
- Stryer, L. (1990). Biochemie. Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft, Heidelberg.
- Studier, F. W. & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130.
- Suter, U., Heymach, J. V., Jr. & Shooter, E. M. (1991). Two conserved domains in the NGF propeptide are necessary and sufficient for the biosynthesis of correctly processed and biologically active NGF. *EMBO J.* **10**, 2395-2400.
- Timm, D. E. & Neet, K. E. (1992). Equilibrium denaturation studies of mouse beta-nerve growth factor. *Prot. Sci.* **1**, 236-244.
- Timm, D. E., de Haseth, P. L. & Neet, K. E. (1994). Comparative equilibrium denaturation studies of the neurotrophins: nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin 3, and neurotrophin 4/5. *Biochemistry* **33**, 4667-4676.
- Torella C., Ruoppolo M., Marino G. & Pucci P. (1994). Analysis of RNase A refolding intermediates by electrospray-mass spectrometry. *FEBS Lett.* **352**, 301-306.
- Tsoufas, P., Soppet, D., Escandon, E., Tessarollo, L., Mendoza-Ramirez, J. L., Rosenthal, A., Nikolics, K. & Parada, L.F. (1993). The rat *trkC* locus encodes multiple neurogenic receptors that exhibit differential response to neurotrophin-3 in PC12 cells. *Neuron* **10**, 975-990.
- Ullrich, A., Gray, A., Berman, C. & Dull, T. J. (1983). Human beta-nerve growth factor gene sequence highly homologous to that of mouse. *Nature* **303**, 821-825.
- Ultsch, M. H., Wiesmann, C., Simmons, L. C., Henrich, J., Yang, M., Reilly, D., Bass, S. H. & de Vos, A. M. (1999). Crystal structures of the neurotrophin-binding domain of TrkA, TrkB and TrkC. *J. Mol. Biol.* **290**, 149-159.

- Urfer R, Tsoulfas P, Soppet D, Escandon E, Parada LF, Presta LG. (1994). The binding epitopes of neurotrophin-3 to its receptors trkC and gp75 and the design of a multifunctional human neurotrophin. *EMBO J.* **13**, 5896-5909.
- Varon, S., Nomura, J. & Shooter, E. M. (1967). Subunit structure of a high-molecular-weight form of the nerve growth factor from mouse submaxillary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **57**, 1782-1789.
- Varon, S., Nomura, J. & Shooter, E. M. (1968). Reversible dissociation of the mouse nerve growth factor protein into different subunits. *Biochemistry* **7**, 1296-1303.
- Vanhaesebroeck, B. & Alessi, D. R. (2000). The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem. J.* **346**, 561-576.
- Vogel, K. S., Brannan, C. I., Jenkins, N. A., Copeland, N. G. & Parada, L. F. (1995). Loss of neurofibromin results in neurotrophin-independent survival of embryonic sensory and sympathetic neurons. *Cell* **82**, 733-742.
- Vogelstein, B. & Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 615-619.
- Voorberg, J., Fontijn, R., van Mourik, J. A. & Pannekoek, H. (1990). Domains involved in multimer assembly of von willebrand factor (vWF): multimerization is independent of dimerization. *EMBO J.* **9**, 797-803.
- Waldmann, L. (1998). Spektroskopische Charakterisierung von Proteinen. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Weissman, J. S. & Kim, P. S. (1992). The pro region of BPTI facilitates folding. *Cell* **71**, 841-851.
- Wentzel, A., Christmann, A., Kratzner, R. & Kolmar, H. (1999). Sequence requirements of the GPNG beta-turn of the *Ecballium elaterium* trypsin inhibitor II explored by combinatorial library screening. *J. Biol. Chem.* **274**, 21037-21043.
- Whittemore, S. R., Ebendal, T., Lärkfors, L., Olson, L., Seiger, Å., Strömberg, I. & Persson, H. (1986). Development and regional expression of beta nerve growth factor messenger RNA and protein in the rat central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 817-821.
- Wiese, S., Metzger, F. Holtmann, B. & Sendtner, M. (1999). The role of p75^{NTR} in modulating neurotrophin survival effects in developing motoneurons. *Eur. J. Neurosci.* **11**, 1668-1676.
- Wiesmann, C., Ultsch, M. H., Bass, S. H. & de Vos, A. M. (1999). Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the TrkA receptor. *Nature* **401**, 184-188.
- Winther, J. R. & Sørensen, P. (1991). Propeptide of carboxypeptidase Y provides a chaperone-like function as well as inhibition of the enzymatic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 9330-9334.
- Winther, J. R., Sørensen, P. & Kielland-Brandt, M. C. (1994). Refolding of a carboxypeptidase Y folding intermediate *in vitro* by low-affinity binding of the proregion. *J. Biol. Chem.* **269**, 22007-22013.
- Wise, R. J., Pittman, D. D., Handin, R. I., Kaufman, R. J. & Orkin, S. H. (1988). The propeptide of von Willebrand factor independently mediates the assembly of von Willebrand multimers. *Cell* **52**, 229-236.
- Woo, S. B. & Neet, K. E. (1996). Characterization of histidine residues essential for receptor binding and activity of nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* **271**, 24433-24441.
- Woo, S. B., Timm, D. E. & Neet, K. E. (1995). Alteration of NH₂-terminal residues of nerve growth factor affects activity and Trk binding without affecting stability of conformation. *J. Biol. Chem.* **270**, 6278-6285.
- Yacoubian, T. A. & Lo, D. C. (2000). Truncated and full-length TrkB receptors regulate distinct modes of dendritic growth. *Nat. Neurosci.* **3**, 342-349.
- Yamashita, H., Avraham, S., Jiang, S., Dikic, I., Avraham, H. (1999). The Csk homologous kinase associates with TrkA receptors and is involved in neurite outgrowth of PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 15059-15065.
- Yao, R. & Cooper, G. M. (1995). Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* **267**, 2003-2006.
- Yoon, S. O., Carter, B. D., Casaccia-Bonnel, P. & Chao, M. V. (1998). Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival. *J. Neurosci.* **18**, 3273-3281.
- Zettlmeissl, G., Rudolph, R. & Jaenicke, R. (1979). Effects of low concentrations of guanidine HCl on the reconstitution of lactic dehydrogenase from pig muscle *in vitro*. Evidence for guanidine binding to the native enzyme. *Eur. J. Biochem.* **100**, 593-598.
- Zhu, X. L., Ohta, Y., Jordan, F. & Inouye, M. (1989). Pro-sequence of subtilisin can guide the refolding of denatured subtilisin in an intermolecular process. *Nature* **339**, 483-484.

ABKÜRZUNGSLISTE

A	Adenin	DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
Å	Ångström		
Abb.	Abbildung	DTE	Dithioerythritol
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>	DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure
amp ^r	Gen für β -Lactamase (Ampicillin-Resistenz)	DTT	Dithiothreitol
API-MS	Atmospheric Pressure Ionization Mass Spectrometry	$\epsilon_{410/595}$	spektraler molarer Extinktionskoeffizient bei 410 bzw. 595 nm
APS	Ammoniumpersulfat	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
BDNF	<i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i>	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
bp	Basenpaar	ER	endoplasmatisches Reticulum
BSA	bovines Serumalbumin	ESI-MS	<i>Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i>
C	Cytidin	<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> (und andere)
°C	Grad Celsius	F	Farad
cDNA	codierende DNA	FasL	Fas-Ligand
CTAB	N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid	FKBP12	FK506 <i>Binding Protein</i>
CV	<i>Column Volume</i> (Säulenvolumen)	G	Guanin
Cyp18	Cyclophilin 18	g	Gramm
d	Schichtdicke	GdmCl	Guanidinium-Hydrochlorid
d.h.	das heißt	Gl.	Gleichung
DMSO	Dimethylsulfoxid	GSH	reduziertes Glutathion
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>	GSSG	oxidiertes Glutathion
dsDNA	doppelsträngige DNA	h	Stunde
dNTPs	Desoxyribonukleosid-triphosphate	Hepes	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazinyl]-1-ethansulfonsäure
DRG	<i>Dorsal Root Ganglion</i>	HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie

HIV	<i>Human Immune Deficiency Virus</i>	β -NGF	β -Nerve Growth Factor (β -Nervenwachstumsfaktor)
Hsp	Hitzeschockprotein	NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
IAM	Iodacetamid	NT	Neurotrophin
IB	<i>Inclusion Body</i> (Einschlusskörper)	NTR	Neurotrophin-Rezeptor
IEX	<i>Ion Exchange</i> (Ionenaustausch)	Ω	Ohm
IMAC	Immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie	OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	Ori	<i>Origin of Replication</i> (Replikationsursprung)
JNK	Jun-N-terminale Kinase	ox.	oxidiert
Kap.	Kapitel	p.a.	pro analysi
kb	Kilobasen	PAA	Polyacrylamid
$\lambda_{(\max)}$	(Maximum der) Wellenlänge	PACE	<i>Paired Basic Amino Acid Residue Cleaving Enzyme</i>
l	Liter	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
lacI ^q	Lac-Repressor	PC	<i>Proprotein Convertase</i>
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium	PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
LMW	<i>Low Molecular Weight</i>	PDB	Protein-Datenbank
M	molare Konzentration	PDGF-BB	<i>Platelet Derived Growth Factor BB</i>
m	Meter	PEG 35.000	Polyethylenglykol, mittleres Molekulargewicht 35.000
MALDI-(TOF)-MS	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (Time of Flight) Mass Spectrometry</i>	pH	Potentia Hydrogenii
min	Minute	pI	isoelektrischer Punkt
Mr	relatives Molekulargewicht	PNS	peripheres Nervensystem
mu	murin (Maus-)	PPIase	Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase
MW	<i>Molecular Weight</i> (Molekulargewicht)	(Prä-)Pro-NGF	(Prä-)Pro-Protein des NGF
NF- κ B	nukleärer Faktor κ B		
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotetraacetat		

PVDF	Polyvinylidenfluorid	Tab.	Tabelle
rh	rekombinant, human	TAE-Puffer	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
rbs	Ribosomenbindungsstelle		
red.	reduziert	TCA	<i>Trichloro Acetic Acid</i> (Trichloressigsäure)
RNA	Ribonukleinsäure	TEMED	N,N,N',N'-Tetra-
RNase A	Ribonuklease A		methylethylendiamin
RP-HPLC	<i>Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography</i>	TE-Puffer	Tris/EDTA-Puffer
		TGF- β	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
rpm	Rotationen pro Minute		
RT	Raumtemperatur	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
s	Sekunde	Trk	Tyrosinkinase-Rezeptor
s.	siehe	U	Unit
SDS	Natriumdodecylsulfat	UV	Ultraviolett
SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i>	V	Volt
STET-Puffer	Puffer, der <i>Sodium Chloride</i> (NaCl), <u>T</u> ris, <u>E</u> DTA und <u>T</u> riton X-100 enthält	v/v	Volumenverhältnis
		w/v	Gewicht-Volumenverhältnis
STI	Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor	2 \times YT-Medium	Hefe-Trypton-Medium, doppelt konzentriert
s.u.	siehe unten	z.B.	zum Beispiel
T	Thymin	ZNS	zentrales Nervensystem
t	Zeit		

AMINOSÄUREN

Aminosäure	Abkürzung	Ein-Buchstaben-Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	E
Glutaminsäure	Glu	Q
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Januar 1997 bis Juli 2000 am Institut für Biotechnologie des Fachbereiches Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Prof. Dr. Rainer Rudolph danke ich für die Überlassung des Themas, seine stetige Diskussionsbereitschaft und die Vielzahl an neuen Ideen und Anregungen. Dr. Elisabeth Schwarz danke ich für die enge Betreuung während der gesamten Zeit der Dissertation und ihrem Interesse am Fortgang der Arbeit.

Dr. Hauke Lilie danke ich für unzählige fruchtbare Diskussionen rund um das Thema „Proteinfaltung“ und die Durchführung der analytischen Ultrazentrifugationsläufe.

Ganz herzlich danken möchte ich auch Dr. Gerald Böhm für die Berechnung der NGF-Strukturmodelle.

Dr. Peter Rücknagel von der Max-Planck-Forschungsstelle in Halle danke ich für die Proteinsequenzierung, Dr. Angelika Schierhorn und Marc Kipping für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen. Dr. Peter Bayer von der Max-Planck-Forschungsstelle danke ich für die Anfertigung der NMR-Spektren und zahlreiche Diskussionen.

Prof. Dr. Gunther Fischer und Dr. Jens Rahfeld danke ich für die Überlassung der PPIasen.

Den „Boehrings“, Dr. Ali Grossmann, Dr. Olaf Mundigl und Moni Heidrich, danke ich für die freundliche Aufnahme während meines Aufenthaltes in Penzberg, die nette Sightseeing-Tour durch München und das Leihfahrrad. Außerdem möchte ich mich ganz herzlich für die Durchführung der *Bioassays* bedanken.

Prof. Gennaro Marino, Prof. Piero Pucci, Dr. Margherita Ruoppolo, Dr. Floriana Vinci, Dr. Maria Monti und Angela Flagiello von der Università „Federico II“ in Neapel danke ich für die Gastfreundschaft und die außerordentlich gute Zusammenarbeit während meines Aufenthaltes in Neapel.

Dr. Richard Engh vom Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried danke ich für die Unterstützung bei den Kristallisationsversuchen von rh-Pro-NGF.

Constanze Franz, Anshe Kretzschmar, Maren Oehlmann und Marco Kliemann danke ich für die Unterstützung bei der Renaturierung von rh-Pro-NGF und bei diversen Klonierungen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Laborgenossen Olaf Birkenmeier, Dr. Ulrike Fiedler, Christiane Harnisch, Frank Hillger, Bert Kadereit, Tanja Lisse, Heike Mitternacht, Maren Oehlmann, Carola Reimann, Jörg Schäffner, Till Scheuermann für die tolle Zusammenarbeit während meiner Doktorarbeit und die spannenden nachmittäglichen Kaffee- und Kuchenpausen im Aufenthaltsraum.

Unvergessen werden mir auch die musikalischen Dienstagsproben mit Dr. Peter Neubauer, Ulla Grauschopf, Sabine Meyenburg, Olaf Jeschke, Andreas Werner, Lars Waldmann und Till Scheuermann bleiben. Es sollen hier auch unsere Auftritte bei diversen Weihnachtsfeiern, EU-Projekt-Treffen (Freyburg und Halle), beim „Adel“ in Bad Lauchstädt und bei der Instituts-Einweihung Erwähnung finden.

DANKSAGUNG

Allen Mitarbeitern des Instituts für Biotechnologie danke ich für die nette Arbeitsatmosphäre. Meiner Familie, insbesondere meinem Mann Henning danke ich für die Geduld und das Verständnis für die jahrelange Pendelei am Wochenende.

Persönliche Daten:

Name: Anke Rattenholl, geb. Askenas
Geburtsdatum: 11. Mai 1971
Geburtsort: Bielefeld
Familienstand: verheiratet

Schulbildung:

08/1977 – 07/1981 Grundsule Heeperholz, Bielefeld
07/1981 – 06/1990 Gymnasium Heepen, Bielefeld
06/1990 Allgemeine Hochschulreife

Studium:

10/1990 Aufnahme eines Studiums im Diplom-Studiengang Chemie an der Universität Bielefeld.

Auslandsaufenthalt
01 – 09/1994

Studienaufenthalt an der University of Michigan, Ann Arbor (USA): Forschungspraktika in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Pecoraro (Synthese von Mangankomplexen) und Herrn Prof. Pearson (Totalsynthese eine Alkaloids).

Diplomarbeit
04 – 12/1996

Anfertigung einer Diplomarbeit zum Thema „Reinigung und Immobilisierung der L-Threonin-Dehydrogenase aus *Escherichia coli* und deren Einsatz zur Bestimmung von L-Threonin mit Hilfe der Fließinjektionsanalyse“ bei der Degussa AG, Abt. Biotechnologie unter Leitung von Herrn Prof. Leuchtenberger.

12/1996

Abschluss des Studiums. Beurteilung des Diploms mit der Gesamtnote „sehr gut“.

Promotion:

seit 01/1997

Promotion am Institut für Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Forschungsaufenthalte
05/1999 und 09 – 10/1999

Forschungsaufenthalte in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Marino an der „Università Federico II“, Neapel (Italien). Charakterisierung von (Pro-)NGF-Faltungsintermediaten mithilfe der Massenspektrometrie.

momentane Tätigkeit:

seit 08/2000

Wissenschaftliche Angestellte in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Bruckner-Tuderman an der Hautklinik der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster. Untersuchung der Prozessierung von Prokollagen VII.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe und dass diese Arbeit selbstständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt wurde. Ich versichere weiterhin, dass ich die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Anke Rattenholl
Versmold, 05.11.2000