

# 1 Zusammenfassung

Der Nervenwachstumsfaktor NGF reguliert und stimuliert Wachstum, Differenzierung und Überleben von neuronalen Zellen. NGF wird als Prä-Pro-Protein synthetisiert und posttranslational zu reifem NGF prozessiert. In vielen Geweben wurde neben dem reifen NGF auch nicht prozessiertes Pro-Protein, ProNGF nachgewiesen. Für ProNGF wird eine proapoptische Aktivität postuliert, während für den reifen Wachstumsfaktor eine proliferative Wirkung bekannt ist. Die Struktur des Pro-Peptids und die Art der Wechselwirkung des Pro-Peptids mit dem reifen Teil waren zu Beginn der Arbeit unbekannt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die biophysikalische Charakterisierung des isolierten und des NGF-gekoppelten Pro-Peptids sowie die Untersuchung des Einflusses des Pro-Peptids auf den reifen Teil. Weiterhin sollten strukturelle Eigenschaften bzw. die Strukturbildung des Pro-Peptids in Abhängigkeit von der Anwesenheit des reifen Teils analysiert werden.

In diesem Zusammenhang sollte (I) mit ProNGF die so genannte "*loop-threading*"-Hypothese überprüft werden, die die langsame Entfaltung von NGF mit einem Zurückfädeln des N-Terminus durch den Cystin-Knoten erklärt. (II) Ein Vergleich der Struktur und Stabilität von NGF-gekoppelten und isolierten Pro-Peptid sollte zeigen, welchen Einfluss der native Teil auf das Pro-Peptid besitzt. Die Analyse der Wechselwirkung zwischen NGF und Pro-Peptid sollte zur Identifizierung des Interaktionsbereiches führen. (III) Im Rahmen einer Kooperation sollte der Einfluss des Pro-Peptids auf die Rezeptorbindung untersucht werden.

(zu I) Die Untersuchung der Denaturierung von NGF und ProNGF zeigte in beiden Fällen die Population eines Entfaltungsintermediats, welches nur sehr langsam zum völlig entfalteten Zustand denaturierte. Im Falle von NGF wurde in der "*loop-threading*"-Hypothes postuliert, dass der N-Terminus durch die Ringstruktur des Cystin-Knotens hindurchfädelt (De Young et al., 1996). NGF und ProNGF zeigen eine vergleichbare Geschwindigkeit der Entfaltung, allerdings eine Unabhängigkeit der Länge des N-Terminus und wiesen damit auf eine andere molekulare Ursache hin. Ein Vergleich des Intermediatzustands und völlig denaturierten Zustands zeigte deutlich die Gegenwart von Reststrukturen im Intermediatzustand, deren Auflösung für die beobachtete langsame Entfaltung verantwortlich gemacht wurde. Es wurden Hinweise erhalten, dass diese Reststrukturen in räumlicher Nähe des Cystin-Knotens liegen.

(zu II) Spektroskopische Vergleiche von NGF-gekoppelten und isolierten Pro-Peptid wiesen auf einen geringen, gleichgroßen Anteil an definierter Sekundärstruktur in beiden Pro-

Peptiden hin. Im Gegensatz dazu konnte nur im kovalent verknüpftem Pro-Peptid eine definierte Tertiärstruktur nachgewiesen werden, welche durch Wechselwirkung mit dem reifen Teil entsteht, wohingegen das isolierte Pro-Peptid keine kooperativ stabilisierte Tertiärstruktur ausbildet. Während der Denaturierung und Renaturierung des NGF-gekoppelten Pro-Peptids konnte ein Faltungsintermediat sowohl thermodynamisch als auch kinetisch identifiziert und charakterisiert werden. Dieses Faltungsintermediat repräsentiert einen Zustand ohne native Sekundärstrukturen, aber mit definierten Tertiärstrukturen, welche eine Assoziation des Pro-Peptids mit dem nativen NGF über einen hydrophoben Bereich darstellt.

Untersuchungen der Wechselwirkungsregion zwischen NGF und Pro-Peptid erlaubten die Identifizierung der Aminosäuresequenz Gln<sup>-84</sup>-Ala<sup>-63</sup> innerhalb des Pro-Peptids als die Region, welche mit dem reifen Teil des ProNGF interagiert. Umgekehrt konnte der Tryptophanrest-21 (Trp<sup>21</sup>) im reifen Teil ermittelt werden, welcher sehr wahrscheinlich an der Wechselwirkung mit dem Pro-Peptid beteiligt ist. Eine Beteiligung der Region um Trp<sup>21</sup> im NGF bei der Assoziation an die Rezeptoren TrkA und p75NTR könnte die reduzierte Affinität von ProNGF zu diesen Rezeptoren erklären.

(zu III) Weiterhin konnte auch zur Identifizierung eines weiteren Rezeptors, Sortilin beigetragen werden, welcher spezifisch sowohl ProNGF als auch das isolierte Pro-Peptid bindet. Somit interagiert das NGF-Pro-Peptid nicht nur als intramolekulares Chaperon während der Faltung mit der NGF-Domäne, sondern es kann dem Wachstumsfaktor in der Pro-Form auch eine veränderte biologische Funktion verleihen.