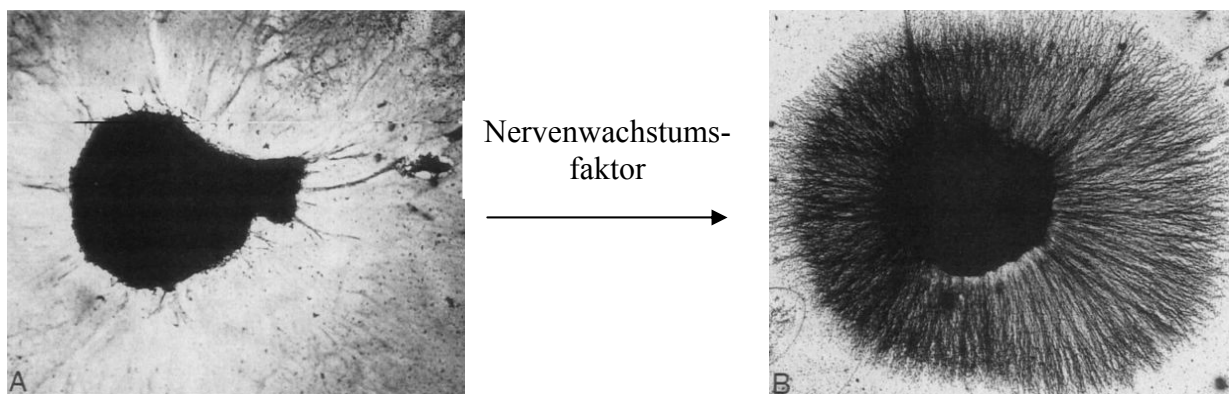


## 2 Einleitung & Hintergrund

### 2.1 Geschichte und Einordnung des Nervenwachstumsfaktors NGF

Eine auf Nervenzellen wachstumsstimulierende Wirkung einer biologischen Substanz, welche aus Mäusesarkomzellen isoliert worden war, wurde erstmals im Jahr 1952 beschrieben (Levi-Montalcini, 1987). Nach Zugabe dieser Substanz zu sympathischen und sensorischen Ganglienzellen aus Hühnerembryonen konnte *in vitro* und *in vivo* ein Neuritenwachstum beobachtet werden (Abb. 1.1) (Levi-Montalcini, 1987). Die biologische Substanz wurde später als *beta-nerve growth factor* (Nervenwachstumsfaktor, NGF) identifiziert. Immunohistochemische Untersuchungen zeigten, dass NGF in einer Vielzahl von Geweben vorkommt. In niedrigen Konzentrationen konnte NGF sowohl in der Plazenta, der Retina und in Haarfollikeln nachgewiesen werden (Chakrabarti et al., 1990; Delsite & Djakiew, 1999; Yardley et al., 2000). Hohe Konzentrationen an NGF wurden beispielsweise in einigen Schlangengiften und den submaxillaren Drüsen männlicher Mäuse gefunden, welche als Ausgangsmaterial zur Isolierung benutzt wurden (Cohen, 1960).



**Abb. 1.1:** Neuritenwachstum einer Ganglienzelle nach NGF-Stimulation (veröffentlicht unter <http://starklab.slu.edu/neuro/Cumulative.htm>).

Anhand der Sequenzhomologie bzw. der biologischen Aktivität konnten neben NGF fünf weitere Proteine identifiziert werden, welche eine wichtige Rolle während der neuronalen Entwicklung spielen: Der *brain derived neurotrophic factor* (BDNF), Neurotrophin-3 (NT-3), NT-4/5, NT-6 sowie NT-7 gehören deshalb neben NGF zur Familie der Neurotrophine (Leibrock et al., 1989; Ernfors et al., 1990; Hohn et al., 1990; Maisonpierre et al., 1990; Rosenthal et al., 1990; Ip et al., 1992). Als Neurotrophine werden die Proteine bezeichnet, die Wachstum, Differenzierung und Überleben bestimmter Nervenzellen vermitteln. Alle Mitglieder der Neurotrophine weisen untereinander eine über 50 %ige Sequenzidentität auf (Barde, 1990; Bradshaw et al., 1993).

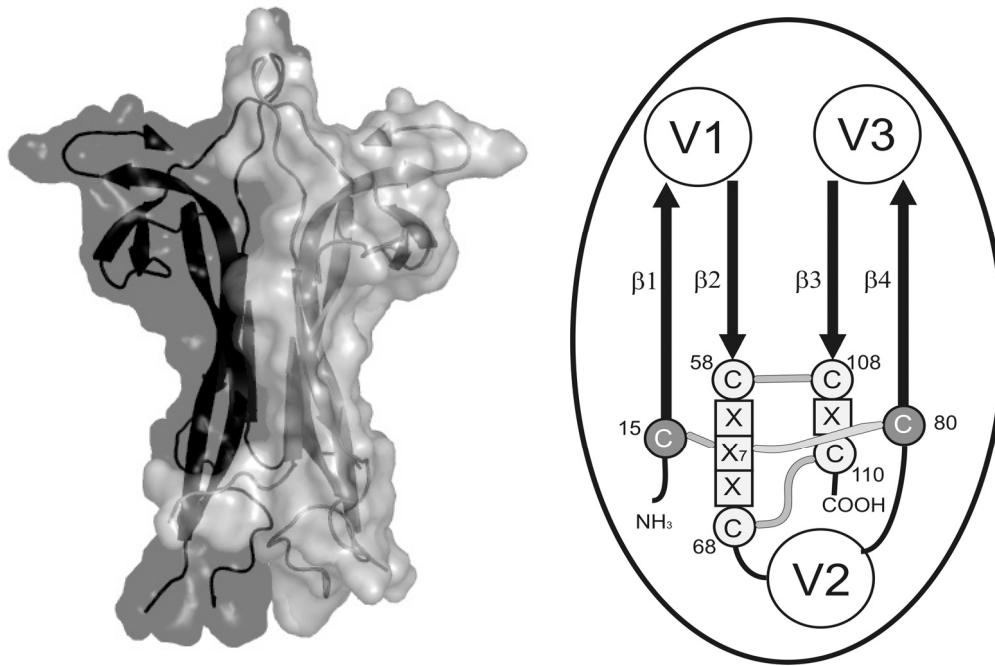
Die Expression von NGF ist gewebespezifisch und abhängig vom postnatalen Entwicklungsstand (Large et al., 1986; Whittimore et al., 1986). Neben der wachstumsstimulierenden Wirkung von NGF konnte auch ein entgegengesetzter Effekt, die Induktion des programmierten Zelltods (Apoptose) nachgewiesen werden (Casaccia-Bonofil et al., 1996; Frade et al., 1996).

## 2.2 Struktur des Nervenwachstumsfaktors

Reifer NGF, welcher aus den Submaxillardrüsen von Mäusen (m-NGF) isoliert wurde, besteht aus 118 Aminosäuren. Die Primärsequenz von m-NGF ist nahezu identisch zu der von humanem NGF: Beide unterscheiden sich in lediglich 12 der 118 Aminosäurereste (Ullrich et al., 1983).

In der Aminosäuresequenz befinden sich sechs Cysteinreste, die durch drei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Angeletti & Bradshaw, 1971). Diese sechs hoch konservierten Cysteinreste konnten bei allen Neurotrophinen nachgewiesen werden. Die drei Disulfidbrücken sind an der Bildung eines komplexen topologischen Strukturelements beteiligt; dem Cystin-Knoten. Im humanen NGF bilden die Disulfidbindungen Cys<sup>58</sup>-Cys<sup>108</sup> sowie Cys<sup>60</sup>-Cys<sup>110</sup> mit der Proteinhauptkette einen Ring aus insgesamt 14 Aminosäureresten. Die dritte Disulfidbrücke Cys<sup>15</sup>-Cys<sup>80</sup> ist so angeordnet, dass sie durch diesen Ring reicht (Abb. 1.2). Neben den Neurotrophinen befindet sich dieses charakteristische Strukturelement auch bei den Wachstumsfaktoren der TGF- $\beta$ -Superfamilie, wie PDGF (*platelet derived growth factor*) sowie bei einigen sehr kleinen Proteinen, wie den  $\omega$ -Conotoxinen und bestimmten Protease-Inhibitoren (Daopin et al., 1992; Oefner et al., 1992; Schlunegger & Grutter, 1992; McDonald & Hendrickson, 1993; Pallaghy et al., 1994; Price-Carter et al., 1996a; Wentzel et al., 1999).

Weiterhin ist auch die strukturelle Anordnung des nicht-kovalent assoziierten Homodimers allen Neurotrophinen gemeinsam (Abb. 1.2) (Bothwell & Shooter, 1977; Radziejewski et al., 1992; Narhi et al., 1993). Die beiden NGF-Monomere sind über starke hydrophobe Wechselwirkungen verbunden. Bei neutralem pH-Wert liegt die Dissoziationskonstante bei  $\leq 10^{-13}$  M (Bothwell & Shooter, 1977).



**Abb. 1.2: Strukturmodell des murinen NGF-Dimers und schematische Darstellung eines NGF-Monomers.** Das Strukturmodell wurde anhand der Kristallstrukturdaten berechnet (McDonald et al., 1991; pdb-Eintrag "1BET") und mit Hilfe "Pymol" dargestellt. Die schematische Darstellung (McDonald & Hendrickson, 1993) wurde modifiziert und zeigt die vier  $\beta$ -Faltblätter, drei variable loop-Regionen und den Cystin-Knoten, der aus den sechs Cystinen gebildet wird.

### 2.3 Biologie des NGF

NGF aus den submaxillaren Drüsen der Maus liegt mit weiteren Proteinen in einem hochmolekularen 7 S-Komplex von  $\sim 140$  kDa vor (Varon et al., 1967). NGF ist mit  $\alpha$ -NGF und  $\gamma$ -NGF im stöchiometrischen Verhältnis von  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$  assoziiert (Silverman & Bradshaw, 1982). Nähere Untersuchungen haben gezeigt, dass es sich bei den  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten um Serin-Proteasen der Kallikrein-Familie handelt (Varon et al., 1968; Mason et al., 1983). Die  $\alpha$ -Untereinheit liegt als degenerierte Serinprotease vor und besitzt im Gegensatz zur  $\gamma$ -Untereinheit keine proteolytische Aktivität. Daher ist die  $\alpha$ -Untereinheit nicht für die Prozessierung von NGF nötig (Greene et al., 1969; Isackson & Bradshaw, 1984). Die  $\gamma$ -Untereinheit ist *in vivo* an der N- und C-terminalen Prozessierung des NGF-Vorläuferproteins beteiligt, worauf später noch im Detail eingegangen wird (Edwards et al., 1988). Es wird diskutiert, ob der Komplex, der bisher nur bei Mäusen nachgewiesen werden konnte, eine physiologische Bedeutung als Schutz vor Degradation besitzt (Moore, Jr. et al., 1974; Mobley et al., 1976). Der 7 S-Komplex besitzt keine neurotrophe Aktivität (Bax et al., 1997). Eine ähnliche Komplexbildung zwischen Wachstumshormon und beteiligter Protease konnte auch beim *epidermal growth factor* (EGF) nachgewiesen werden (Taylor et al., 1970). Die Expression der NGF- $\alpha$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten ist in der Maus gewebespezifisch. So konnten diese Unter-

einheiten in Fibroblasten- und Iriszellen, welche ebenso NGF exprimieren, nicht nachgewiesen werden (Pantazis, 1983).

NGF wird *in vivo* als Prä-Pro-Protein exprimiert (Berger & Shooter, 1977; Ullrich et al., 1983). Es konnten zwei unterschiedlich lange Pro-Sequenzen identifiziert werden, die *splice*-Varianten darstellen (Edwards et al., 1986; Selby et al., 1987). Die kürzere der beiden Isoformen mit einem Molekulargewicht von 27,5 kDa besitzt am N-Terminus ein 18 Aminosäurereste umfassendes Signalpeptid. Im Anschluss an die Signalsequenz folgen das Pro-Peptid mit einer Länge von 102 Aminosäuren sowie der reife Teil des Proteins. Zwei Aminosäuren am C-Terminus des reifen Teils stellen ebenfalls einen Teil der Pro-Sequenz dar. Die längere der beiden Isoformen mit einem Molekulargewicht von 34 kDa besitzt weitere 67 Aminosäurereste, die N-terminal vor der Signalsequenz der bereits erwähnten kurzen Isoform angeordnet sind. Die Expression der beiden Isoformen ist gewebespezifisch. Beobachtungen von Selby et al. deuten darauf hin, dass die kürzere Form das dominierende Translationsprodukt in den meisten Geweben darstellt (Selby et al., 1987). Dabei ist die biologische Bedeutung der Isoformen unbekannt, da aus beiden Formen biologisch aktiver NGF prozessiert werden kann. In der hier vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich mit der kürzeren Isoform gearbeitet.

Die Abspaltung der Signalsequenz erfolgt nach Translokation des Proteins in das Endoplasmatische Retikulum (ER). Hier erfolgen unter oxidativen Bedingungen die Ausbildung der Disulfidbrücken und die Faltung des Proteins. ProNGF besitzt drei potenzielle Glykosylierungsstellen, davon zwei innerhalb des Pro-Peptids und eine im reifen NGF (Ullrich et al., 1983). Die Glykosylierung des reifen Teils wird bis auf wenige Ausnahmen nicht beobachtet. Dahingegen scheint die Glykosylierung an Asn<sup>8</sup> (im Pro-Peptid) sowohl für eine höhere Faltungseffizienz als auch für einen verbesserten Austritt aus dem ER von Bedeutung zu sein (Seidah et al., 1996). Eine Monoglykosylierung an der zweiten potenziellen Glykosylierungsstelle im Pro-Peptid wird seltener beobachtet (Murphy et al., 1989). ProNGF mit doppelt glykosyliertem Pro-Peptid konnte ebenso nachgewiesen werden wie eine unglykosylierte Form, die in vielen Geweben am häufigsten verbreitet ist (Edwards et al., 1988; Reinshagen et al., 2000; Chen et al., 1997; Fahnstock et al., 2001).

Die N- und C-terminalen Prozessierungen von ProNGF erfolgen im *trans-Golgi network* durch Furin beziehungsweise durch die weniger weit verbreiteten Prohormon-Convertasen (PC) PACE4 und PC5/6-B (Bresnahan et al., 1990; Seidah et al., 1996; Farhadi et al., 1997). Während der Prozessierung erfolgt die Abspaltung des N-terminalen Pro-Peptids sowie der beiden C-terminalen Aminosäuren. Neben verschiedenen Spaltprodukten des Pro-Peptids

konnte aber auch unprozessierter ProNGF als Sekretionsprodukt von Spermien- und Haarfollikelzellen nachgewiesen werden (Darling et al., 1983; Chen et al., 1997; Yardley et al., 2000). Spaltprodukte des Pro-Peptids mit Affinität zum NGF-Rezeptor TrkA konnten im Darmgewebe identifiziert werden (Dicou et al., 1997). Die korrekte Abspaltung der Pro-Sequenz scheint dabei essentiell für die konstitutive Sekretion zu sein, unprozessierter ProNGF wird hingegen regulatorisch sezerniert (Mowla et al., 1999). Bei einer Vielzahl von Geweben, wie Prostata, Spermien oder Haarfollikeln konnte inzwischen gezeigt werden, dass ProNGF und nicht NGF das Hauptsekretionsprodukt ist (Chen et al., 1997; Yardley et al., 2000). In vielen neuronalen, aber auch in anderen Geweben erfolgt die Sekretion in Abhängigkeit des Entwicklungsstadiums als Gemisch aus NGF und ProNGF (Hasan et al., 2003; Lobos et al., 2005). So wurde beispielsweise bei Alzheimer-Patienten eine Akkumulation von ProNGF im Gehirn nachgewiesen (Fahnestock et al., 2001). Aus diesen Beobachtungen lässt sich schließen, dass ProNGF nicht nur die Vorläuferform von NGF darstellt, sondern auch eigene biologische Funktionen erfüllt (Fahnestock et al., 2001).

## 2.4 Rezeptoren und Signalwege von Neurotrophinen

NGF und die anderen Mitglieder der Neurotrophinfamilie vermitteln ihre biologische Aktivität durch Bindung an zwei Klassen von Transmembranrezeptoren, den Tyrosin-Kinase-Rezeptoren (Trk), von denen bisher drei bekannt sind, und p75NTR, ein Mitglied der Tumornekrose-Faktor-Rezeptor-Familie. NGF aktiviert den Rezeptor TrkA (Klein et al., 1991a), BDNF und NT-4/5 binden an TrkB (Klein et al., 1991b; Ip et al., 1992), und NT-3 bindet TrkC mit hoher Affinität, interagiert aber auch mit TrkA und TrkB (Lamballe et al., 1991; Barbacid, 1995; Belliveau et al., 1997). Eine Bindung von NT-7 an TrkA konnte zwar nachgewiesen werden, die Affinität war aber deutlich geringer als die von NGF (Nilsson et al., 1998). Im Gegensatz zur spezifischen Aktivierung der Trk-Rezeptoren binden alle Neurotrophine mit ähnlicher Affinität an p75NTR (Philo et al., 1994; Friedman, 2000).

Beide Rezeptorklassen induzieren unabhängig von einander unterschiedliche Signalkaskaden (Miller & Kaplan, 2001). Die Aktivierung des TrkA-Rezeptors durch NGF bewirkt Wachstum, Differenzierung und Proliferation der Neuronen. Die Liganden-Rezeptorbindung induziert die Dimerisierung des Rezeptors und führt zur *trans*-Autophosphorylierung der Tyrosinreste der intrazellulären Rezeptordomänen. Nach Bindung intrazellulärer Signalmoleküle an die phosphorylierten Tyrosinresten der intrazellulären Domäne erfolgt die Aktivierung von zwei Signalwegen (Kaplan & Miller, 1997): Zum einen die Aktivierung von

PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase) und Akt (Protein Kinase B) und zum anderen die Aktivierung des kleinen G-Proteins Ras, welches das Signal auf MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) überträgt. Die Aktivierung beider Signalkaskaden führt zur Induktion verschiedener Transkriptionsfaktoren, die Einflüsse auf den Zellzyklus, das Neuritenwachstum und die synaptische Plastizität von Neuronen ausüben (Grewal et al., 1999; Kaplan & Miller, 2000; Lonze & Ginty, 2002; Chao, 2003).

Der durch p75NTR induzierte Signalweg kann zum programmierten Zelltod, der Apoptose der Nervenzellen führen (Casaccia-Bonnel et al., 1996; Frade et al., 1996; Hempstead, 2002). Im Gegensatz zu den Trk-Rezeptoren ist p75NTR keine Tyrosinkinase. Binden Neurotrophine an der extrazellulären Domäne von p75NTR, erfolgt über die intrazelluläre Domäne die Aktivierung von NRIF (*neurotrophin receptor interacting factor*), von JNK (Jun N-terminaler Kinase), NK- $\kappa$ B, p53 und Ceramid (Aloyz et al., 1998; Bamji et al., 1998; Leniculescu et al., 1999; Casademunt et al., 1999; Kaplan & Miller, 2000; ; Brann et al., 2002; Roux & Barker, 2002; Chao, 2003; Linggi et al., 2005). Die gleichzeitige Aktivierung der TrkA- und p75NTR-vermittelten Signalkaskaden durch NGF unterdrückt die Induktion der Apoptose (Majdan et al., 2001). Neben der Apoptoseinduktion vermittelt p75NTR weitere biologische Funktionen, die über andere Signalkaskaden reguliert werden. So steuert p75NTR beispielsweise das Wachstum von Axonen, die Migration von Schwann'schen Zellen sowie die Myelinbildung (Yamashita et al., 2005).

TrkA wird vom reifen NGF mit einer Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) von  $\sim 10^{-11}$  M gebunden und daher auch oft als hoch affiner Rezeptor bezeichnet. Demgegenüber ist die Bindung an p75NTR, der als niedrig affiner Rezeptor bezeichnet wird, deutlich schwächer ( $K_D = \sim 10^{-9}$  M) (Kaplan & Miller, 2000; Fahnstock et al., 2004a). Dabei ist die Affinität zu den Rezeptoren abhängig, ob NGF mit jeweils einem oder beiden Rezeptoren interagiert. Sind beide Rezeptoren an der Bindung beteiligt, beeinflusst dies die Zellantwort auf das assoziierte Neurotrophin (Dechant, 2001). Die Bindung von NGF an TrkA und p75NTR führt zu einer Konformationsänderung von TrkA und der Ausbildung einer hoch affinen Bindestelle. Dies führt zu einer Verstärkung der TrkA-Signalkaskade (Hempstead et al., 1991; Chao & Hempstead, 1995; Ryden et al., 1997; Esposito et al., 2001) und einer Inhibierung der Apoptose induzierenden Signalkaskade über p75NTR (Yoon et al., 1998). Dadurch konnte bei der gleichzeitigen Bindung von NGF an TrkA und p75NTR ein höheres Neuritenwachstum beobachtet werden als bei der alleinigen Bindung an TrkA (Davey & Davies, 1998; Bibel et al., 1999). Wahrscheinlich besitzt TrkA nur in Verbindung mit p75NTR die oben genannten hoch affinen Bindungseigenschaften (Mahadeo et al., 1994). Daher ist die ursprüngliche

Einteilung der Rezeptoren in hoch und nieder affine Rezeptoren nicht korrekt und wird in neuerer Literatur wenig verwendet.

Die Wechselwirkung zwischen NGF und TrkA erfolgt über den N-Terminus von NGF (Aminosäure 2 bis 13) sowie Abschnitte des  $\beta$ -Faltblatts des NGF, wie anhand von Deletionsmutanten und der Kristallstruktur gezeigt werden konnte (Kahle et al., 1992; Ibanez et al., 1993; Woo et al., 1995; Woo & Neet, 1996; Kullander et al., 1997; Wiesmann et al., 1999; O'Connell et al., 2000). Diese Erkenntnis unterstützt die Hypothese, dass ProNGF mit dem Pro-Peptid als N-terminaler Domäne die Bindung an TrkA einschränkt. So wurde mit Hilfe einer spaltresistenten Mutante von ProNGF eine erhöhte Affinität zu p75NTR ( $K_d = \sim 10^{-10}$  M) nachgewiesen. Hingegen besitzt diese Mutante eine gegenüber NGF verminderte Affinität zu TrkA (Lee et al., 2001). Dies korreliert mit früheren Ergebnissen, die eine weniger starke Bindung von ProNGF als von NGF an TrkA zeigten (Edwards et al., 1988). Im Gegensatz dazu beobachtete die Arbeitsgruppe von Fahnstock mit Hilfe einer Spaltmutante von ProNGF, in der die dibasische Spaltstelle gegen zwei Alaninreste ausgetauscht war, eine ähnlich hohe Affinität von ProNGF wie von NGF zu TrkA (Fahnstock et al., 2004b).

Die Bereiche im NGF, welche eine Assoziation mit p75NTR vermitteln, konnten ebenfalls durch Mutationssysteme und Strukturmodellen identifiziert werden (Ibanez et al., 1992; Urfer et al., 1994). Anhand der Kristallstruktur wurde die Wechselwirkung zwischen NGF und p75NTR detailliert aufgeklärt. Ein NGF-Homodimer interagiert mit einem p75NTR-Rezeptormolekül. Es wird postuliert, dass die Bindung eine Konformationsänderung im NGF bewirkt und dadurch die Bindung eines weiteren p75NTR-Moleküls inhibiert wird (He & Garcia, 2004). Diese Daten wurden allerdings mit Hilfe von unglykosyliertem p75NTR-Rezeptor gewonnen. Mittels analytischer Ultrazentrifugation, Massenspektrometrie und Röntgenkleinwinkelstreuung konnte dagegen gezeigt werden, dass die Glykosylierung des Rezeptors eine wichtige Rolle bei der Assoziation spielt: Zwei glykosylierte p75NTR-Rezeptormoleküle assoziieren mit einem NGF-Homodimer (Aurikko et al., 2005).

Mit Sortilin (Petersen et al., 1997) konnte ein weiterer Rezeptor identifiziert werden, der an der Signaltransduktion von NGF bzw. ProNGF beteiligt ist. Dabei wurde für ProNGF ( $K_D = 5$  nM) eine höhere Affinität zu Sortilin nachgewiesen als für NGF ( $K_D = 87$  nM). Bei weiteren Versuchen konnte eine vergleichbar hohe Affinität wie für ProNGF auch für das isoliertes NGF-Pro-Peptid ( $K_D = 8$  nM) beobachtet werden. Daraus wurde geschlossen, dass das Pro-Peptid die Assoziation mit Sortilin vermittelt. *cross-linking*-Experimente deuteten auf einen

Komplex aus p75<sup>NTR</sup> und Sortilin, welcher für die Induktion von Apoptose durch ProNGF verantwortlich ist (Abb. 1.3) (Nykjaer et al., 2004).

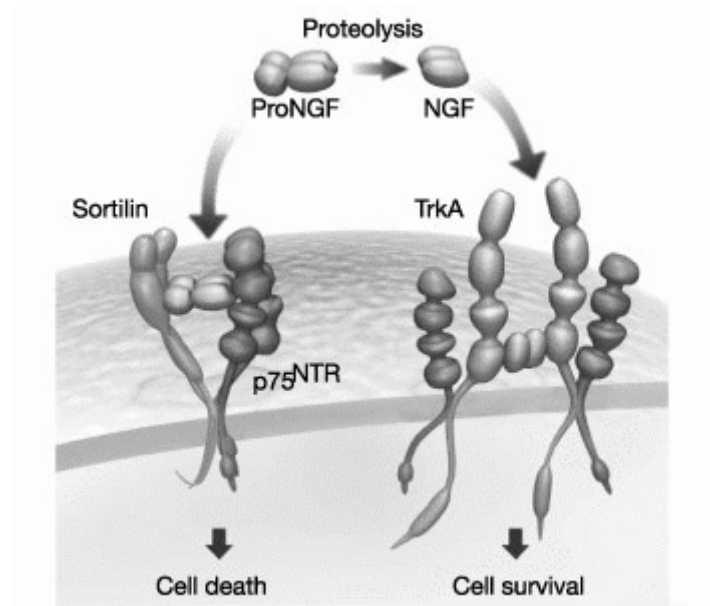


Abb. 1.3: Modell der NGF- und ProNGF-Bindung an die jeweiligen Rezeptoren (Nykjaer et al., 2004).

Ähnliche Beobachtungen wurden jüngst mit BDNF gemacht. So wurde die Induktion von Apoptose durch Interaktion von proBDNF mit den Rezeptoren p75<sup>NTR</sup> und Sortilin, nicht aber mit TrkB, welcher für das Nervenzellwachstum verantwortlich ist, beobachtet (Teng et al., 2005). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurde von einer anderen Forschungsgruppe die Bindung von proBDNF an TrkB mit hoher Affinität sowie die Stimulation des Neuritenwachstum beobachtet (Fayard et al., 2005). Ob ProNGF bzw. die Pro-Formen der Neurotrophine eher neurotroph oder apoptotisch wirken, bleibt kontrovers (Fahnestock et al., 2004a).

## 2.5 Pro-Proteine und Pro-Peptide

Proteine sind sich selbst organisierende Moleküle, deren dreidimensionale Struktur durch ihre Primärsequenz bestimmt wird (Anfinsen, 1973). Eine Vielzahl von Proteinen faltet jedoch nicht spontan zur nativen Struktur. Bei verschiedenen Faltungsprozessen konnte *in vivo* die Beteiligung zusätzlicher Proteine nachgewiesen werden, die für eine korrekte und effiziente Faltung notwendig sind. So erhöhen beispielsweise Disulfidisomerasen, Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen) oder molekulare Chaperons die Faltungsausbeute *in vivo* und *in vitro* (Creighton, 1991; Fischer et al., 1998; Freedman et al., 1994).



Viele Proteine werden wie NGF als Prä-Pro-Proteine translatiert. Pro-Peptide können sich sowohl am N- bzw. C-Terminus wie auch innerhalb des Proteins zwischen zwei Domänen befinden. In der Regel erlangt nach Abspaltung des Pro-Peptids das prozessierte, reife Protein seine biologische Aktivität. Werden diese Proteine ohne ihre Pro-Sequenz translatiert, nehmen sie oft inaktive, falsch gefaltete Konformationen an (Bryan, 2002). Bekannte Beispiele sind verschiedene Proteasen, wie Subtilisin E,  $\alpha$ -lytische Protease oder Carboxypeptidase Y aber auch *bovine pancreatic trypsin inhibitor* (BPTI) und *guanylyl cyclase activating peptide* (GCAP). Bei diesen Proteinen konnten entsprechende Faltungsdefizite in Abwesenheit des Pro-Peptids nachgewiesen werden (Ikemura et al., 1987; Silen & Agard, 1989; Winther & Sorensen, 1991; Weissman & Kim, 1992; Shinde et al., 1993; Sorenson et al., 1993; Hidaka et al., 1998). Die Pro-Sequenzen fungieren während der Strukturbildung durch das Absenken der Aktivierungsenergie des Übergangszustands bei der Faltungsreaktion als Katalysatoren (Eder et al., 1993). Aufgrund dieser Eigenschaft werden die Pro-Peptide auch als "Intramolekulare Chaperone" (IMC) bezeichnet (Inouye, 1991). Die strukturbildende Funktion vermitteln diese Pro-Sequenzen manchmal auch in *trans*, so dass eine kovalente Verbindung zwischen dem Protein und Pro-Peptid nicht Voraussetzung für die Aktivität ist. Als Faltungshelfer besitzen die Pro-Sequenzen meist eine sehr hohe Substratspezifität (Silen & Agard, 1989; Winther et al., 1994). Neben der faltungsstimulierenden Wirkung besitzen die Pro-Sequenzen der Proteasen auch eine regulatorische Funktion und stellen hoch-affine Inhibitoren der jeweiligen Proteasen dar (Ohta et al., 1991; Baker et al., 1992; Fox et al., 1992).

In Proinsulin liegt das Pro-Peptid, das C-Peptid, zwischen der A- und B-Kette des reifen Insulins. Während der Faltung bewirkt das C-Peptid, dass sich die beiden Polypeptidketten in räumlicher Nähe befinden damit die interchenaren Disulfidbindungen ausgebildet werden können. Anschließend wird die Pro-Sequenz durch Proteolyse prozessiert und das reife Protein sezerniert (Steiner & Clark, 1968).

Hingegen ist im *bovine pancreatic trypsin inhibitor* (BPTI) ein freier Cysteinrest im Pro-Peptid an der Ausbildung einer temporären Disulfidbrücke beteiligt und begünstigt dadurch die Ausbildung der nativen Disulfidbrücken im reifen Teil (Weissman & Kim, 1992).

Neben NGF werden auch andere Cystin-Knoten-Proteine als Prä-Pro-Proteine synthetisiert. Pro-Sequenzen müssen dabei nicht immer direkt die Faltung katalysieren. Beim Von-Willebrand-Faktor vermitteln die Pro-Sequenzen die Assemblierung der einzelnen Monomere und begünstigen die Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrücken (Wise et al., 1988; Voorberg et al., 1990).

Andere Pro-Peptide vermitteln nicht direkt die Proteinfaltung, stimulieren und aktivieren aber durch Interaktion mit faltungshelfenden Proteinen die Biogenese des Proteins. So bindet das Pro-Peptid des  $\alpha$ -Conotoxins an eine Protein Disulfidisomerase (PDI) und stimuliert dadurch die Faltung (Buczek et al., 2004).

Für TGF- $\beta$ 1 konnte gezeigt werden, dass aktives Protein nur dann sezerniert wird, wenn die Pro-Sequenz kovalent gebunden beziehungsweise *in trans* coexprimiert wird (Gray & Mason, 1990). Da das TGF- $\beta$ 1-Pro-Peptid selbst ein über eine Disulfidbrücke verknüpftes Dimer ist, lässt es sich nicht mit dem isolierten NGF-Pro-Peptid vergleichen, welches als Monomer vorliegt (Gentry & Nash, 1990; Rattenholl, 2001; Kliemannel et al., 2004). Ein weiterer Vertreter aus der TGF- $\beta$ -Superfamilie ist *macrophage inhibitory cytokine* (MIC-1). Das Pro-Peptid fungiert hier als Marker für die Faltung. Bei korrekt gefaltetem Protein wird das Cytokin von seinem Pro-Peptid abgespalten und sekretiert. Falsch gefaltetes Protein wird hingegen vom Pro-Peptid erkannt und das gesamte Molekül für den späteren Abbau durch den Ubiquitin-Proteasom-Komplexes markiert (Bauskin et al., 2000; Fairlie et al., 2001).

Für das N-terminale Pro-Peptid des NGF konnte die faltungsstimulierende Wirkung *in vitro* nachgewiesen werden. Für ProNGF konnte eine Renaturierungsausbeute von ca. 35 % erreicht werden, mit reifem NGF dagegen nur eine Ausbeute von ca. 1 % (Rattenholl et al., 2001a). Eine Analyse der oxidativen Strukturbildung von ProNGF ermöglichte dabei die Identifizierung unterschiedlich disulfidverbrückter Faltungsintermediate (Rattenholl et al., 2001b). Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Proteasen und TGF- $\beta$ 1 konnte eine faltungsstimulierende Wirkung des Pro-Peptids *in trans* nicht nachgewiesen werden, so dass die kovalente Verknüpfung zwischen Pro-Peptid und NGF zumindest *in vitro* für die Renaturierung essentiell ist. Durch welche molekularen Mechanismen das Pro-Peptid die Faltung des reifen Teils vermittelt ist derzeit unbekannt. Es wird angenommen, dass das Pro-Peptid als eine Art Gerüst fungiert, welches die Faltung des reifen Teils unterstützt (Rattenholl et al., 2001a; Rattenholl et al., 2001b; Rattenholl, 2001).

Die beiden Aminosäuren Arg<sup>119</sup> und Ala<sup>120</sup> bilden die C-terminale Pro-Sequenz des humanen NGF. Dabei ist die Funktion und Bedeutung dieser beiden Aminosäuren völlig unbekannt. Ein Einfluss des C-terminalen Pro-Peptids auf Stabilität, Struktur oder die Faltungseffizienz konnte nicht beobachtet werden (Kliemannel, 2001). Dass auch einzelne Aminosäuren Auswirkungen auf die Effizienz der Proteinfaltung haben können, konnte anhand des  $\omega$ -Conotoxin aus Meeresschnecken gezeigt werden. Hier wird das C-terminale Glycin posttranslational in eine Amid-Gruppe umgewandelt. Eine Deletionsmutante, welche

kein C-terminales Glycin besaß, zeigte *in vitro* eine deutlich reduzierte Faltungsausbeute (Price-Carter et al., 1996b).

Allerdings ist nur wenig über die Strukturen und proteinchemischen Eigenschaften der verschiedenen Pro-Peptide bekannt. Bei der Protease Subtilisin wurde nachgewiesen, dass das Pro-Peptid in der isolierten Form im Gegensatz zum kovalent verknüpften pro-Subtilisin wenig bzw. keine Struktur besitzt (Ruvinov et al., 1997). Ähnliche Beobachtungen wurden auch für das Pro-Peptid der Carboxypeptidase Y gemacht. So wurde unter nativen Bedingungen nur partiell strukturiertes Pro-Peptid beobachtet. Strukturelle Analysen ergaben eine definierte Sekundärstruktur, aber nur sehr geringe Anteile an Tertiärkontakten. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für das Pro-Peptid ein "*molten globule state*" postuliert (Sorenson et al., 1993). Neben diesen Erkenntnissen liegen über die Strukturen von Pro-Peptiden und Pro-Proteinen nur wenige Daten auf atomarer Ebene vor. Eine Aufklärung der Struktur mittels Röntgenstrukturanalyse gelang bisher nur bei Vertretern der Serin- und Cystein-Proteasen, wie Procathepsin und Prosubtilisin (Gallagher et al., 1995; Podobnik et al., 1997; Jain et al., 1998; LaLonde et al., 1999).

## 2.6 Biotechnologie & Herstellung von NGF und ProNGF

Durch die mitotische und apoptische Aktivität von NGF und ProNGF sind beide Proteine für einen therapeutischen Einsatz von hohem Interesse. Potenzielle Einsatzgebiete sind primäre Neuropathien wie die Alzheimer'sche Krankheit (AD) oder Parkinson'sche Krankheit (PD) und sekundäre Neuropathien, die bei Diabetes oder nach Chemotherapien auftreten (Tuszynski et al., 2005). Es wurde beispielsweise im Tiermodell eine Reduktion sensorischer Neuropathien nach Verabreichung von NGF nachgewiesen (Apfel et al., 1992). Ebenfalls konnte durch NGF das Axonenwachstum bei Ratten angeregt werden, denen die Hinterwurzelganglien durchtrennt worden waren (Ramer et al., 2000). Weiter wurde nach Applikation von NGF ein Einfluss auf periphere Nervenzellen sowie die Induktion anderer Neurotrophine beobachtet (Apfel & Kessler, 1996). Dabei ist die Applikationsform von zentraler Bedeutung, denn NGF kann aufgrund seiner Ladung und Polarität nicht die Blut-Hirn-Schranke passieren (Tuszynski, 2002).

NGF und ProNGF kommen in Geweben von Säugetieren in nur geringen Konzentrationen vor. Hohe Extraktionskosten und mögliche Verunreinigungen mit Pathogenen sprechen gegen eine Gewinnung von NGF und ProNGF aus diesen Quellen für die Therapie. Daher kommt für die Herstellung derzeit nur die rekombinante Produktion in Betracht. Hierzu stehen zwei

etablierte Methoden zur Wahl. Die Expression in eukaryotischen Zellen bietet den Vorteil einer korrekten *post*-translationalen Prozessierung, wie Glykosylierung und Spaltung des Zielproteins. Gut etabliert und industriell häufig angewendet ist beispielsweise die Expression in Insektenzellen (Sf9), welche über ein Baculovirussystem mit dem ProNGF-Gen transfiziert werden (Fahnestock et al., 2004a).

Eine andere Methode um kostengünstig und in hohen Ausbeuten NGF und ProNGF herzustellen, ist die Expression in prokaryotischen Zellen. Bei der Expression von NGF und ProNGF in *E. coli* erfolgt die Produktion des Proteins im reduzierenden Milieu des Cytoplasmas, und es wird dort unlöslich in Aggregaten, sogenannten *inclusion bodies* akkumuliert (Rattenholl et al., 2001a; Rattenholl, 2001). Dieses Phänomen wird häufig bei der Expression disulfidverbrückter Proteine in Bakterienzellen beobachtet. Durch das reduzierende cytosolische Milieu ist die Ausbildung von Disulfidbrücken, welche in der Regel für die Faltung essentiell sind, nicht möglich. Die *inclusion bodies* können aber mit Hilfe geeigneter chaotroper Substanzen solubilisiert werden (Rudolph & Lilie, 1996; De Bernardez et al., 1999). Anschließend erfolgt die Renaturierung unter Zuhilfenahme niedermolekularer Substanzen wie Arginin, welche eingesetzt werden um aggregationsanfällige Faltungsintermediate in Lösung zu halten. Gleichzeitig wird durch ein geeignetes *oxido-shuffling*-System wie zum Beispiel die Kombination von reduziertem und oxidiertem Glutathion die Ausbildung der Disulfidbrücken ermöglicht. So wurde im Fall der Rückfaltung von ProNGF eine gegenüber der Renaturierung des reifen NGF drastisch erhöhte Ausbeute und Kinetik dokumentiert (Rattenholl et al., 2001b). Nach der Faltung ProNGF wurde reifer NGF durch *in vitro*-Proteolyse mit Trypsin hergestellt. Mit Hilfe des DRG (*dorsal root ganglion*)–Assay konnte gezeigt werden, dass in *E. coli* exprimierter und *in vitro* renaturierter ProNGF, welcher anschließend zu reifem NGF prozessiert wurde, dieselbe biologische Aktivität wie herkömmlicher, aus Mäusesakromzellen gewonnener NGF besitzt (Rattenholl, 2001).

## 2.7 Biophysikalische Charakterisierung von NGF und ProNGF

Wie im Kapitel 1.2 beschrieben, liegen NGF und ProNGF als Homodimere vor (Bothwell & Shooter, 1977; Rattenholl, 2001). Für dimere Proteine beschreibt ein Drei-Zustandsmodell (Gl. 1.1) das Gleichgewicht aus nativem Dimer ( $N_2$ ), nativem Monomer (N) und entfaltetem Monomer (D).



wobei  $K_1 = [N]^2 / [N_2]$  und  $K_2 = [D] / [N]$  Gl. 1.2

Wenn  $K_1$  größer als  $K_2$  ist, folgt, dass natives Monomer populiert wird. Daraus ergibt sich, dass die stabilisierenden Wechselwirkungen im Monomer stärker sind als die Assoziation der beiden monomeren Untereinheiten. Ist  $K_1$  deutlich kleiner als  $K_2$ , stellt die Assoziation der Monomere den Hauptbeitrag zur Stabilisierungsenergie dar und natives Monomer ist nur gering gegenüber dem entfalteten Zustand stabilisiert. Beim NGF kann unter nativen Bedingungen ausschließlich das Dimer und kein Monomer beobachtet werden. Auch bei Entfaltungs- und Faltungsstudien von NGF unter oxidativen Bedingungen in GdmCl und Harnstoff ließ sich kein natives Monomer nachweisen. Das NGF-Dimer dissoziiert unter gleichzeitiger Entfaltung der beiden monomeren Untereinheiten (Timm & Neet, 1992). Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei anderen dimeren Proteinen, wie dem Arc-Repressor gemacht (Bowie & Sauer, 1989). Daher kann das Gleichgewicht auch vereinfacht als Zwei-Zustandsmodell beschrieben werden (Gl. 1.3).

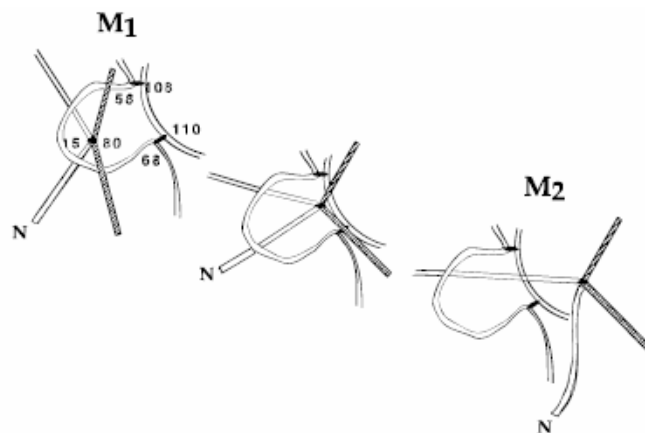


Das gefaltete NGF-Dimer ist unter nativen Bedingungen (pH 7.0) mit  $\Delta G_{N \rightarrow D} = 80,9$  kJ/mol stabilisiert (Timm & Neet, 1992; Timm et al., 1994).

Allerdings ist die De- und Renaturierung von NGF weitaus komplexer als ursprünglich angenommen wurde. Wird NGF aus der Maus für kurze Zeit unter denaturierenden Bedingungen inkubiert, so ist die Denaturierung vollständig reversibel (Radziejewski et al., 1992; Timm & Neet, 1992; Timm et al., 1994). De- und Renaturierungen bei Denaturationskonzentrationen im Übergangsbereich benötigen 24 bis 72 h bis zur Gleichgewichtseinstellung (Timm & Neet, 1992). Bei Denaturierungsübergängen mit GdmCl wurde mit steigender Inkubationszeit eine Verschiebung des Übergangsmittelpunkts zu niedrigeren GdmCl-Konzentrationen beobachtet (De Young et al., 1996). Das aus der kurzzeitigen Denaturierung erhaltene, entfaltete Protein stellte ein Intermediat dar und wandelte sich sehr langsam in den vollkommen entfalteten Zustand um (Gl. 1.4). Dadurch wird der erste Entfaltungszustand aus dem Gleichgewicht mit dem nativen Zustand entfernt und eine Verschiebung des Übergangsmittelpunktes beobachtet. Aus diesem Ergebnis schlossen die Autoren auf die Existenz von zwei monomeren Entfaltungszuständen.



In Anwesenheit von GdmCl denaturiert das Dimer ( $\text{N}_2$ ) bei gleichzeitiger Dissoziation zu zwei monomeren Untereinheiten ( $2\text{M}_1$ ) (siehe Gl. 1.3). Bei längeren Inkubationszeiten unterliegt das Monomer  $\text{M}_1$  weiteren strukturellen Veränderungen, und es entsteht das völlig entfaltete Monomer  $\text{M}_2$  (De Young et al., 1996; De Young et al., 1999). Da der Übergang von  $\text{M}_1$  zu  $\text{M}_2$  bei 25 °C über einen Zeitraum von mehreren Tagen verläuft, ist anzunehmen, dass sich die meisten publizierten Daten zur De- und Renaturierung von NGF auf den Übergang vom nativen Dimer zum ersten Entfaltungszustand beschränken. Auch bei anderen Neurotrophinen wurde die Gegenwart verschiedener Entfaltungszuständen in Abhängigkeit der Inkubationszeit nachgewiesen (Philo et al., 1993; De Young et al., 1999). Worin sich die beiden Zustände  $\text{M}_1$  und  $\text{M}_2$  unterscheiden, konnte nicht genau identifiziert werden. Beim *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) wird ein "molten globule" postuliert, welches selbst nicht dimerisieren kann (Philo et al., 1993).



**Abb. 1.4:** Schematische Darstellung des "loop-threading"-Mechanismus nach De Young et al., 1996 und De Young et al., 1999. Die Spezies  $\text{M}_2$  repräsentiert gegenüber der Spezies  $\text{M}_1$  den Zustand, in dem der N-Terminus des NGF durch die Ringstruktur des Cystin-Knotens gefädelt wurde. Die Zahlen kennzeichnen die Cysteine.

Bei NGF wurde die Theorie aufgestellt, dass der Unterschied zwischen  $\text{M}_1$  und  $\text{M}_2$  auf einem Durchfädeln der Disulfidbrücke ( $\text{Cys}^{15}\text{-Cys}^{80}$ ) mit dem N-Terminus durch den Peptid-Ring des Cystin-Knotens beruht (Abb. 1.4). Unterstützt wurde diese "loop-threading"-Hypothese mit Mutanten, welche verkürzte N-Termini aufwiesen. Bei diesen Mutanten konnte ein schnellerer Übergang von  $\text{M}_1$  zu  $\text{M}_2$  beobachtet werden. Andere Ursachen für die langsame Umwandlung, wie eine Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung, die häufig

Ursache für eine langsame Faltungsreaktion ist (Schmid & Baldwin, 1979), wurden aufgrund der gegenüber einer Prolinisomerisierung erhöhten Aktivierungsenergie ausgeschlossen (De Young et al., 1996).

## 2.8 Problemstellung und Ziele der Arbeit

Aus vorangegangenen Arbeiten war bekannt, dass das Pro-Peptid des ProNGF als intramolekulares Chaperon bei der oxidativen Faltung von NGF fungiert (Rattenholl et al., 2001a,b). In der vorliegenden Arbeit sollte der wechselseitige Einfluss von Pro-Peptid und NGF auf die Struktur und Strukturbildung der jeweiligen Domäne im ProNGF mit bereits korrekt ausgebildeten Disulfidbrücken untersucht werden. Dies beinhaltet (I) den Einfluss des Pro-Peptids auf die Renaturierung des denaturierten NGF mit intakten Disulfidbrücken. In diesem Zusammenhang sollte ebenfalls geprüft werden, ob die Anwesenheit des Pro-Peptids einen Einfluss auf die langsame Entfaltung des NGF-Teils hat und die "loop-threading"-Hypothese als Erklärung für das beobachtete Phänomen Gültigkeit besitzt (De Young et al., 1996; De Young et al., 1999). Neben "loop-threading" sollten auch alternative Mechanismen als Ursache für die langsame Entfaltungsreaktion überprüft werden.

(II) Parallel zur Untersuchung des Einflusses des Pro-Peptids auf die De- und Renaturierung des reifen Teils sollte umgekehrt der Einfluss des nativ strukturierten reifen Teils auf die De- und Renaturierung des Pro-Peptids analysiert werden. Ein Vergleich der Struktur und Stabilität von NGF-gebundenem und isoliertem Pro-Peptid sollte dabei Einblicke in die intramolekularen Wechselwirkungen zwischen reifem NGF und seinem Pro-Peptid geben und zum besseren Verständnis der Funktionen von ProNGF und Pro-Peptid beitragen.

Neben der Funktion als Faltungshelfer spielt das Pro-Peptid wahrscheinlich auch eine Rolle bei der biologischen Aktivität, welche durch Bindung an p75NTR hervorgerufen wird (Lee et al., 2001; Beattie et al., 2002). (III) Daher sollten in einer Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Anders Nykjaer ProNGF und das isolierte Pro-Peptid hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität näher charakterisiert werden.