

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen der langsamen Entfaltung der Pro-Form des Nervenwachstumsfaktors sprechen gegen die "loop-threading"-Hypothese bei NGF

Kliemann, M., Weininger, U., Balbach, J., Schwarz, E., and Rudolph, R. (2006). Examination of the slow unfolding of pro-nerve growth factor argues against a loop threading mechanism for nerve growth factor. *Biochemistry*, **45**:3517-3524.

Wie in der Einleitung ausgeführt, konnten während der Denaturierung von NGF zwei Phasen der Entfaltung beobachtet werden. Laut Literatur spiegelt die erste schnelle Phase die Dissoziation des NGF-Dimers bei gleichzeitiger Entfaltung der Monomere wider (Timm & Neet, 1992). Mit längerer Inkubationszeit unter denaturierenden Bedingungen wurde eine zweite langsame Entfaltungsphase zum vollständig entfalteten Monomer beobachtet (De Young et al., 1996). Aus diesen Beobachtungen wurde der folgende sequentielle Entfaltungsweg postuliert:



In diesem Modell stellt N_2 das native NGF-Dimer, M_1 das partiell entfaltete NGF-Monomer und M_2 das vollständig entfaltete Monomer dar. Untersuchungen mittels NMR-, fern-UV-CD- und Fluoreszenzspektroskopie zeigten, dass weder der M_1 - noch der M_2 -Zustand definierte Sekundär- oder Tertiärstrukturelemente besitzen. Mit der "loop-threading"-Hypothese wurde postuliert, dass der Übergang von M_1 zu M_2 ein Rückfädeln der durch den Ring des Cystin-Knoten gezogenen Disulfidbrücke mit dem N-Terminus darstellt (De Young et al., 1996; De Young et al., 1999). Die langsame Entfaltung sollte durch einen Gewinn an Entropie durch den flexibleren (entfädelten) N-Terminus getrieben werden. Die "loop-threading"-Hypothese wurde experimentell durch Ergebnisse mit N-terminal verkürzten NGF-Varianten gestützt, bei denen eine Beschleunigung des $M_1 \rightarrow M_2$ Übergangs beobachtet wurde (De Young et al., 1996).

Da ProNGF das N-terminale, 102 Aminosäuren umfassende Pro-Peptid enthält, müsste nach Aussage der "loop-threading"-Hypothese diese sehr lange N-terminale Sequenz zu einer deutlichen Verlangsamung des Übergangs von M_1 zu M_2 führen. Aufgrund der unterschiedlichen Hydrophobizitäten der beiden Faltungszustände konnten M_1 and M_2 mittels *reversed-phase*-Chromatographie aufgetrennt und die Änderung ihrer Populationen über die Zeit der Denaturierung verfolgt werden. Durch Rechromatographie der getrennten Spezies wurde nachgewiesen, dass durch die Chromatographie das Verhältnis der beiden Zustände nicht

beeinflusst wird. Bei Untersuchungen des reifen NGF konnte für die Reaktion $M_1 \rightarrow M_2$ die in der Literatur publizierte Geschwindigkeitskonstante von $0,03 \text{ h}^{-1}$ bestätigt werden (Abb. 1, Seite 37) (De Young et al., 1996). Die Untersuchung der langsamen Entfaltung von ProNGF zeigte überraschenderweise eine nur unwesentlich kleinere Geschwindigkeitskonstante von $0,024 \text{ h}^{-1}$ (Abb. 2B, Seite 37). Dieses Resultat konnte nicht mit Hilfe der "loop-threading"-Hypothese erklärt werden. Ein direkter Einfluss des Pro-Peptids auf den Übergang vom nativen zum ersten Denaturierungszustand ($N \rightarrow M_1$) konnte ausgeschlossen werden, da bekannt war, dass das Pro-Peptid schon bei geringen GdmCl sehr schnell und vollständig entfaltet; spezifische Wechselwirkungen des Pro-Peptids mit dem Zustand M_1 , welche diesen stabilisieren und somit seine Umwandlung in den vollständig denaturierten Zustand M_2 inhibieren könnten, wurden daher ausgeschlossen. Die Denaturierung von ProNGF und NGF vom nativen in den ersten Denaturierungszustand erfolgte sehr schnell und beeinflusste nicht die langsame Denaturierung (Abb. 2A, Seite 37). Da davon auszugehen war, dass der langsamen Entfaltung von NGF und ProNGF dieselben molekularen Mechanismen zu Grunde liegen, stellte dieses Ergebnis die "loop-threading"-Hypothese in Frage und erforderte eine alternative Erklärung für den Mechanismus der langsamen Faltung und Entfaltung.

Mögliche Ursachen der langsamen Entfaltungsreaktion

Häufig sind Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierungen die molekularen Ursachen für langsame Faltungs- und Entfaltungsreaktionen. Da die erhaltenen Ergebnisse der "loop-threading"-Hypothese widersprachen, sollte eine mögliche Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung als geschwindigkeitsbestimmende Reaktion untersucht werden. Für den Übergang $M_1 \rightarrow M_2$ von NGF wurde eine Aktivierungsenergie von 108-112 kJ/mol bestimmt (De Young et al., 1996), ein Wert, der deutlich über dem typischen Wert der Aktivierungsenergie einer Prolinisomerisierung (75-91 kJ/mol) (Schmid & Baldwin, 1979) lag. Aufgrund dieser Tatsache wurde eine Prolinisomerisierung als Ursache für die langsame Entfaltung ausgeschlossen.

Zur Berechnung der Aktivierungsenergie der langsamen ProNGF-Entfaltung wurde die Geschwindigkeit der Reaktion $M_1 \rightarrow M_2$ in Abhängigkeit von der Temperatur bestimmt (Abb. 3A und Tabelle 1, Seite 38). Aus diesen Daten konnte für den Übergang des ProNGF vom M_1 - zum M_2 -Zustand eine Aktivierungsenthalpie (ΔH^\ddagger) von $88,8 \pm 5,3 \text{ kJ/mol}$, eine Aktivierungsentropie (ΔS^\ddagger) von $20,5 \pm 2,0 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ und eine Aktivierungsenergie (ΔG^\ddagger) bei 20°C von $82,8 \pm 6,6 \text{ kJ/mol}$ berechnet werden (Abb. 3B, Seite 38). Aufgrund der berechneten Aktivierungsenergie konnte daher eine Prolinisomerisierung als molekulare

Ursache für die langsame Entfaltung des NGF-Teils nicht ausgeschlossen werden. Die Diskrepanz der hier bestimmten Aktivierungsenergie zu dem von De Young und Mitarbeitern bestimmten Wert konnte nicht aufgeklärt werden (De Young et al., 1996).

Da Reduktions- und Oxidationsreaktionen der Cysteine und eine damit verbundene Umverknüpfung der Disulfidbrücken als Ursache für die beobachtete langsame Reaktion in Betracht kamen, sollte die langsame Entfaltung von ProNGF hinsichtlich möglicher Reduktions- und Oxidationsreaktionen näher untersucht werden. Da Reduktions- und Oxidationsreaktionen pH-Wert-abhängig sind dies aber nicht beobachtet wurde, konnte eine Neuverknüpfung der Disulfidbindungen während der langsamen Entfaltung ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).

Strukturelle Untersuchung des M₁- und M₂-Zustands von NGF und ProNGF

Da sowohl mittels Fluoreszenz- als auch fern-UV-CD-Spektroskopie keine strukturellen Unterschiede zwischen M₁ und M₂ bei ProNGF detektiert werden konnten (Daten nicht gezeigt), wurde eine Strukturanalyse des M₁- und M₂-Zustandes mittels 1D-NMR-Spektroskopie von ProNGF durchgeführt. Hierzu wurde die langsame Denaturierung mittels 1D-NMR-Spektroskopie beobachtet. Das 1D-NMR-Spektrum der M₂-Spezies zeigte eine charakteristische Signalverteilung eines vollständig entfalteten Proteins ohne Sekundär- oder Tertiärstrukturelemente (Abb. 4A, unteres Spektrum, Seite 38). Im Gegensatz dazu zeigte das 1D-NMR-Spektrum der M₁-Spezies für Reststrukturen typische Hochfeldverschiebungen von Seitenkettenresonanzen unter 0,7 ppm und eine Niederfeldverschiebung der H^α Resonanzen zwischen 4,8 und 5,2 ppm (Abb. 4A, oberes Spektrum, Seite 38). Unterschiede in den Resonanzen der aromatischen Aminosäurereste deuteten auf eine lokale Reststruktur, die wahrscheinlich um den Cystin-Knoten im M₁-Zustand erhalten ist.

Eine Auswertung der Geschwindigkeitskonstante des mittels 1D-NMR-Spektroskopie detektierten M₁ zu M₂ Übergangs anhand der Hochfeldverschiebung ergab eine Geschwindigkeitskonstante von $0,28 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ bei 45°C (Abb. 4B, Seite 38) und war identisch mit der mittels HPLC bestimmten Geschwindigkeitskonstante (Abb. 2B, Seite 37). Zur detaillierteren Auflösung von Reststrukturen wurde NGF einheitlich mit ¹⁵N markiert und der M₁ zu M₂ Übergang mittels ¹H-¹⁵N-HSQC-NMR-Spektroskopie untersucht. Einige beobachtete chemische Verschiebungen deuteten auf einen nicht vollständig entfaltenen Bereich im M₁-Zustand. Hingegen zeigten die meisten Signale eine konstante Intensität und wiesen auf den völlig denaturierten Zustand während der gesamten Entfaltungsreaktion von M₁ zu M₂ (Abb. 5, Seite 39). Auffällig war die Beobachtung, dass mindestens 50 % der

Amidssignale der Peptidbindungen aufgrund der chemischen Verbreiterung fehlten. Während des Übergangs M_1 zu M_2 konnten sowohl Intensitätszunahmen als auch Intensitätsabnahmen beobachtet werden (Abb. 6A, C, D, Seite 40), welche Geschwindigkeitskonstanten zeigten, die identisch mit der mittels HPLC bestimmten Geschwindigkeitskonstante waren (Abb. 2B, Seite 37).

Lokalisierung der beobachteten Reststruktur

Insgesamt konnten damit drei experimentelle Beobachtungen gemacht werden, welche auf einen strukturellen Unterschied zwischen M_1 und M_2 deuteten. (I) Beide Zustände ließen sich aufgrund unterschiedlicher Hydrophobizitäten mittels *reverse-phase*-HPLC trennen. (II) Es wurden Unterschiede in der Verteilung der ^1H Resonanzen im 1D-NMR-Spektren beobachtet. (III) Fehlende *cross-peaks* im 2D-HSQC-Spektrum des M_1 -Zustandes gegenüber dem M_2 -Zustand deuteten ebenfalls auf strukturelle Unterschiede.

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wurde auf eine Reststruktur in räumlicher Nähe des Cystin-Knotens geschlossen. Die Auswirkung dieser Struktur auf den Cystin-Knoten sollte anhand der Reduktionsgeschwindigkeit des Cystin-Knotens untersucht werden. In Gegenwart von 100 mM DTT konnte dabei eine 30fach schnellere Reduktion des Cystin-Knotens von ProNGF im M_2 -Zustand als im M_1 -Zustand beobachtet werden (Abb. 7, Seite 40). Dies deutete auf eine wesentlich bessere Zugänglichkeit der Disulfidbrücken für DTT im M_2 -als im M_1 -Zustand. Das Ergebnis impliziert gleichzeitig eine Reststruktur im M_1 -Zustand, welche in räumlicher Nähe des Cystin-Knotens lokalisiert sein sollte.

Analyse der Renaturierung des M_2 -Zustands

Sollte die M_2 -Spezies einen Zustand repräsentieren, bei der der N-Terminus durch den aus den zwei Disulfidbrücken gebildeten Ring hindurchgefädelt wurde, so war zu erwarten, dass eine Renaturierung zum nativen Zustand nicht möglich ist. Eine Untersuchung der Zeitabhängigkeit der Renaturierung des M_2 -Zustands sollte weiteren Aufschluss über Unterschiede zwischen M_1 und M_2 geben. Die Analyse der Renaturierung erfolgte wie bei der Denaturierung mittels RP-HPLC. Diese Methode erlaubte allerdings nur eine Unterscheidung zwischen M_1 und M_2 , da natives Protein unter HPLC-Bedingungen zu M_1 denaturiert wird. Jedoch steht der denaturierte Zustand M_1 im schnellen Gleichgewicht mit dem nativen Zustand, so dass die Methode zur Detektion der Renaturierung geeignet war (De Young et al., 1996).

Mit zunehmender Renaturierungszeit konnte eine Abnahme der M₂-Spezies und eine Zunahme der M₁-Spezies beobachtet werden (Abb. 8A, Seite 41). Aus der Zu- und Abnahme der beiden Spezies wurde eine Geschwindigkeitskonstante von 0,083 h⁻¹ bei 20°C und eine Gesamtausbeute von ca. 75 % berechnet (Abb. 8B, Seite 41). Eine nähere Analyse der im Faltungsansatz enthaltenen inhomogenen Proteinspezies erfolgte mittels Größenausschlusschromatographie, da bekannt war, dass ausschließlich nativer ProNGF zur Dimerisierung fähig ist (Bothwell & Shooter, 1977; Timm & Neet, 1992; Rattenholl et al., 2001a). Die Fern-UV-CD- und Fluoreszenzspektren des renaturierten ProNGF waren identisch mit dem Spektrum der nativen Referenz (Abb. 9A und 9B, Seite 41). Folglich war es möglich, vollständig denaturierten ProNGF aus dem M₂-Zustand zur nativen Struktur zu renaturieren.

Eine Bestimmung der Faltungsausbeute mittels Gelfiltration ergab allerdings, dass nur ca. 30 % der Moleküle in der nativen Konformation vorlagen (Daten nicht gezeigt), also weitaus weniger als die zuvor durch RP-HPLC ermittelten 75 %. Eine Tatsache, die darauf hindeutete, dass die durch RP-HPLC detektierte Fraktion neben faltungskompetentem ProNGF auch irreversibel denaturierten ProNGF einschloss. Die Faltungsausbeute von 30 % konnte zudem durch Denaturierungskinetiken des Faltungsansatzes bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassung

Zwei der drei Prolinreste (Pro⁶¹ und Pro⁶³) in NGF sind in der Ringstruktur des Cystin-Knoten lokalisiert und konnten weder durch Cokristallisation mit dem TrkA- noch mit p75NTR-Rezeptor aufgelöst werden (Wiesmann et al., 1999; He & Garcia, 2004). Der dritte Prolinrest befindet sich am N-Terminus und liegt in der *trans*-Konformation vor (Wiesmann et al., 1999). Zur Analyse, ob die langsame Faltungs- und Entfaltungsreaktion durch eine Prolinisomerisierung hervorgerufen wird, wurden drei Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (Cyclophilin 12, FKBP 18 und SlyD) hinsichtlich ihrer Auswirkung auf die Beschleunigung der Faltungsreaktion getestet. Bei keiner der getesteten Prolinisomerasen konnte eine Beschleunigung nachgewiesen werden. Dennoch konnte eine Prolinisomerisierung als Ursache für die sehr langsamen Umwandlungsprozesse nicht vollständig ausgeschlossen werden, da keine Aussagen über die Zugänglichkeit der Prolinreste für die Prolinisomerasen getroffen werden konnte.

Die aufgeführten Ergebnisse zeigten, dass die "loop-threading"-Hypothese als molekulare Ursache für die langsame Entfaltung nicht weiter in Betracht kommt: (I) Die Gegenwart des Pro-Peptids verlangsamt die Entfaltung von M₁ zu M₂ nicht signifikant. Nach der "loop-

threading"-Hypothese wurde erwartet, dass der um das Pro-Peptid verlängerte N-Terminus deutlich langsamer durch den Ring fädelt. (II) Vollständig in M_2 vorliegender ProNGF konnte wieder renaturiert werden. Der "*loop-threading*"-Hypothese folgend, wäre ein Zurückfädeln des N-Terminus durch den Ring nicht zu erwarten. (III) Im Gegensatz zur "*loop-threading*"-Hypothese, welche beinhaltet, dass beide Zustände quasi vollständig entfaltet vorliegen und sich nur im Bezug auf den ein- bzw. ausgefädelten N-Terminus unterscheiden, konnten strukturelle Unterschiede mittels NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden. So konnte eine Reststruktur in räumlicher Nähe des Cystin-Knotens im M_1 -Zustand beobachtet werden, welche im M_2 -Zustand nicht detektiert wurde. (IV) Die eingeschränkte Zugänglichkeit der Disulfidbrücken gegenüber DTT im M_1 -Zustand im Vergleich zum M_2 -Zustand bestätigte die Zuordnung der Reststrukturen im M_1 -Zustand in der Nähe des Cystin-Knoten.

Diese Reststrukturen stellen den Unterscheid zwischen den beiden Zuständen M_1 und M_2 dar. Die Auflösung der Reststruktur unter denaturierenden Bedingungen wurde als sehr langsame Entfaltung beschrieben und irrtümlich mit der "*loop-threading*"-Hypothese erklärt. Die Lokalisierung um den Cystin-Knoten und die damit verbundene sterische Einschränkung könnten Ursache für die ungewöhnlich langsame Entfaltung sein. Darüber hinaus stellen diese Reststrukturen wahrscheinlich einen Kern dar, aus denen eine effiziente und schnelle Faltung von NGF (Timm & Neet, 1992) und ProNGF möglich ist.

3.2 Die native NGF-Domäne induziert die Struktur des Pro-Peptids im ProNGF

Kliemann, M., Rattenholl, A., Golbik, R., Balbach, J., Lilie, H., Rudolph, R., and Schwarz, E. (2004). The mature part of ProNGF induces the structure of its pro-peptide. *FEBS Lett.*, **566**:207-212.

Neben der biologischen Funktion als *in vitro*-Faltungshelfer stimuliert das NGF-Pro-Peptid durch Bindung sowohl an p75NTR als auch an TrkA auch eine pro-apoptotische Aktivität (Lee et al., 2001; Nykjaer et al., 2004). Eine biophysikalische Charakterisierung sollte über die Struktur und Stabilität des isolierten NGF-Pro-Peptids und des an NGF kovalent gekoppelten Pro-Peptids Aufschluss geben. Verschiedene Methoden zur Untersuchung des Oligomerzustands wie analytische Ultrazentrifugation oder Gelfiltration zeigten, dass das isolierte Pro-Peptid im Gegensatz zum NGF bzw. ProNGF als Monomer vorliegt (Abb. 2, Seite 44) (Timm & Neet, 1992; Rattenholl et al., 2001a).

Das NGF-Pro-Peptid ist nur gering strukturiert

Um weitere Kenntnisse über die Struktur des isolierten Pro-Peptids zu erhalten, wurde die intrinsische Fluoreszenz des Proteins untersucht. Der einzelne Tryptophanrest des Pro-Peptids lag sowohl unter nativen als auch unter denaturierenden Bedingungen lösungsmittel exponiert vor. Dies bedeutete, dass der Tryptophanrest nicht an der Ausbildung einer Tertiärstruktur beteiligt ist (Abb. 3A, Seite 45). Eine Analyse der Fluoreszenzeigenschaften der vier sich im Pro-Peptid befindenden Phenylalaninreste zeigte dagegen eine Abnahme der Fluoreszenzintensität unter denaturierenden Bedingungen, welche auf einen verminderten Energietransfer von dem angeregten Phenylalaninrest zum Tryptophanrest im denaturierten Zustand wies (Abb. 3B, Seite 45). Das fern-UV-CD-Spektrum zeigte ein Plateau zwischen 218 und 223 nm sowie ein Minimum bei 205 nm (Abb. 3C, Seite 45). Dieses Spektrum wurde als ein Indiz für einen geringen Anteil an β -Faltblattstruktur und einen hohen Anteil an "random coil"-Struktur interpretiert. Eine Auswertung des fern-UV-CD-Spektrums mit Hilfe des Programms CDNN (Bohm et al., 1992) ergab einen β -Faltblattanteil von 24% und einen "random coil"-Anteil von 34%.

Zur Untersuchung der Stabilität wurde das isolierte Pro-Peptid mit GdmCl titriert und die Denaturierung mit der damit verbundenen Änderung der Sekundärstruktur mit Hilfe von fern-UV-CD-Spektroskopie verfolgt. Die Detektion erfolgte bei 220 nm, einer Wellenlänge, bei der der spektroskopische Unterschied zwischen nativem und denaturiertem Zustand am

größten ist. Die reversibel verlaufende Denaturierung zeigte einen nicht-kooperativen Übergang; die Struktur des isolierten Pro-Peptids ist demnach nicht durch kooperativ wirkende Wechselwirkungen stabilisiert (Abb. 4A, Seite 45). Dieses Ergebnis konnte auch mit Hilfe der Analyse der Phenylalaninfluoreszenz bestätigt werden. Bei Versuchen mit steigenden Konzentrationen von Ammoniumsulfat konnte keine Stabilisierung der Pro-Peptid-Struktur nachgewiesen werden (Abb. 4B-D, Seite 45). Vermutlich enthält das Pro-Peptid keinen ausgeprägten hydrophoben Kern.

Der Vergleich der 1D-Protonen-NMR-Spektren (Abb. 5, Seite 46) von nativem und denaturiertem isolierten Pro-Peptid bestätigte die zuvor mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie gewonnenen Daten. Das isolierte Pro-Peptid liegt unter beiden Bedingungen nahezu vollständig entfaltet vor. Geringe Unterschiede zwischen beiden Zuständen konnten auf lokale Kontakte zurückgeführt werden. Eine definierte Tertiärstruktur des isolierten Pro-Peptids konnte nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassend wurde sowohl aus der chemisch induzierten Entfaltung als auch aus den NMR-Experimenten ersichtlich, dass das isolierte Pro-Peptid keine kooperativ stabilisierte Tertiärstrukturelemente besitzt. Darüber hinaus konnte mittels fern-UV-CD-Spektroskopie definierte Sekundärstrukturanteile nachgewiesen werden. Der Energietransfer der angeregten Phenylalaninreste zum Tryptophanrest zeigte die kompaktere Anordnung des isolierten Pro-Peptids unter nativen gegenüber denaturierenden Bedingungen. Zum Vergleich der Stabilität und Struktur wurde das an NGF gekoppelte Pro-Peptid mittels fern-UV-CD- und Fluoreszenzspektroskopie untersucht.

Stabilisierung des NGF-gekoppelten Pro-Peptids durch den reifen Teil

Die komplette Denaturierung von ProNGF zeigte zwei kooperative Übergänge (Abb. 6B, Seite 46), wobei der zweite Denaturierungsübergang mit einem Mittelpunkt bei 3,5 M GdmCl die Denaturierung der reifen NGF-Domäne widerspiegelte (Timm & Neet, 1992; Rattenholl et al., 2001a). Der erste Übergang mit einem Mittelpunkt bei 0,85 M GdmCl resultierte aus der Denaturierung des Pro-Peptids. Das schmale Plateau zwischen beiden Übergängen repräsentierte eine Spezies, in der das Pro-Peptid denaturiert und der NGF-Teil nativ strukturiert war. Dass dieser partiell denaturierte ProNGF wie nativer ProNGF als Homodimer vorlag, konnte mittels analytischer Ultrazentrifugation nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Denaturierung des Pro-Peptids im ProNGF bewirkte im Gegensatz zum isolierten Pro-Peptid eine Änderung der Lösungsmittelzugänglichkeit von mindestens einem Tryptophanrest. Ob die während der Pro-Peptid-Denaturierung beobachtete

Fluoreszenzänderung durch einen Tryptophanrest im reifen oder im Pro-Peptid-Teil verursacht wurde, konnte dabei nicht unterschieden und aufgeklärt werden. Die geringe GdmCl-Konzentration, welche ausreichte um das Pro-Peptid zu denaturieren und vom reifen Teil zu dissoziieren, deutete auf eine nur geringe Stabilisierung. Für die reversible Entfaltung des Pro-Peptids wurde ein ΔG° von $-7,8$ kJ/mol berechnet (Abb. 6C, Seite 46).

Reifer NGF enthält drei Tryptophan-, zwei Tyrosin- und sieben Phenylalaninreste (McDonald et al., 1991; Wiesmann et al., 1999). Aus den Strukturmodellen des humanen und murinen NGF war bekannt, dass zwei Tryptophanreste in der Dimerisierungsfläche lokalisiert sind. Der dritte Tryptophanrest ist an der Rezeptorbindung mit TrkA und p75TNR beteiligt und auf der Oberfläche des Moleküls teils lösungsmittel exponiert lokalisiert (Wiesmann et al., 1999; He & Garcia, 2004).

Wechselwirkungen, welche die Struktur des ProNGF-Pro-Peptids im Gegensatz zum isolierten Pro-Peptid stabilisieren, konnten mittels Ammoniumsulfat verstärkt werden. Mit steigenden Ammoniumsulfatkonzentrationen konnte eine Verschiebung des Übergangsmittelpunkts zu höheren GdmCl-Konzentrationen beobachtet werden (Abb. 7B-D, Seite 47).

Wie aus den vorgestellten Ergebnissen hervorgeht, besteht eine Wechselwirkung zwischen dem Pro-Peptid und dem reifen Teil im Kontext des nativen ProNGF. Da das Pro-Peptid aber auch einen Einfluss auf die Strukturbildung des reifen Teils während des Prozesses der oxidativen Faltung nimmt, ist während der Faltung auch eine Wechselwirkung des Pro-Peptids mit Faltungsintermediaten anzunehmen. Daher beschränken sich Wechselwirkungen des Pro-Peptids mit dem reifen Teil nicht auf einige wenige strukturell definierte Wechselwirkungen, sondern deutet auf eine Assoziation des relativ flexiblen Pro-Peptids mit mehreren und unterschiedlich strukturierten Abschnitten des reifen Teils.

3.3 Das Pro-Peptid des ProNGF: Strukturbildung und intramolekulare Assoziation mit NGF

Kliemann, M., Golbik, R., Rudolph, R., Schwarz, E. and Lilie, H. (2006) The pro-peptide of NGF: structure formation and intramolecular association with NGF. eingereicht bei *Prot. Sci.*

Wie in vorherigen Arbeiten gezeigt werden konnte, führt die GdmCl induzierte Gleichgewichtsdenaturierung des NGF-gekoppelten Pro-Peptids im Gegensatz zum isolierten Pro-Peptid, welches einen reversiblen nicht-kooperativen Übergang zeigt, zu einem reversiblen kooperativen Übergang (Abb. 1, Seite 50) (Kliemann et al., 2004). Der mittels Fluoreszenzspektroskopie gemessene kooperative Denaturierungsübergang wies daraufhin, dass die Struktur des NGF-gekoppelten Pro-Peptids im Gegensatz zum isolierten Pro-Peptid durch tertiäre Wechselwirkungen stabilisiert ist. Ebenfalls konnte anhand der fern-UV-CD-Spektren ein identischer Anteil an Sekundärstruktur für das isolierte und das NGF-gekoppelte Pro-Peptid nachgewiesen werden (Kliemann et al., 2004).

Für eine detailliertere Untersuchung der De- und Renaturierung wurden die mittels fern-UV-CD- und Fluoreszenzspektroskopie ermittelten Übergänge miteinander verglichen. Überraschenderweise waren die mit Fluoreszenz und fern-UV-CD gemessenen Übergangskurven nicht identisch (Abb. 2, Seite 51). Der Übergang der fern-UV-CD-Messung erfolgte bei einer geringeren GdmCl-Konzentration als der der Fluoreszenzmessungen. Aufgrund der Änderung der Elliptizität während der Denaturierung konnten ein Rückschluss auf die Sekundärstruktur gezogen werden. Im Gegensatz dazu spiegelten die Änderungen der Fluoreszenzintensität während der Denaturierung die Umgebungsänderung der Fluorophore wider, welche mit einer Änderung der Tertiärstruktur korreliert. Die nichtkongruenten Kurven deuteten auf eine ungewöhnliche entkoppelte Entfaltung der Sekundär- und Tertiärstrukturen. Daher implizierte dieses Ergebnis die Existenz eines Intermediats, in dem die native Sekundärstruktur aufgelöst ist, aber Tertiärkontakte, nachgewiesen über die Tryptophanfluoreszenz, vorhanden sind. Dabei kann der Tryptophanrest, der in den Tertiärkontakt involviert ist, prinzipiell im reifen NGF-Teil als auch im Pro-Peptid-Teil lokalisiert sein. Mit Hilfe eines Fusionproteins bestehend aus dem reifen NGF und dem Pro-Peptid des Neurotrophins-3, welches keinen Tryptophanrest enthält, wurde während der Denaturierung eine ähnliche Änderung der Tryptophanfluoreszenz beobachtet (Manuskript in Vorbereitung). Folglich ist der Tryptophanrest, welcher zumindest für einen Teil der Fluoreszenzänderung verantwortlich ist, wahrscheinlich im reifen Teil lokalisiert.

Lokalisierung der mit NGF wechselwirkenden Region im Pro-Peptid

Zur Identifizierung der Pro-Peptid-Region, welche mit der reifen NGF-Domäne interagiert, wurden H/D-Austauschexperimente mit gekoppelter massenspektrometrischer Untersuchung durchgeführt. Diese Methode erlaubte die Identifizierung von Peptidfragmenten anhand ihres Molekulargewichts, welche aufgrund ihrer Wechselwirkung nur eingeschränkt Wasserstoff gegen Deuterium austauschen. Dazu wurde ProNGF in D₂O inkubiert und nach anschließender Ansäuerung durch Pepsin verdaut. Unter diesen experimentellen Bedingungen wurde ausschließlich die Pro-Peptid-Domäne des ProNGF in unterschiedliche lange Proteolyseprodukte fragmentiert. Die Masse der erhaltenen Fragmente wurde anschließend mittels MALDI-TOF analysiert und mit Hilfe des Programms FindPept™ (<http://www.expasy.ch/tools/findpept.html>) der Primärsequenz zugeordnet (Tab. "Table 1", Seite 52).

Neben der Mehrzahl von Fragmenten, welche einen vollständigen H/D-Austausch zeigten, konnten die Peptide Trp⁻⁸³-Ala⁻⁶³ and Gln⁻⁸⁰-Ala⁻⁶⁴ im ProNGF identifiziert werden, welche einen reduzierten H/D-Austausch zeigten (Tab. "Table 1", Seite 52). Im Gegensatz zur spezifischen Fragmentierung des NGF-gekoppelten Pro-Peptids konnten keine definierten Spaltprodukte nach der Proteolyse des isolierten Pro-Peptids identifiziert werden. Potenzielle Spaltstellen im NGF-gekoppelten Pro-Peptid waren daher wahrscheinlich durch Wechselwirkung mit dem reifen Teil vor Proteolyse geschützt. Mit den Peptiden Trp⁻⁸³-Ala⁻⁶³ and Gln⁻⁸⁰-Ala⁻⁶⁴ konnte eine Region identifiziert werden, welche wahrscheinlich an einer Wechselwirkung mit dem reifen NGF beteiligt ist. Eine Sequenzanalyse bezüglich des hydrophoben Moments nach der Eisenberg-Methode ergab, dass dieser Sequenzabschnitt die höchste Hydrophobizität innerhalb des Pro-Peptids besitzt (Eisenberg et al., 1984). Unter Annahme einer helikalen Struktur stellt dieser Bereich einen hoch amphiphilen Abschnitt dar.

Kinetische Untersuchung der Entfaltung und Faltung des NGF-gekoppelten Pro-Peptids

Die Änderung der Tryptophanfluoreszenz während der Denaturierung des ProNGF stellte eine Änderung der Wechselwirkung zwischen NGF und Pro-Peptid dar, da die Intensität der Tryptophanfluoreszenz des isolierten Pro-Peptids unter nativen und denaturierenden Bedingungen unverändert war (Abb. 3A, Seite 52). Zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen NGF und Pro-Peptid im ProNGF wurde die Faltung und Entfaltung des Pro-Peptids kinetisch untersucht. Eine Änderung des Fluoreszenzsignals im Bereich von 0 - 2 M GdmCl resultierte dabei ausschließlich von Strukturänderungen des NGF-gekoppelten Pro-Peptids,

da die NGF-Domäne erst ab GdmCl-Konzentrationen von über 3 M denaturiert (Timm & Neet, 1992; De Young et al., 1996; Kliemann et al., 2004).

Die Fluoreszenzamplituden während der Faltung und Entfaltung in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration entsprachen dabei den Fluoreszenzamplituden, welche während der Gleichgewichtsmessungen analysiert wurden (Daten nicht gezeigt) und deuteten darauf, dass beide Messungen denselben Prozess beschrieben. Während der Faltung des NGF-gekoppelten Pro-Peptids konnte eine monophasische Zunahme des Fluoreszenzsignals beobachtet werden (Abb. 3A, Seite 52). Eine monophasische Zunahme war aufgrund des aus den Gleichgewichtsübergängen erwarteten Intermediats überraschend. Eine Analyse der Faltung des NGF-gekoppelten Pro-Peptids mittels fern-UV-CD-Spektroskopie bei 220 nm zeigte ebenfalls eine monophasisch verlaufende Kurve (Abb. 3A, Seite 52), welche die gesamte zu erwartende Amplitude aufzeigte, so dass keine schnelle vorangehende Reaktion anzunehmen war. Eine weitere langsame Reaktion im Anschluss konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

Da innerhalb des Pro-Peptids neun Prolinreste lokalisiert sind, konnte eine Prolin-*cis/trans*-Isomerisierung als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Reaktion nicht ausgeschlossen werden. Allerdings wurde weder mit Hilfe verschiedener Prolinimerasen noch mittels Doppelsprungexperimenten eine Prolinimerisierung als geschwindigkeitsbestimmender Schritt für die Faltung nachgewiesen.

Eine kinetische Untersuchung der Denaturierung des NGF-gekoppelten Pro-Peptids in 1,75 M GdmCl mittels Fluoreszenzspektroskopie zeigte im Gegensatz zur Renaturierung einen biphasischen Verlauf der Reaktion (Abb. 3B, Seite 52). Aufgrund des schnellen Ablaufs der Reaktion war im Gegensatz zur Fluoreszenzmessung eine Bestimmung der Denaturierungsgeschwindigkeit mittels *stopped-flow*-fern-UV-CD-Spektroskopie nicht möglich (Abb. 3B, Seite 52). Diese ungewöhnliche Reihenfolge der Denaturierung entsprach den Ergebnissen aus den Gleichgewichtsmessungen, die zeigten, dass sich die Sekundärstruktur vor den Tertiärkontakten auflöste. Um Aufschluss zu erhalten, ob eine parallele oder serielle Reaktion die Ursache für den biphasischen Denaturierungsverlauf ist, wurde Doppelsprungexperimente durchgeführt. NGF-gekoppeltes Pro-Peptid wurde unterschiedlich lange unter denaturierenden Bedingungen inkubiert, anschließend renaturiert und die Strukturänderung mittels Fluoreszenzspektroskopie analysiert. Dabei wurde beobachtet, dass eine Denaturierungszeit von 25 s in 1,75 M GdmCl des NGF-gekoppelte Pro-Peptids zu einem monophasischen Verlauf der Renaturierung führt, welcher der Renaturierung des vollständig denaturierten Pro-Peptids entsprach. Im Gegensatz dazu wurde

bei kürzeren Denaturierungszeiten eine biphasische Faltungsreaktion mit einer ca. 20-fach schnelleren ersten Reaktion beobachtet (Abb. 4A, Seite 53). Das Ergebnis dieses Experiments wies eindeutig auf die Existenz eines Intermediats (I) während der Denaturierung des Pro-Peptids. Dabei resultierte die schnelle Reaktion aus der Umwandlung des Intermediats zum nativen Zustand (N), die langsame Reaktion spiegelte die Faltung des entfalteten Zustands (U) zum nativen Zustand wider; $U \rightarrow I \rightarrow N$. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion war die Umwandlung von $U \rightarrow I$, so dass die Reaktion $I \rightarrow N$ innerhalb der Gesamtreaktion nicht spektroskopisch erfasst werden konnte.

Die Akkumulation des Intermediats konnte während der Denaturierung in 1,75 M GdmCl nur innerhalb der ersten Sekunde beobachtet werden, da anschließend die vollständige Entfaltung des Intermediats erfolgte. Durch unterschiedlich lange Denaturierungszeiten in den Doppelsprungexperimenten konnte die zeitabhängige Akkumulation des Intermediats beobachtet werden (Abb. 4A, Seite 53). Die Amplituden der beiden Renaturierungsphasen reflektierten dabei die Populationen des Intermediats und der entfalteten Spezies. Anhand der Amplituden konnten daher sowohl die Zu- und Abnahme des Intermediats als auch die Akkumulation des entfalteten Zustands beobachtet werden (Abb. 4B, Seite 53). Die aus diesen Messungen berechnete Geschwindigkeit für die Abnahme des Intermediats korrelierte dabei mit den Kinetiken der biphasischen, mittels *stopped-flow*-Fluoreszenzmessung analysierten Denaturierung.

Da das Fluoreszenzspektrum des Intermediats aufgrund der schnellen Reaktion von $I \rightarrow U$ nicht direkt gemessen werden konnte, wurde versucht, das Spektrum aus den Denaturierungskinetiken bei verschiedenen Wellenlängen zu berechnen. Dazu wurde das NGF-gekoppelte Pro-Peptid in 1,8 M GdmCl denaturiert und die Kinetik bei verschiedenen Emissionswellenlängen zwischen 330 und 360 nm analysiert. Anhand der kinetischen Daten konnte ein Fluoreszenzmaximum für den denaturierten und intermediären Zustand bei 345-350 nm und für den nativen Zustand bei 337 nm bestimmt werden (Abb. 5, Seite 54). Demnach ist der Tryptophanrest, der für den spektroskopischen Unterschied des ProNGF mit nativem bzw. denaturiertem Pro-Peptid verantwortlich war, bereits im Faltungsintermediat exponiert.

Anhand der Fluoreszenzänderung während der Denaturierung konnte sowohl die Bildung des Intermediats als auch die Entstehung des denaturierten Zustands beobachtet werden. Demgegenüber wurde während der Renaturierung nur die Umwandlung von $U \rightarrow I$ beobachtet. Zur Bestimmung der Renaturierungsrate von $I \rightarrow N$ wurden Doppelsprungexperimente durchgeführt, wobei das NGF-gekoppelte Pro-Peptid für eine Sekunde bei 1,8 M

GdmCl denaturiert und anschließend rückgefaltet wurde. Die gemessenen Geschwindigkeitskonstanten der Faltung und Entfaltung in Abhängigkeit der GdmCl-Konzentration sind in Abb. 6 (Seite 54) als Chevron-Plot dargestellt. Die Extrapolationen der Daten ergaben die mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten für die Faltung und Entfaltung sowohl des nativen und denaturierten Zustands als auch des Intermediats unter nativen Bedingungen. Darüber hinaus konnte die thermodynamische Stabilität des nativen Zustands und des Intermediats berechnet werden (Abb. 6, Seite 54). Für die Gesamtreaktion $N \leftrightarrow U$ konnte eine Stabilisierungsenergie von 20,9 kJ/mol berechnet werden, welche sich aus den Teilreaktionen $N \leftrightarrow I$ mit 14,8 kJ/mol und $I \leftrightarrow U$ mit 6,1 kJ/mol zusammensetzt. Die mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten für die beiden Reaktionen $N \rightarrow I$ und $I \rightarrow U$ waren mit $k_{\text{q}} = 0.0025 \text{ s}^{-1}$ und einer Aktivierungsenergie von 86,3 kJ/mol identisch. Aufgrund der schnellen, mittels fern-UV-CD-Spektroskopie nicht quantifizierbaren Entfaltungsreaktion des NGF-gekoppelten Pro-Peptids stellt der Chevron-Plot nicht die gesamten Faltungs- und Entfaltungsprozesse dar.

Wie gezeigt werden konnte, beschreiben die tertiären Wechselwirkungen intramolekulare Interaktionen zwischen NGF und seinem Pro-Peptid, welche hauptsächlich auf hydrophoben Interaktionen beruhen (Kliemann et al., 2004). Hydrophoben Wechselwirkungen bei fehlender Sekundärstruktur wurde auch für andere Proteine beobachtet (Neri et al., 1992; Saab-Rincon et al., 1996). Dabei stellt die Wechselwirkung unter denaturierenden Bedingungen zwischen NGF und Pro-Peptid weniger einen hydrophoben Kern dar, sondern eher die Assoziation über hydrophobe Aminosäuren. Die strukturelle Wechselwirkung zeichnet sich dabei wahrscheinlich nicht durch eine hohe Selektivität und Spezifität aus, da dass Pro-Peptid sowohl den reifen NGF bindet als auch während der Faltung des reifen Teils als intramolekulares Chaperon fungiert (Rattenholl et al., 2001a).

An der Wechselwirkung zwischen NGF und Pro-Peptid sind, wie gezeigt werden konnte, ein oder mehrere Tryptophanrest(e) beteiligt. Dabei konnte anhand einer Chimäre aus NGF und dem verwandten Neurotrophin-Pro-Peptid des NT-3 nachgewiesen werden, dass einer dieser Tryptophanreste im NGF lokalisiert ist (Veröffentlichung in Vorbereitung). Aufgrund der zur Verfügung stehenden Daten der Röntgenstrukturanalyse konnte der Tryptophanrest Trp²¹ identifiziert werden, welcher lösungsmittel exponiert vorliegt (Abb. 7, Seite 56) (McDonald et al., 1991). Im Gegensatz dazu befinden sich die beiden anderen Tryptophanreste innerhalb der Dimerisierungsschnittstelle und sind unter nativen Bedingungen nicht zugänglich. Im ProNGF schränkt das gefaltete Pro-Peptid die Lösungsmittelzugänglichkeit dieses Tryptophanrests ein. Nach Denaturierung des Pro-Peptids liegt der Tryptophanrest

wieder lösungsmittlexponiert vor. Aufgrund der Annahme, dass das Pro-Peptid weder die Struktur noch die Dimerisierung des NGF beeinflusst, konnten Hinweise erhalten werden, dass das Pro-Peptid im Bereich von Trp²¹ mit dem reifen Teil interagiert.

Biologische Bedeutung des NGF-gekoppelten Pro-Peptids

Der Tryptophanrest Trp²¹, welcher wahrscheinlich an der Wechselwirkung mit dem Pro-Peptid beteiligt ist, trägt zur Interaktion von NGF mit den beiden Rezeptoren TrkA und p75NTR bei (Wiesmann et al., 1999; He & Garcia, 2004). So befinden sich beispielsweise im NGF-TrkA-Komplex sieben Aminosäuren des Rezeptors in der Nähe von 8 Å zum Trp²¹ (Abb. 7, Seite 56). Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass das Pro-Peptid mit den beiden Rezeptoren TrkA und p75NTR um die NGF-Bindungsstelle konkurriert. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die Gegenwart des Pro-Peptids die Affinität von NGF zu diesen Rezeptoren senkt (Nykjaer et al., 2004). Um eine Dissoziation des Pro-Peptids vom reifen Teil zu bewirken und eine Rezeptorbindung zu ermöglichen, muss ein Energiebetrag von 14,8 kJ/mol aufgebracht werden. Andererseits wäre es möglich, dass eine Dissoziation des Pro-Peptids für eine Rezeptorbindung nicht notwendig und eine Delokalisierung ausreichend ist, welche sich in einer Senkung der Affinität von ProNGF zum Rezeptor äußern würde. Der Energiebetrag für eine Delokalisierung ist abhängig von der Größe und der Überlappung der Kontaktfläche des Pro-Peptids und den Rezeptoren und wahrscheinlich energetisch begünstigt. Solange allerdings keine Strukturdaten auf atomarer Ebene von ProNGF mit den Rezeptoren zur Verfügung stehen, bleiben diese Interpretationen der Ergebnisse spekulativ.

3.4 Sortilin ist essentiell für den ProNGF induzierten neuronalen Zelltod

Nykjaer, A., Lee, R., Teng, K. K., Jansen, P., Madsen, P., Nielsen, M. S., Jacobsen, C., Kliemann, M., Schwarz, E., Willnow, T. E., Hempstead, B. L., and Petersen, C. M. (2004). Sortilin is essential for ProNGF-induced neuronal cell death. *Nature*, **427**:843-848.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Petersen konnte dazu beigetragen werden, neue Erkenntnisse über die Affinitäten von ProNGF und isoliertem NGF-Pro-Peptid im Vergleich zu NGF zu den beiden Rezeptoren TrkA und p75NTR zu gewinnen. Dabei konnte keine Affinität des isolierten Pro-Peptids zu den Rezeptoren TrkA und p75NTR und eine etwa 10-fach geringere Affinität des ProNGF zu den Rezeptoren als die von reifem NGF beobachtet werden. Darüber hinaus wurde ein weiterer Rezeptor, Sortilin, identifiziert, welcher spezifisch ProNGF über die Pro-Peptid-Domäne bindet. Der identifizierte Sortilin-Rezeptor aus der Familie der Vps10P-Domänen-Rezeptoren (Hermey et al., 2003) besitzt *in vitro* eine 10- bis 15-fach höhere Affinität zu ProNGF bzw. zum isolierten Pro-Peptid als zum reifen NGF (Abb. 1, Seite 59). Mittels *in vivo*-Experimenten wurde die spezifische Aufnahme von NGF in die Zellenlinie 293 über TrkA und p75NTR, nicht aber über den Sortilin-Rezeptor nachgewiesen. Im Gegensatz dazu erfolgt die Aufnahme von ProNGF über einen Komplex aus Sortilin und p75NTR (Abb. 2, Seite 60). Dieser Komplex scheint eine hoch affine Bindestelle für das Pro-Peptid zu bilden und essentiell für die Apoptoseinduktion durch ProNGF zu sein. Als Modell dieses Komplexes wurde eine Stöchiometrie von einem p75NTR-Molekül, einem Sortilin-Molekül und einem ProNGF-Dimer vorgeschlagen (Abb. 4H, Seite 61).