

Über Nervenwachstumsfaktoren, IX [1]

NGF aus menschlicher Glandula submandibularis

On the Nerve Growth Factor (NGF) from Human Glandula submandibularis

R. Riemschneider, F. Dembélé und I. A. K. Ghouri

Institut für Biochemie, Freie Universität Berlin und Chemisches Zentralinstitut der Bundesuniversität Santa Maria (UFSM), Brasilien

Z. Naturforsch. 37 c, 1045–1047 (1982); received March 5/June 14, 1982

Nerve growth factor, Glandula submandibularis, Human, Bovine, Swine

The properties of human nerve growth factor (NGF) from Glandula submandibularis were examined and characterized. The results closely resemble those of NGF from bovine and swine.

Tab. I. Kennzahlen von NGF-Präparaten.

E_{280}/E_{260}	1,3–1,5
λ_{\max}	279
λ_{\min}	254–255
spez. Drehung $[\alpha]_D^{25}$	
NGF Mensch	– 360 °C
Schwein	– 400 °C
Rind	– 350 °C
T_m -Werte °C	38–40 °C
Verhalten gegenüber	
Alkali	stabil
Säure	labil
Proteinasen	labil
Proteingehalt Gew.%	96–97
N-Gehalt Gew.%	15,5–15,6
Phosphat Gew.%	1,8–2,4
Kohlenhydrate Gew.%	0,1–0,2
Hexosamin Gew.%	unter 0,0002
Tyrosin Gew.%	0,44–0,47
Wachstumstest	
Aktivitätsbereich µg/ml	0,017–0,17

Im Rahmen unserer seit 1958 durchgeführten Untersuchungen über Nervenwachstumsfaktoren (NGF) aus menschlichen und tierischen Organen [1] – mit dem Ziel, zu möglichst reinen, medizinisch einsetzbaren Präparaten zu gelangen – konnten wir NGF aus menschlichen Speicheldrüsen isolieren und charakterisieren. Die für Säugetier-NGF (Schwein, Rind) ausgearbeiteten Gewinnungs- und Reinigungsmethoden (unveröffentlicht) erwiesen sich als hier übertragbar.

Unser Interesse an NGF gilt vor allem dem Einsatz von NGF zur Behandlung von Lähmungen – Untersuchungen, wie sie gemeinsam mit brasilianischen und japanischen Kollegen durchgeführt worden sind ([1], Mitt. VI): Bericht über klinische Erfolge an 35 Fällen (Facial paralysis; incurable polyneuritis; neuralgia and others; cerebro-vascular hypertensive and diabetic nervous system disorders).

Beim Vergleich unserer Präparate aus der Glandula submandibularis vom Menschen mit den entsprechenden Präparaten vom Schwein und Rind stellten wir relativ weitgehende Übereinstimmung der im folgenden aufgeführten Kennzahlen fest.

Zur Identifizierung, Isolierung und Reinigung von menschlichen NGF wurde seine wachstumsfördernde

Wirkung auf Nervenzellen in Gewebekultur nach der Methode von Levi-Montalcini [2] getestet: siehe Abb. 1.

Menschliche NGF-Präparate zeigten ausgesprochen kontinuierliche, wachstumsfördernde Aktivität auf embryonale Nervenzellen und bewirkten ihr Überleben und Erhalt im gesunden Zustand, wobei es notwendig ist, den richtigen Konzentrationsbereich von NGF einzustellen; die Anwesenheit von Glucose oder Mannose ist unerlässlich.

Der optimale Konzentrationsbereich für volle wachstumsfördernde Wirkung von unserem reinsten NGF-Protein (Mensch) liegt zwischen 0,017 bis 0,17 µg/ml. Unter 0,009 µg/ml (NGF-Mensch) erhielten wir andere Wachstumsformen.

Als weitere Kennzahlen wurden der Sedimentationskoeffizient und das damit verbundene Molekulargewicht des hochmolekularen NGFs (Mensch) ermittelt. Es weist 4,58 s auf, was einem Molekulargewicht von 175000 bis 225000 entspricht und über dem vom NGF (Rind und Maus) liegt. Die Niedermolekularformen α - und β -Komponente des NGFs (Mensch) haben ein Molgewicht von 13000 bis 16000 (α); 26000 bis 30000 (β) und stimmen mit denen von NGF (Rind [1] und Maus [3–6]) überein. Die γ -Komponente ist heterogen und besteht aus 5 Isomeren, die unterschiedliche Molgewichte aufweisen und höher als das der γ -Komponente des NGF-Proteins von Mäusen [5, 6] liegen.



Abb. 1. Versuchskultur mit NGF (Mensch) in einer Endkonzentration von $0,17\mu\text{g}/\text{ml}$. Die weiße Schichtung auf der Abbildung ist durch lange Lagerzeit entstanden, weil es durch Verzögerung getrocknet wurde.

Herstellung von NGF (Mensch)

Frische Glandula submandibularis bzw. parotis werden nach Entfernung der Fettgewebe und anderer Gewebearten zerkleinert, gemahlen und mit 2-prozentiger NaCl-Lösung bei pH 8,0 homogenisiert, 3 Std. lang unter Röhren im Kühlraum mit mehr 2-prozentiger NaCl-Lösung extrahiert und bei

5000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert und aufbewahrt. Der Niederschlag wird nochmals mit NaCl-Lösung im Kühlraum extrahiert und dann zentrifugiert. Die Extraktionslösungen werden differenzierten Salzfällungen unterworfen. Hierbei werden Schleimstoff und andere zuerst ausgefällt. Zu diesem Zweck wird festes Ammoniumsulfat bis zu einer Konz. von 24 Gew.%

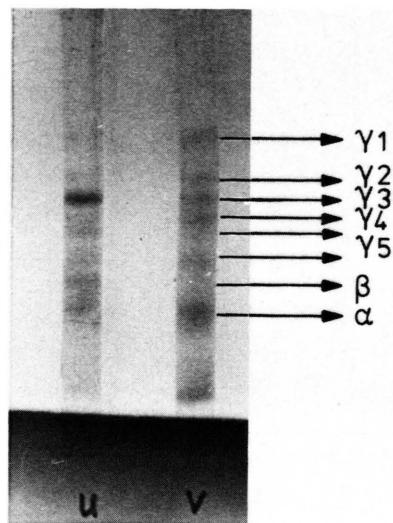


Abb. 2. Disk-Elektrophorese der NGF-Präparate Mensch (V) und Rind (U).

(50-prozentige Sättigung) hinzugefügt. Der pH-Wert muß stets wieder auf 4,0–4,5 eingestellt werden (bei NGF aus Schweinespeicheldrüsen ebenfalls, bei NGF aus Rinderspeicheldrüsen mit Ammoniak auf pH 7,0–7,5). Die Mischung wird unter Rühren bei 4 °C 30 min gehalten, dann bei 5000 U/min zentrifugiert. Die Niederschläge werden verworfen, die Überstände gesammelt und weiter verarbeitet.

Im Laufe der Isolierung und Reinigung werden bei jedem Schritt zur Identifizierung und Charakterisierung das UV-Spektrum aufgenommen E_{280}/E_{260} und im Gewebekultur-Test nach Levi-Montalcini die Aktivität der Nervenwachstumsfaktor-Fraktionen geprüft. Zu diesem Zweck werden jeweils 10 ml Probelösung entnommen.

Zur Ausfällung wirksamen NGF-Rohproduktes wird zu der so gewonnenen röthlich gefärbten Stammlösung weiteres festes Ammoniumsulfat bis zu einer 70-prozentigen Sättigung (33 Gew.-%) hinzugegeben – pH wiederum bei 4,0–4,5, mit HCl nachgestellt. Alle Operationen bei 4 °C. Nach weiteren 30 min unter Rühren wird bei 10 000 U/min abzentrifugiert. Nach Durchführung der Identifizierungs- und Charakterisierungsversuche werden die Überstände verworfen oder erneut bearbeitet. Die überwiegend aus aktivem Material bestehenden Niederschläge, die einen E_{280}/E_{260} -Wert von 1,1 zeigen, werden für die weiteren Reinigungsschritte verwendet.

Eine wäßrige Suspension der Niederschläge (ca. 1:50 bis 1:100) wird homogenisiert und gegen bidest. Wasser dialysiert und dann bei 20 000 U/min zentrifugiert. Die Niederschläge werden auf NGF-Aktivität mittels UV und Gewebekultur-Test untersucht und je nach Resultat verworfen oder weiterbearbeitet. Die erhaltenen wasserklaren Lösungen werden mehrmals, je nach Reinigungsgrad, dialysiert und zentrifugiert. Die so erhaltenen überwiegend aus aktivem Protein bestehenden Überstände weisen eine E_{280}/E_{260} -Wert von 1,3–1,40 auf. Durch weitere Reinigung, vor allem Acetonfällung wurde ein NGF-Präparat mit dem Wert 1,53 erhalten.

Bei der SDS-Disk-Elektrophorese ermittelten wir 3 Hauptfraktionen (alpha, beta und gamma) und weitere gamma-Untereinheiten gemäß Abb. 2 und Tabelle. – Aktivitätsbereich wie in Tabelle und Text angegeben.

- [1] Mitt. I, R. Riemschneider, T. Leung, H. M. Yue und W. F. Lo, Patentanmeldung ab 1964;
- Mitt. II und III, „NGF-Proteine – Isolierung und Identifizierung“ und „Über die Isolierung von NGF-Protein aus Speicheldrüsen von Großtieren“ Manuskripte 93 Seiten (engl. Fassung) – Vorträge vom 7. 8. 1972 und 22. 8. 1973 an der UFSM in S. Maria, RS, Brasilien;
- Mitt. IV, mit W. H. Chik, unveröffentlichte Ergebnisse 1975–1978;
- Mitt. V, 2. Forschungsbericht 1975/6 FU, S. 454 unter Nr. 21.06.002 „Untersuchungen über NGF“;
- Mitt. VI, mit M. C. da Rocha, W. H. Chik, J. T. Shimazawa und S. Sato, „Medical Report of NGF, clinical experience, 35 cases“ bis Nov. 1978.
- Mitt. VIII, NGF aus Rinderplazenten, 1978 (unveröffentlicht).

- [2] R. Levi-Montalcini, H. Meyer und V. Hamburger, *Cancer Res.* **14**, 49 (1954).
- [3] S. Cohen, *J. Biol. Chem.* **234**, 445 (1959); *Proc. Nat. Acad. Sci USA* **46**, 302 (1960).
- [4] V. Bocchini und P. U. Angeletti, *Proc. Nat. Acad. Sci USA* **35**, 787 (1969).
- [5] S. Varon, J. Nomura und E. M. Shooter, *Biochemistry* **6**, 2202 (1967).
- [6] S. Varon, J. Nomura, J. R. Perez-Polo und E. M. Shooter, *Methods Neurochem.* **3**, 777, (1972).