

Étude du facteur de croissance du nerf β (β -NGF)

La structure IV du NGF (« *high molecular weight 7S NGF complex* ») est constituée de 3 types de sous-unités
=> le NGF est le complexe : $[\alpha\text{-NGF}]_2 - [\gamma\text{-NGF}]_2 - [\beta\text{-NGF}]_2$

sous-unité	type	activité
α -NGF	protéases à sérine de la famille des kallikréines	hydrolyse le précurseur β -NGF en β -NGF mature
γ -NGF		inhibe l'activité de la sous-unité α -NGF
précurseur β -NGF	-----	
β -NGF mature	homodimère (paire de feuillets β antiparallèles enroulés) avec 3 ponts disulfures et 2 atomes de zinc	médiateur des fonctions biologiques du NGF

Le β -NGF est donc formé par hydrolyse du précurseur β -NGF par la sous-unité α -NGF .

Dans cet exercice, on étudie les caractéristiques du β -NGF .

Marquage à la ^{35}S -cystéine - technique de poussée-chasse

^{35}S est un radioélément utilisé pour marquer les protéines au cours de leur métabolisme. En effet on obtient de la ^{35}S -cystéine avec une activité spécifique élevée.

Cette méthode permet d'étudier la synthèse protéique *in vivo*.

Les molécules du précurseur qui n'entrent pas immédiatement dans le métabolisme étudié restent dans le système et masquent le comportement de celles qui y sont entrées les premières.

Pour contourner ce problème on emploie la technique de poussée-chasse (« pulse-chase ») :

- Après une poussée rapide du précurseur radioactif, on envoie dans le système des quantités massives du précurseur non radioactif (froid) : cela dilue énormément les quantités résiduelles de précurseur radioactif non métabolisé.
- Seuls sont marqués les produits synthétisés durant la poussée et on peut les suivre sans le bruit de fond dû aux métabolites synthétisés après la poussée.

Marquage à la ^{35}S -cystéine, technique de poussée-chasse

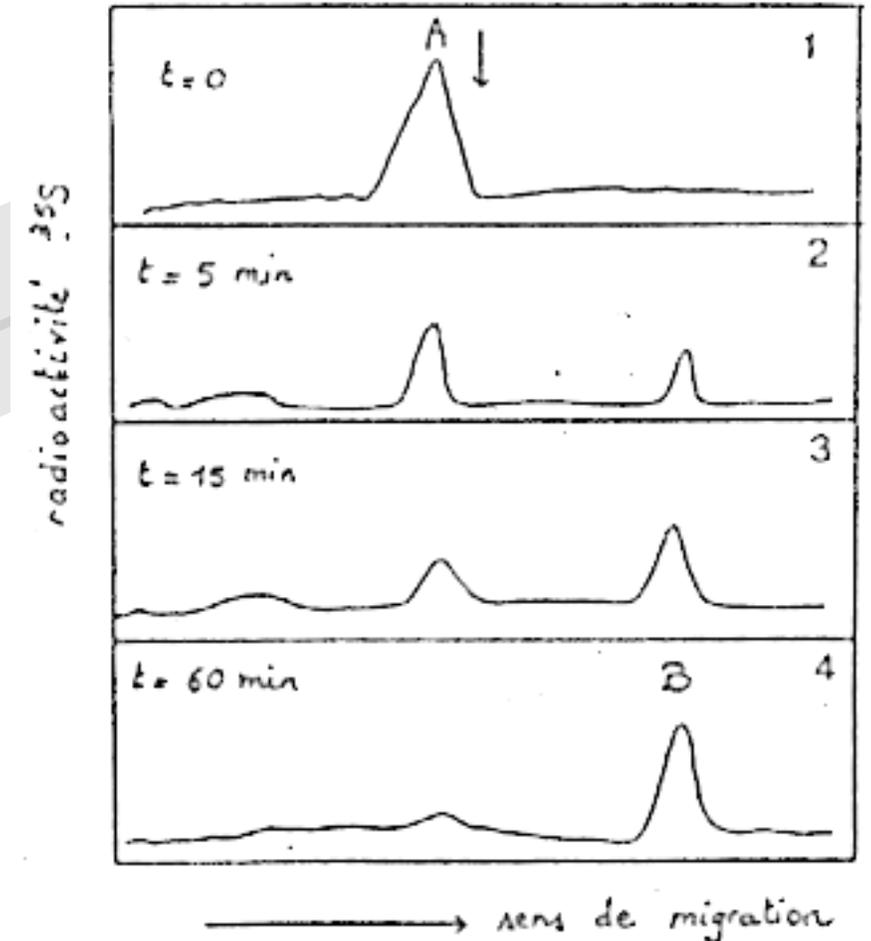
On incube des coupes de glandes sous-maxillaires en présence de ^{35}S -cystéine pendant 1 heure.

Puis on ajoute un excès de cystéine froide (non radioactive) pendant un temps variable (technique de poussée-chasse ou "pulse-chase") :

- 1. cystéine pendant l'extraction des protéines ($t = 0$)
- 2. cystéine pendant 5 min
- 3. cystéine pendant 15 min
- 4. cystéine pendant 60 min

Les protéines solubles des coupes de glandes sous-maxillaires sont extraites et déposées sur un gel d'affinité : anticorps anti-NGF immobilisés sur des billes d'agarose.

Les protéines retenues sur le gel sont analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturante (SDS-PAGE) : les profils ci-contre montrent l'évolution de la radioactivité à divers temps suivant la chasse par la cystéine froide.



Flèche (figure 1) = position de la chaîne catalytique de l'ATCase (MM 34000 Da).

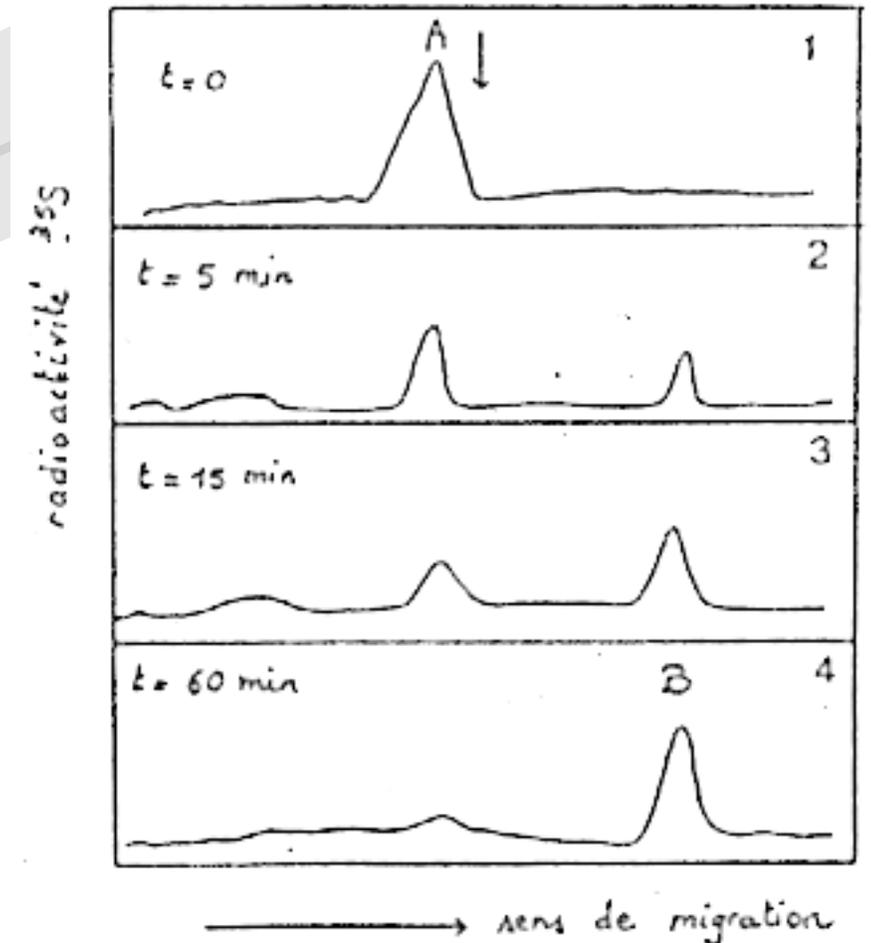
Marquage à la ^{35}S -cystéine, technique de poussée-chasse

Chromatographie d'affinité : des anticorps anti-NGF sont immobilisés sur des billes d'agarose. Les produits retenus sur ce gel puis analysés par SDS-PAGE (pics A et B) sont donc le NGF (ou des sous-unités du NGF).

Les profils d'élution mettent en évidence 2 espèces moléculaires :

- L'espèce contenue dans le pic A est présente dès l'extraction. Sa masse molaire est supérieure à 34000 Da puisqu'elle migre moins loin que l'ATCase.
- L'espèce contenue dans le pic B, de masse molaire très inférieure à 34000 Da, est néo-synthétisée au détriment de l'espèce A, puisque l'espèce A disparaît au fur et à mesure que l'espèce B apparaît.

Hypothèse : la molécule B est une forme mature de la molécule A.
En d'autres termes, A est une forme précurseur de B.



Réponse partie B

Masse molaire

Les conditions dénaturantes dissocient les sous-unités d'un oligomère :

- conditions non dénaturantes : **oligomère β -NGF = 24000 Da**
- conditions dénaturantes : sous-unités β -NGF = 12000 Da

=> Le β -NGF est un **dimère**.

Réaction avec le chlorure de dansyle (DNS)

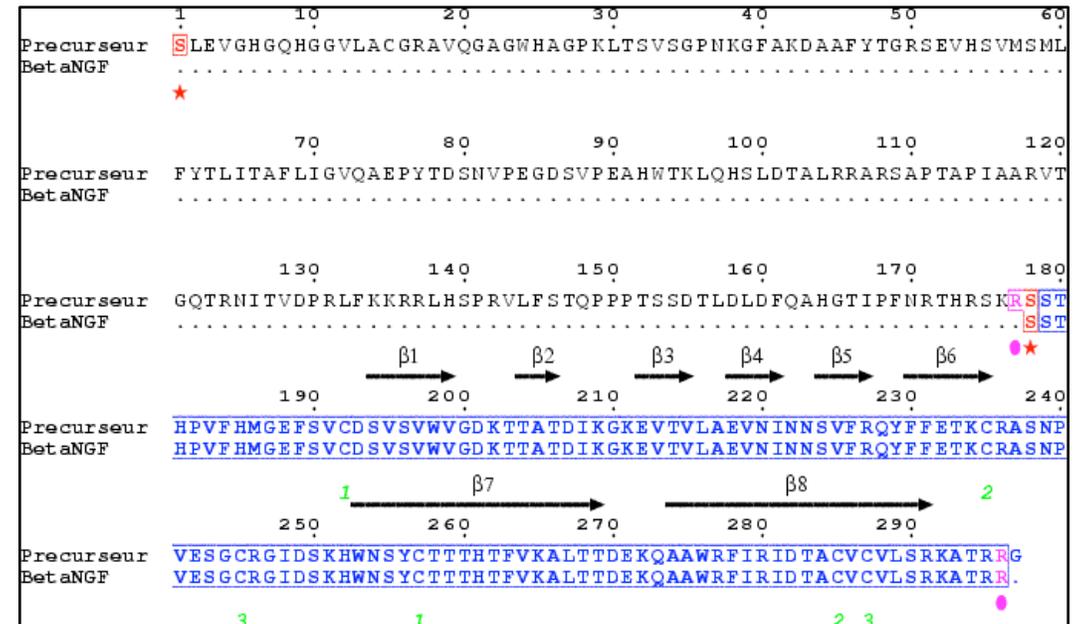
Quantité de β -NGF et de DNS-Ser :

- 25 μ g β -NGF => $(25 \cdot 10^{-6} \text{ g} / 24 \cdot 10^3 \text{ g.mol}^{-1}) = 1 \cdot 10^{-9} \text{ mole} = 1 \text{ nmole}$ β -NGF
- 2 nmoles de DNS-Ser formées par nmole de β -NGF \Leftrightarrow 1 nmole de DNS-Ser formée par sous-unité β -NGF

=> L'acide aminé en position N-terminale de chaque sous-unité β -NGF est une **sérine**.

Réaction avec la carboxypeptidase Y

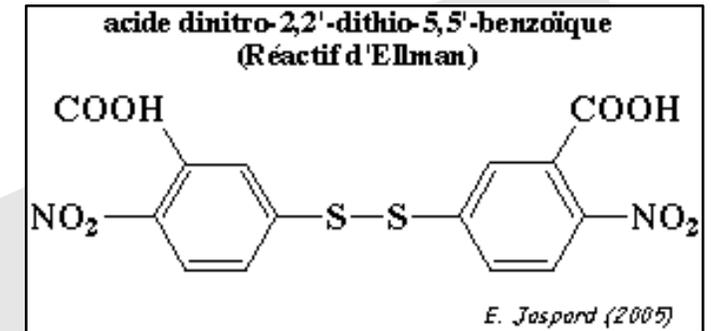
L'alignement indique que l'acide aminé à caractère basique en position C-terminale d'une sous-unité β -NGF est une **arginine**.



Réponse partie B

Le **réactif d'Ellman** (acide dinitro-2,2'-dithio-5,5'-benzoïque - DNTB) réagit avec les **cystéines libres** (groupements -SH).

Le β -NGF ne réagit avec le DNTB qu'après réduction => **toutes les Cys sont initialement impliquées dans un pont disulfure.**



Le **chromophore** (molécule qui absorbe à 412 nm) formé est la **DNTB-Cys**.

- La réaction de 0,125 mg/mL de β -NGF avec le DNTB (après réduction) donne $A_{412} = 0,816$
- Le coefficient d'extinction molaire du chromophore formé est $\epsilon_M = 13600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

Nombre de cystéines

- a. La masse molaire du β -NGF = 24.000 Da = 24000 g/mol (résultat précédent).
- b. $[\beta\text{-NGF}] = 0,125 \text{ mg/mL} = 0,125 \text{ g/L} \Rightarrow [\beta\text{-NGF}] = [(0,125 \text{ g/L}) / (24000 \text{ g/mol})] = 5,2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
- c. $[\text{DNTB-Cys}] = (0,816 / 13600) = 60 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
- d. Nombre de DNTB-Cys = $(60 \cdot 10^{-6} / 5,2 \cdot 10^{-6}) = 12 \text{ Cys}$

Conclusions

- Le β -NGF est un dimère (2 sous-unités de 12.000 Da).
 - Il y a 12 Cys => 6 Cys par sous-unité
- => Il y a 3 ponts disulfure intra-chaînes ou 6 ponts disulfure inter-chaînes ou autre combinaison [intra + inter].

Réponse partie B

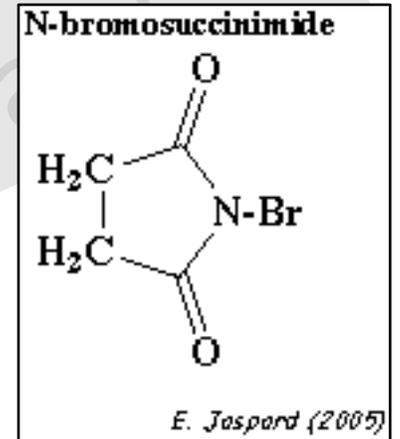
Le **N-bromo-succinimide** (NBS) hydrolyse les protéines en réagissant avec les résidus **W**, **Y** et **H**.

A 280 nm, c'est la disparition du tryptophane que l'on suit.

- La réaction de 1,25 mg/mL de β -NGF avec le NBS donne : $\Delta A_{412} = (2 - 0,8) = 1,2$
- Le coefficient d'extinction molaire des tryptophane modifiés est : $\epsilon_M = 4000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

Nombre de tryptophanes

- a. La masse molaire du β -NGF est 24.000 Da = 24000 g/mol.
- b. $[\beta\text{-NGF}] = 1,25 \text{ mg/mL} = 1,25 \text{ g/L} \Rightarrow [\beta\text{-NGF}] = (1,25 \text{ g/L} / 24000 \text{ g/mol}) = 5,2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
- c. $\Delta[\text{Trp}] = (0,8 / 4000) = 3 \cdot 10^{-4} \text{ M}$
- d. Nombre de résidus W modifiés = $(3 \cdot 10^{-4} / 5,2 \cdot 10^{-5}) = 6$



Conclusions

\Rightarrow Il y a 3 W par sous-unité β -NGF.

