
1. Einleitung

1.1. Die Alzheimer Krankheit

Die Alzheimer Krankheit ist die häufigste Form der Demenzerkrankungen. Sie beginnt beispielsweise mit Wortfindungsstörungen und schreitet bis zum Verlust des Gedächtnisses und des Denkvermögens fort. Diese Erkrankung wurde nach Alois Alzheimer (1864–1915) benannt, der 1906 das Krankheitsbild der Patientin Auguste Deter auf der 37. Versammlung Südwestdeutscher Irrenärzte in Tübingen beschrieb (Alzheimer, 1907). Der Deutschen Alzheimer Gesellschaft zufolge gibt es gegenwärtig etwa eine Millionen Demenzkranke in Deutschland, wovon etwa 800.000 an der Alzheimer Krankheit leiden (Stand 2005). Das größte Erkrankungsrisiko stellt dabei das Altern dar, denn je älter ein Mensch ist, desto höher ist das Risiko, an Morbus Alzheimer zu erkranken. Etwa 98%, also die große Mehrheit der betroffenen Personen, erkrankt zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr. Hier spricht man von der sporadischen Alzheimer Krankheit. Neben dieser Patientengruppe werden etwa 2% der Erkrankungen durch genetische Mutationen verursacht, welche autosomal dominant weitervererbt werden können. Dies sind die familiären Alzheimer Fälle („familial Alzheimer’s disease“, FAD). Im Unterschied zu den sporadischen Alzheimer Erkrankungen treten sie meist in einem frühen Lebensalter von 30 bis 50 Jahren auf.

Alois Alzheimer fand in Gehirnschnitten der Patientin Auguste Deter zwei verschiedene Formen von neuropathologischen Ablagerungen: Er beschrieb extrazelluläre amyloide Plaques sowie intrazelluläre Neurofibrillen (Alzheimer, 1907). Heute weiß man, dass die amyloiden Plaques spezifisch für das Krankheitsbild der Alzheimer Krankheit sind und hauptsächlich aus so genannten Amyloid- β (A β)-Peptiden bestehen (Glenner and Wong, 1984; Masters et al., 1985). Die amyloiden Ablagerungen treten nur in bestimmten Regionen des Gehirns auf, z.B. dem Cortex, dem Hippokampus, der Amygdala und dem basalen Vorderhirn (Sisodia, 1999). Für den Gedächtnisverlust ist letztlich eine neuronale Degeneration in den betroffenen Regionen verantwortlich, die vermutlich einsetzt, lange bevor die Ablagerungen sichtbar werden (Klein et al., 2001). Die Neurofibrillen hingegen sind keine typischen Anzeichen der Alzheimer Krankheit, da diese Fibrillen auch bei anderen Demenzerkrankungen auftreten, beispielsweise bei frontotemporalen Demenzen (FTD) (Goedert and Spillantini, 2006). Neurofibrillen bestehen aus dem Mikrotubuli-assoziierten Protein Tau, das im hyperphosphorylierten Zustand zur Aggregation neigt (Goedert and

Spillantini, 2006).

Mittels psychologischer Tests wird gegenwärtig versucht, die Alzheimer Krankheit zu diagnostizieren. Bei diesen Tests ist es jedoch schwierig, die Alzheimer Krankheit von anderen Demenzerkrankungen zu unterscheiden. Eine spezifische Diagnostik steht nicht zur Verfügung. Therapeutisch kann derzeit nur symptomatisch gegen die Alzheimer Krankheit vorgegangen werden, eine ursächliche Behandlung ist nicht möglich.

1.2. Die Molekularbiologie der Alzheimer Krankheit

1.2.1. Molekulare Ursachen der Alzheimer Krankheit

Lösliche Aggregate der A β -Peptide werden heute als die zentrale molekulare Ursache sowohl sporadischer als auch familiärer Alzheimer Erkrankungen angesehen (Beyreuther et al., 1996; Bush et al., 1992; Masters and Beyreuther, 1989; Walsh et al., 2002). A β -Peptide werden von zwei Sekretasen proteolytisch aus einem Vorläuferprotein, dem Amyloid-Vorläuferprotein („amyloid precursor protein“, APP), herausgeschnitten (Annaert and De Strooper, 2002; Goldgaber et al., 1987; Kang et al., 1987; Robakis et al., 1987). Die Prozessierung von APP durch die Sekretasen führt zur Entstehung heterogener A β -Peptide mit variierender Länge von 34 bis 42 Aminosäuren (Abb. 1). Dabei werden hauptsächlich A β -Peptide mit einer Länge von 40 Aminosäuren (A β 40, zu 90%) und mit einer Länge von 42 Aminosäuren (A β 42, zu 5–10%) gebildet (Dovey et al., 1993; Suzuki et al., 1994; Younkin, 1998). Obwohl A β 42 nur zwei Aminosäuren länger ist als A β 40, gilt A β 42 als das zentrale Schlüsselmolekül der Alzheimer Krankheit: A β 42 ist neurotoxisch, es initiiert die Bildung amyloider Plaques und ist sowohl in Gehirnen von Patienten mit familiärer als auch sporadischer Erkrankung in erhöhter Konzentration nachweisbar (Borchelt et al., 1996; Pike et al., 1995; Younkin, 1998).

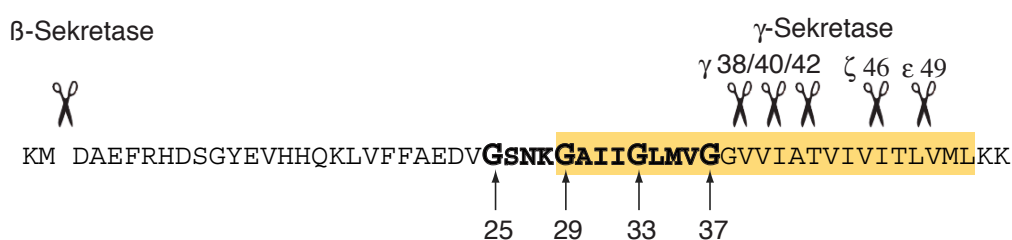


Abb. 1: Sequenz des A β -Peptids mit Schnittstellen. N- und C-Termini von A β werden durch die Prozessierung der β - und γ -Sekretasen bestimmt (Scheren). Die γ -Sekretase generiert A β -Peptide mit heterogenen C-Termini. Längere A β -Formen wie A β 49 und A β 46 werden durch den ϵ - oder ζ -Schnitt produziert. Kürzere A β -Formen wie A β 42, A β 40 und A β 38 entstehen durch γ -Schnitte. Gelbe Box: Plasmamembran. Fett gedruckt: konsekutive GxxxG-Motive, die Glycinreste sind nach der A β -Nummerierung bezeichnet.

Die zentrale Rolle von A β 42 wird durch genetische Untersuchungen familiärer Alzheimer Erkrankungen untermauert. Bei verschiedenen FAD-Fällen konnten Mutationen im APP nachgewiesen werden, die zu einer verstärkten Entstehung von A β 42 führen (St George-Hyslop, 2000). Die erste beschriebene FAD-Mutation im APP ist der Aminosäureaustausch E693Q, der auch als „Dutch Mutation“ bezeichnet wird (Levy et al., 1990). Durch genetische Analysen wurden zwei weitere Gene identifiziert, die bei familiären Alzheimer-Fällen ebenfalls Mutationen aufweisen. Diese Gene kodieren das Presenilin 1 (PS-1) und das Presenilin 2 (PS-2) (Levy-Lahad et al., 1995; Sherrington et al., 1995). PS-1 und PS-2 sind Komponenten der so genannten γ -Sekretase, die das APP prozessiert (Edbauer et al., 2003). Derzeit sind etwa 25 FAD-verursachende Mutationen im APP und etwa 150 Mutationen im PS-1 bekannt, die alle zu einem erhöhten Spiegel an A β 42 führen (Kaether et al., 2006a).

Bei den weitaus häufigeren sporadischen Erkrankungen sind die genauen molekularen Mechanismen, die zur verstärkten Bildung von A β 42 führen, unbekannt. Jedoch konnten einige Risikofaktoren eingegrenzt werden: Ein Teil der sporadischen Erkrankungen kann auf das ϵ 4-Allel des Apolipoproteins E (ApoE ϵ 4) zurückgeführt werden (Poirier et al., 1993; St George-Hyslop, 2000). Träger dieses Allels zeigen eine deutlich höhere Anfälligkeit, an Morbus Alzheimer zu erkranken. Darüber hinaus werden auch verschiedene Umweltfaktoren wie beispielsweise die Ernährung, ein geringer Bildungsstand und eine geringe, geistige Aktivität als Risikofaktoren diskutiert. Es gibt Hinweise, dass ein ernährungsbedingter Kupfer-Mangel im Gehirn die Entstehung der pathologischen Merkmale von Alzheimer begünstigt (Bayer et al., 2003; Borchardt et al., 1999). Hingegen scheint eine stete, geistige Aktivität das Erkrankungsrisiko zu senken (Wilson et al., 2002).

1.2.2. Charakterisierung und Funktion des APP

APP gehört zu einer Genfamilie mit drei bekannten Mitgliedern. Es gibt es zwei *APP*-ähnliche Gene, welche die Amyloid-Vorläufer-ähnlichen Proteine 1 und 2 kodieren („amyloid precursor-like proteins“, APLP1 und APLP2) (Coulson et al., 2000). *APP*, APLP1 und APLP2 sind integrale Typ I-Transmembranproteine, bei denen die Ektodomäne mit etwa 500 Aminosäuren den größten Teil des Proteins umfasst und der intrazelluläre C-terminale Bereich mit etwa 50 Aminosäuren relativ klein ist. Über den konstitutiv sekretorischen Weg gelangt *APP* zur Plasmamembran der Zelle (Weidemann et al., 1989). *APP* wird ubiquitär

in verschiedenen Geweben exprimiert, wobei in Hirn, Niere, Herz und Milz die höchste Genexpression nachgewiesen wurde (Tanzi et al., 1988). Durch alternatives Spleißen der Exons 2, 7, 8 und 15 können 9 Isoformen des APP entstehen (Tang et al., 2003). Die im Gehirn exprimierten Formen sind APP695, APP751 und APP770, benannt nach der Anzahl der Aminosäuren der Genprodukte, wobei APP695 ausschließlich von Neuronen exprimiert wird (Kitaguchi et al., 1988; Menendez-Gonzalez et al., 2005). Die Ektodomänen der längeren Formen APP751 und APP770 enthalten zusätzliche 56 Aminosäurereste, die zu einer Kunitz-Protease-Inhibitor Sequenz gehören (Kitaguchi et al., 1988).

Die zentrale Funktion von APP ist noch nicht endgültig aufgeklärt. Es deuten die vielfachen Interaktionen von APP mit Molekülen der extrazellulären Matrix auf eine Rolle von APP bei der Zelladhäsion hin (Multhaup, 1994). Sowohl die sekretierte Ektodomäne von APP („soluble APP“, sAPP) als auch membranständiges APP unterstützen das Neuritenwachstum und die Zelladhäsion, was zusätzlich auf eine mögliche Rezeptorfunktion hindeutet (Qiu et al., 1995; Saitoh et al., 1989; Schubert et al., 1989). Die Ektodomäne von APP695 enthält mehrere, verschiedene Interaktionsstellen, die in Abbildung 2 dargestellt sind. Dies sind zwei Heparin-bindende Regionen (Aminosäuren 96–110 mit niedriger Affinität, 316–337 mit hoher Affinität; im Folgenden orientieren sich Nummerierungen an APP695), eine Kollagen-bindende Region (Aminosäuren 448–465), eine Zink-bindende Region (Aminosäuren 181–188) sowie eine Kupfer-bindende Region (Aminosäuren 137–151) (Beher et al., 1996; Bush et al., 1993; Multhaup, 1994; Multhaup et al., 1996; Schubert et al., 1989; Small et al., 1994). In der Aβ-Sequenz 602–610 kann ebenfalls ein Kupfer- oder Zinkion gebunden werden (Curtain et al., 2001). Zusätzlich wird APP N- und O-glykosyliert sowie sulfatiert und phosphoryliert (Buxbaum et al., 1990; Walter et al., 1997; Weidemann et al., 1989). Die verschiedenen Bindungsstellen können sich gegenseitig beeinflussen, was z.B. für die kompetitive Bindung von APP, Zink und Heparin an die Kollagen-bindende Region gezeigt werden konnte (Beher et al., 1996).

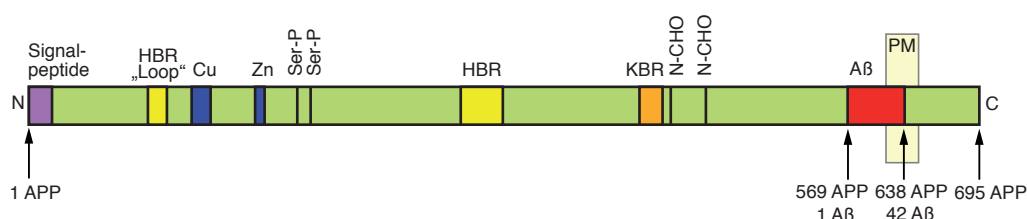


Abb. 2: Schematische Darstellung des Aufbaus von APP695. Die Pfeile zeigen sowohl die APP-Nummerierung als auch die Aβ-Nummerierung an. Violett: Signalpeptid. Gelb: Heparin-bindende Region (HBR), die erste HBR überlappt mit der „Loop“-Region („Loop“). Blau: Kupfer- (Cu) bzw. Zink- (Zn) bindenden Regionen. Orange: Kollagen-bindende Region (KBR). Rot: Aβ-Peptid Sequenz. Die Serinreste S198 und S206 werden phosphoryliert (Ser-P), die Asparaginreste N467 und N496 werden N-glykosidisch modifiziert (N-CHO). PM: Plasmamembran, N: N-Terminus, C: C-Terminus.

Eine wichtige Eigenschaft des APP ist die Ausbildung von Homodimeren. Die Homodimerisierung wird vermutlich hauptsächlich über die erste Heparin-bindende Region, die auch die so genannte „Loop“-Region enthält (persönliche Mitteilung D. Kaden und G. Multhaupt), und die Kollagen-bindende Region vermittelt (Beher et al., 1996; Scheuermann et al., 2001). Die exponierte „Loop“-Region wird als Teil der Heparin-bindenden Region von einer intramolekularen Disulfidbrücke der Cysteine 98 und 105 gebildet und enthält positiv geladene Aminosäuren, die die Bindung an Heparin vermitteln (Rossjohn et al., 1999; Wang and Ha, 2004). Mäuse mit einer Inaktivierung des *APP*-Gens zeigen einen unerwartet wenig auffälligen Phänotyp, sind lebensfähig und fertil (Li et al., 1996; Zheng et al., 1995). Wahrscheinlich wird in diesen Mäusen die Funktion von APP durch APLP2 kompensiert (Anliker and Muller, 2006).

1.2.3. Die Prozessierung des APP und Entstehung von A β -Peptiden

Die APP-Prozessierung kann, wie in Abbildung 3 dargestellt, entweder über den amyloidogenen Weg oder nicht-amyloidogenen Weg erfolgen. In der amyloidogenen Prozessierung spaltet die β -Sekretase oder auch „ β -site APP cleaving enzyme“ (BACE) die Ektodomäne des APP zwischen den Aminosäuren M596 und D597 ab, ein Prozess, der auch als „ectodomain shedding“ bezeichnet wird (Vassar et al., 1999). Die nun lösliche APP-Ektodomäne (sAPP β) wird in den Extrazellularraum bzw. den Zellkulturüberstand abgegeben, während das membranständige APP-C-terminale Fragment (APP-CTF, speziell β -CTF) in der Membran verankert bleibt (Annaert and De Strooper, 2002). Erst wenn die Ektodomäne entfernt ist, erkennt die γ -Sekretase ihr Substrat β -CTF und kann dieses innerhalb der Transmembransequenz spalten (Struhl and Adachi, 2000). Diese Spaltung generiert das A β -Peptid sowie die APP-intrazelluläre Domäne („APP intracellular C-terminal domain“, AICD) (Gao and Pimplikar, 2001; Haass et al., 1992). Da A β das zentrale Molekül in der Entstehung der Alzheimer Krankheit ist, werden die Aminosäuren dieses Peptids gesondert nummeriert, wobei die Aminosäureposition 1 durch den Schnitt der β -Sekretase erzeugt wird und die γ -Sekretase die Länge der Peptide bestimmt (Abb. 2). Das A β -Peptid wird in den Extrazellularraum abgegeben und kann beispielsweise im Zellkulturüberstand detektiert werden (Haass et al., 1992). Es kann jedoch auch intrazellulär nachgewiesen werden, wobei noch nicht geklärt ist, ob das intrazelluläre A β dort gebildet wird oder von außen wieder in die Zelle gelangt (Walsh et al., 2000; Wertkin et al., 1993). Die AICD gelangt vermutlich im Komplex mit dem Adapterprotein Fe65 und der Histon-Acetyltransferase

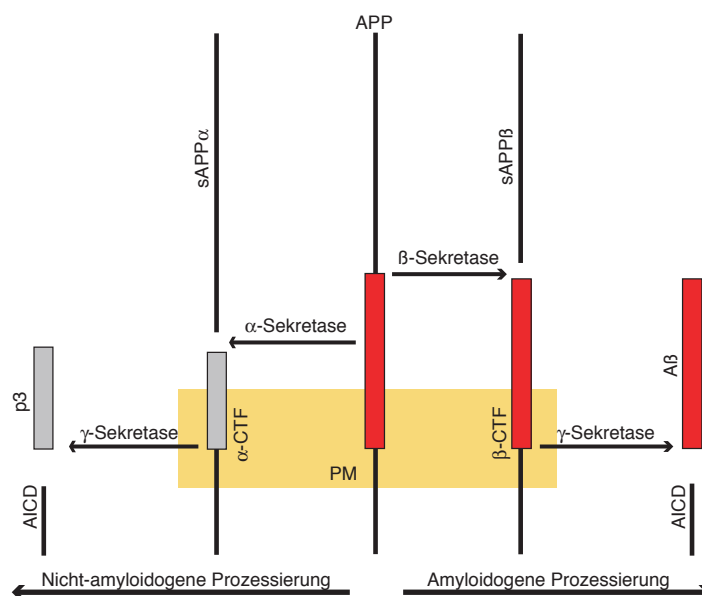


Abb.3: Schematische Darstellung der Prozessierung von APP. Die amyloidogenen Prozessierung beginnt mit der β -Sekretase, die APP in die lösliche Ektodomäne (sAPP β) und das membranverankerte C-terminale Fragment (β -CTF) spaltet. β -CTF wird von der γ -Sekretase geschnitten, worauf A β (rot) sowie AICD aus der Membran entlassen werden. Die nicht-amyloidogene Prozessierung beginnt mit dem Schnitt der α -Sekretase. Es entstehen lösliches sAPP α und membranverankertes α -CTF. α -CTF wird ebenfalls von der γ -Sekretase geschnitten, wodurch das Peptid p3 (grau) sowie AICD entstehen. sAPP: „soluble APP“; AICD: „APP intracellular C-terminal domain“; PM: Plasmamembran.

Tip60 in den Zellkern und kann dort die Transkription eines Reportergens aktivieren (Cao and Sudhof, 2004).

In der nicht-amyloidogenen Prozessierung wird die Entstehung von A β durch die Spaltung der α -Sekretase verhindert, die innerhalb der A β -Region schneidet und diese damit verkürzt (Abb. 3) (Annaert and De Strooper, 2002; Esch et al., 1990). Die zweite Spaltung erfolgt wieder durch die γ -Sekretase (Annaert and De Strooper, 2002). Das entstehende Peptid wird nach seinem Molekulargewicht von 3 kDa p3 genannt (Haass et al., 1993).

Etwa zwei Drittel des gesamten APP werden über den nicht-amyloidogenen Weg abgebaut (Selkoe, 2004). Die Regulation zwischen der amyloidogenen und nicht-amyloidogenen Prozessierung wird vermutlich über die intrazelluläre Lokalisation von APP und den beschriebenen Sekretasen gesteuert. Die α -Sekretase-Aktivität geht von zwei verschiedenen Proteasen aus, die der Familie der „A disintegrin and metalloproteases“, ADAM10 und ADAM17, angehören (Lammich et al., 1999). ADAM17 ist auch bekannt als „Tumor necrosis factor-converting enzyme“ (TACE) (Slack et al., 2001). ADAM10 und ADAM17 sind Typ I-Transmembranproteine und in der Plasmamembran der Zelle lokalisiert. Die β -Sekretase ist eine Aspartatprotease, die ungewöhnlicherweise als ein Typ I-Transmembranprotein in der Membran verankert ist (Vassar et al., 1999). Die β -Sekretase lagert sich zu Dimeren zusammen und ist in der Plasmamembran in „lipid rafts“ angereichert nachzuweisen (Cordy

et al., 2003; Eehalt et al., 2003; Marlow et al., 2003; Schmechel et al., 2004; Westmeyer et al., 2004). Ein kleinerer Anteil des Gesamtproteins von APP (weniger als 10%) ist in der Plasmamembran ebenfalls in „lipid rafts“ lokalisiert (Marlow et al., 2003). Eine Verlagerung der APP-Lokalisation in der Plasmamembran könnte demnach entscheiden, ob die amyloidogene oder nicht-amyloidogene Prozessierung stattfindet.

1.2.4. A β 42 und die Amyloid-Hypothese

Amyloide Plaques bestehen aus A β -Peptiden, die in einer β -Faltblattstruktur vorliegen (Pike et al., 1995). Der Kern der Plaques wird hauptsächlich von A β 42 gebildet (Borchelt et al., 1996; Younkin, 1998). Da die terminalen Aminosäuren der A β -Peptide aus der APP-Transmembransequenz stammen, sind die letzten 12 Aminosäuren von A β 40 bzw. die letzten 14 Aminosäuren von A β 42 überwiegend hydrophob. Verlassen die A β -Peptide nach der Prozessierung die hydrophobe Umgebung der Membran führt dies zu einer schnellen Umfaltung von einer α -helikalen Struktur in eine β -Faltblattstruktur, die die Aggregation der A β -Peptide unterstützt (Schmechel et al., 2003; Xu et al., 2005). Die längeren A β 42-Peptide neigen aufgrund des größeren hydrophoben Aminosäureanteils stärker zur Aggregation als die kürzeren A β 40-Peptide (Jarrett and Lansbury, 1993; Snyder et al., 1994). Daher wurde lange angenommen, dass A β 42 aufgrund seiner Plaque-bildenden Eigenschaften die Alzheimer Krankheit auslöst.

Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass sich A β -Peptide schnell zu höheren, löslichen Oligomeren, die „amyloid-derived diffusible ligands“ (ADDLs), zusammenlagern (Lambert et al., 1998). Dabei bildet A β 42 schneller stabilere Oligomere als A β 40 (Levine, 1995; Snyder et al., 1994). Diese Oligomere, nicht jedoch Monomere oder Fibrillen, wirken bereits in niedrigen Konzentrationen neurotoxisch und verhindern die Reizweiterleitung der Neuronen (Walsh et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass diese Oligomere bereits vor der Bildung der Plaques auftreten (Hsia et al., 1999; Mucke et al., 2000). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass A β auch intrazellulär nachzuweisen ist, noch bevor extrazelluläre Plaques entstehen (Oakley et al., 2006; Wertkin et al., 1993). Möglicherweise bilden sich auch intrazelluläre Oligomere, die ebenfalls neurotoxisch wirken (Walsh et al., 2000). Diese Befunde führten zu einer Modifikation der bestehenden Amyloid-Hypothese: Es wird nun davon ausgegangen, dass bereits die Aggregation der A β -Peptide zu löslichen Oligomeren der entscheidende Schritt ist, der zur neuronalen Degeneration führt. Diese Hypothese wird

unterstützt von Untersuchungen, die zeigen konnten, dass eine Korrelation zwischen der Menge an löslichem A β und dem Grad der Demenz besteht (Lue et al., 1999; McLean et al., 1999). Demnach wäre die Aggregation von A β zu unlöslichen Fibrillen und den amyloiden Plaques von Vorteil, denn dadurch würde die Konzentration von toxischen A β -Oligomeren niedrig gehalten werden.

Aufgrund welcher Prozesse die Oligomere zur Degeneration der Neuronen führen, ist unklar. Diskutiert werden verschiedene Mechanismen, die zu Zellschädigungen führen, wie beispielsweise die Inaktivierung der NMDA-Rezeptoren oder auch eine Porenbildung durch Oligomere und daraus folgenden unregulierten Kalzium-Einstrom mit anschließendem Zelltod (Arispe et al., 1993; Kamenetz et al., 2003; Snyder et al., 2005).

1.2.5. Charakterisierung der γ -Sekretase

1.2.5.1. Aufbau des γ -Sekretase-Komplexes

Die γ -Sekretase ist ein Multiprotein-Komplex mit enzymatischer Aktivität. Dieser Komplex besteht aus vier Komponenten, die notwendig und hinreichend für die Spaltung des Substrats β -CTF sind (Edbauer et al., 2003). Die Komponenten sind PS, Nicastrin, „anterior-pharynx-defective“ (APH-1) und „presenilin-enhancer protein“ (PEN-2) und sind in Abbildung 4 schematisch dargestellt. Der reguläre Aufbau des Komplexes beginnt mit der Zusammenlagerung von Nicastrin und APH-1 zu einem Subkomplex im Endoplasmatischen Retikulum, an den sich PS-1 oder PS-2 als Volllängen-Proteine anlagern, welche durch die Anlagerung von PEN-2 endoproteolytisch geschnitten werden (LaVoie et al., 2003). Die Komponenten des Komplexes haben die im Folgenden erklärten Funktionen: Nicastrin ist ein stark glykosyliertes Typ I-Transmembranprotein, das die Substrate anhand ihres verkürzten N-Terminus erkennt (Shah et al., 2005). APH-1 besitzt 6 Transmembransequenzen und stellt das „Gerüst“ des γ -Sekretase-Komplexes dar, indem es die korrekte Assemblierung des Komplexes im glatten Endoplasmatischen Retikulum und den Transport des Komplexes an die Plasmamembran vermittelt (LaVoie et al., 2003; Niimura et al., 2005). Eine zentrale Rolle spielt dabei ein G₁₂₂xxxG₁₂₆-Motiv (siehe 1.3.) in der TMS4 von APH-1 (Abb. 4). Werden die Glycinreste mutiert, reift der gesamte Proteinkomplex nicht korrekt und gelangt infolgedessen nicht an die Plasmamembran (Araki et al., 2006; Goutte et al., 2002; Lee et al., 2004; Niimura et al., 2005). PS-1 und PS-2 sind die katalytisch aktiven Untereinheiten des Komplexes. Die Mehrheit der γ -Sekretase-Komplexe enthält PS-1 (Thinakaran et al.,

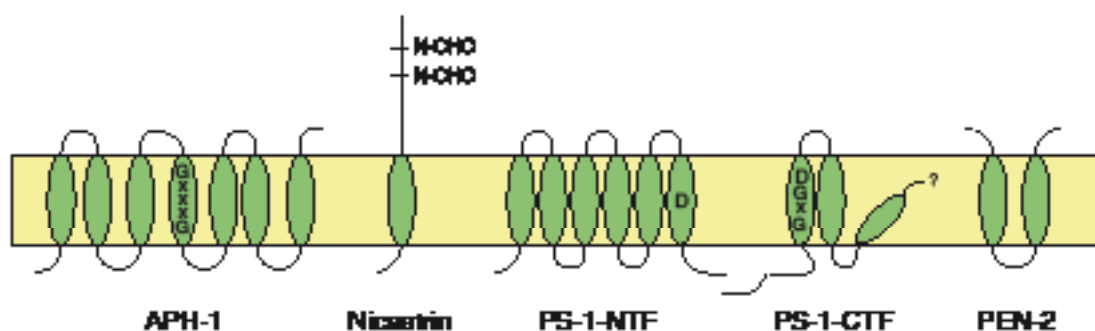


Abb. 4: Aufbau des γ -Sekretase-Komplexes. Der γ -Sekretase-Komplex besteht aus APh-1, Nicastrin, den N-terminalen und C-terminalen Fragmenten von PS-1 (PS-1-NTF, PS-1-CTF) und PEN-2. Hervorgehoben sind die N-glykosydischen Modifikationen von Nicastrin (N-CHO), das GxxxG-Motiv von APh-1 in TMS4, das katalytisch aktive Aspartat (D) in TMS6 von PS-1 sowie das konservierte GxGD Motiv in TMS7 von PS-1-CTF.

1998). PS-1 bildet 8 bis 9 Transmembransequenzen aus, wobei der N-Terminus intrazellulär lokalisiert ist und die Topologie des C-Terminus noch nicht geklärt ist (Spasic et al., 2006). PS-1 ist eine Aspartatprotease mit zwei katalytisch aktiven Resten (D257 und D385) innerhalb der 6. und 7. Transmembransequenz (TMS6 und TMS7) (Kimberly et al., 2000; Wolfe et al., 1999). TMS6 und TMS7 sind durch eine große, intrazelluläre Schleife verbunden, die endoproteolytisch zwischen den Aminosäureresten 289 und 299 gespalten wird, wodurch ein N- und ein C-terminales Fragment entstehen (PS-1-NTF und PS-1-CTF) (Wolfe et al., 1999). Diese endoproteolytische Spaltung wird durch die Anlagerung von PEN-2 induziert, die damit die vollständige Reifung des Komplexes signalisiert (Li et al., 2000b; Luo et al., 2003). Die katalytische Aktivität der γ -Sekretase kann nur von einem Heterodimer aus PS-1-NTF und PS-1-CTF erzeugt werden (Esler et al., 2000).

Native Präparationen des γ -Sekretase-Komplexes weisen ein Molekulargewicht von 600–1000 kDa auf, was darauf hindeutet, dass zumindest einzelne Komponenten als Oligomer im Komplex enthalten sind (Li et al., 2000a; Seeger et al., 1997). PS-1 konnte bereits als Dimer, also als Heterotetramer aus zwei PS-1-NTF und zwei PS-1-CTF, im Komplex nachgewiesen werden, wobei Heterokomplexe aus PS-1 und PS-2 nicht vorkommen (Cervantes et al., 2001; Cervantes et al., 2004; Hebert et al., 2003; Schroeter et al., 2003). PS-1 ist neben der β -Sekretase (BACE) und APP das dritte Protein, das in der Alzheimer Krankheit eine Rolle spielt und als Dimer nachgewiesen wurde.

1.2.5.2. Substrate der γ -Sekretase

Die γ -Sekretase ist ein ungewöhnliches Enzym, da sie die Transmembransequenzen verschiedener Proteine innerhalb der Membran spalten kann (Annaert and De Strooper, 2002). Diese Form der Proteolyse wird auch als „regulated intramembrane proteolysis“

(RIP) bezeichnet (Brown et al., 2000). Die γ -Sekretase ist in der Plasmamembran und den Endosomen proteolytisch aktiv, wobei noch nicht geklärt ist, wie das Substrat den γ -Sekretase-Komplex erreicht (Chyung et al., 2005; Kaether et al., 2006b; Pasternak et al., 2004). Vermutlich enthält die γ -Sekretase eine Substratbindungsstelle, die von dem aktiven Zentrum getrennt ist (Kornilova et al., 2005; Tian et al., 2003). Im aktiven Zentrum wird das Substrat vermutlich an einem konservierten GxGD-Motiv der TMS7 von PS-1 gebunden (Abb. 4) (Yamasaki et al., 2006).

Derzeit sind etwa 20 verschiedene Substrate der γ -Sekretase bekannt, die alle eine Typ I-Transmembran-Topologie haben. Bei allen Substraten muss zuerst die Ektodomäne durch die α - oder β -Sekretase entfernt werden, bevor die γ -Sekretase sie spalten kann. Bekannte Substrate sind beispielsweise APP, APLP1, APLP2, Notch, ErbB-4, E-Cadherin, CD44, Nectin-1, Syndecan, Jagged2, Delta1, Apolipoprotein-E-Rezeptor-2 (ApoE2) und „Low-density lipoprotein receptor-related protein“ (LRP) (Brunkan and Goate, 2005; Hoe and Rebeck, 2005; Schulz et al., 2003). Bemerkenswert ist dabei, dass die γ -Sekretase keine spezifische Primärsequenz erkennt und bei einigen Substraten verschiedene Schnittstellen der γ -Sekretase bekannt sind, wie beispielsweise bei APP (γ -, ζ - und ε -Schnitte, Abb. 2) und bei Notch (S3- und S4-Schnitte) (Chandu et al., 2006; Okochi et al., 2002). Die Prozessierung von Notch durch die γ -Sekretase ist während der Embryonalentwicklung und der Zellspezialisierung wichtig, da die dabei entstehende „Notch-intracellular-C-terminal-domain“ (NICD) im Kern die Transkription bestimmter Gene kontrolliert. Mäuse mit einer homozygoten PS-1-Inaktivierung sterben nach der Geburt und zeigen starke Missbildungen des Skeletts sowie des zentralen Nervensystems, was vermutlich auf die verhinderte Signalweiterleitung durch Notch zurückzuführen ist (Shen et al., 1997). Diese Mäuse generieren kein A β , was die Notwendigkeit der γ -Sekretase-Prozessierung zur Bildung von A β zeigt (De Strooper et al., 1998).

1.2.5.3. Der Schnittmechanismus der γ -Sekretase

Der genaue Schnittmechanismus der γ -Sekretase ist unbekannt, jedoch konnten Qi-Takahara et al. und Zhao et al. ein interessantes Modell aufstellen (Abb. 5) (Qi-Takahara et al., 2005; Zhao et al., 2005). Zusätzlich zu den γ -Sekretase-Schnittstellen wurden in der Transmembransequenz von APP zwei weitere Schnittstellen der γ -Sekretase, die ε -Schnittstelle zwischen den Positionen 49 und 50 (entsprechend der A β Nummerierung)

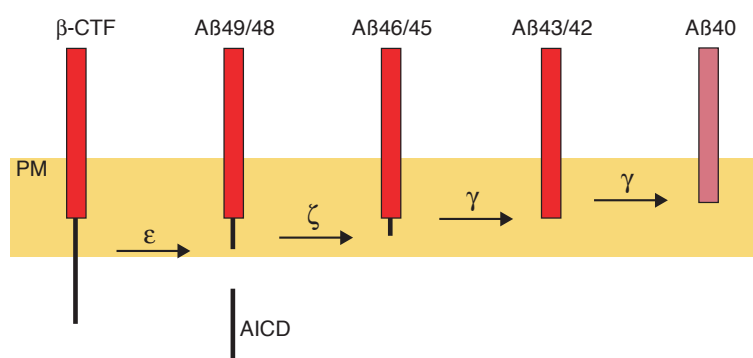


Abb. 5: Darstellung des sequenziellen Proteolysemechanismus der γ -Sekretase. Das Substrat der γ -Sekretase β -CTF wird zuerst durch den ϵ -Schnitt der γ -Sekretase am C-terminalen Ende der Transmembransequenz gespalten und AICD und A β 49 oder A β 48 generiert. A β 49/48 sind erneute Substrate der γ -Sekretase und werden durch den ζ -Schnitt um weitere drei Aminosäuren verkürzt zu A β 46 oder A β 45. Der folgende γ -Schnitt verkürzt A β 46/45 erneut und generiert A β 43 oder A β 42, bzw. in einem weiteren Schnitt A β 40. PM: Plasmamembran.

(Weidemann et al., 2002) und die ζ -Schnittstelle zwischen den Positionen 46 und 47, entdeckt (Abb. 3) (Zhao et al., 2004). Die entsprechenden A β -Peptide sind 46 bzw. 49 Aminosäuren lang und hydrophober als A β 42 und kürzere Fragmente. Vermutlich bleiben diese Peptide dadurch in der Membran bzw. dem γ -Sekretase-Komplex verankert und sind im Zelllysate nachzuweisen. Von zentraler Bedeutung ist der Befund, dass die Schnittstellen voneinander abhängig sind. So ist das membrangebundene A β 49 der Vorläufer zu A β 46 und dies wiederum der Vorläufer für A β 40 oder A β 42 (Zhao et al., 2005). Nach Qi-Takahara et al. existieren zwei Produktlinien durch eine Verschiebung der Spaltstelle. Eine Linie führt ausgehend von A β 49 über A β 46 zu A β 43 und schließlich zu A β 40. Die zweite Linie generiert ausgehend von A β 48 über A β 45 das A β 42-Peptid (Abb. 5) (Qi-Takahara et al., 2005). Eine ähnliche Abhängigkeit der S3- und S4-Schnittstelle bei Notch konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Chandu et al., 2006). Die Abhängigkeit der Schnittstellen voneinander führt zu der Annahme, dass die γ -Sekretase mit einem progressiven, sequenziellen Mechanismus arbeitet und Transmembransequenzen schrittweise vom intrazellulären Ende zum extrazellulären Ende abbaut (De Strooper, 2007; Wolfe, 2007).

Dieser sequenzielle Schnittmechanismus der γ -Sekretase wird durch die folgenden veröffentlichten Ergebnisse unterstützt. Die Prozessierung von β -CTF durch die γ -Sekretase lässt einerseits A β und andererseits AICD entstehen. Bislang konnten ausschließlich AICD-Fragmente nachgewiesen werden, die mit den Aminosäuren 49 oder 50 beginnen, was gegen einen einmaligen Schnitt in der Transmembransequenz spricht, da dann AICD-Fragmente beginnend bei Aminosäuren 41 oder 43 erwartet werden würden (Kakuda et al., 2006). Außerdem spricht ein weiteres Experiment für die sequentielle Prozessierung. Wird direkt A β 49 bzw. A β 48 in Zellen exprimiert, so entstehen hauptsächlich A β 40 bzw. A β 42

(Kakuda et al., 2006).

Der Schnittmechanismus der γ -Sekretase lässt sich durch Nicht-steroidale anti-inflammatorische Substanzen (NSAIDs) modulieren. Bestimmte NSAIDs wie Fenofibrat oder Celecoxib führen zu einer erhöhten A β 42- und einer verminderten A β 38-Produktion (Kukar et al., 2005). Andere NSAIDs wie Sulindac-Sulfid, R-Flurbiprofen und Ibuprofen haben den gegenteiligen Effekt: Sie erhöhen die A β 38- und vermindern die A β 42-Konzentration (Eriksen et al., 2003; Takahashi et al., 2003; Weggen et al., 2001). NSAIDs wurden bereits erfolgreich bei Alzheimer Patienten eingesetzt, allerdings mit dem Ziel, die mit der Plaque-Bildung einhergehenden inflammatorischen Ereignisse im erkrankten Gehirn zu lindern (McGeer et al., 1996).

1.3. Das GxxxG-Motiv

Das Aminosäuremotiv GxxxG (zwei Glycine, getrennt durch drei weitere Aminosäuren außer Prolin) kann prinzipiell die spezifische Dimerisierung von zwei α -helikalen Transmembransequenzen innerhalb der Membran vermitteln (Senes et al., 2004). GxxxG-Motive kommen in Transmembransequenzen häufiger vor als statistisch erwartet wird, was eine biologische Funktion des Motivs nahe legt (Kleiger et al., 2002; Senes et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass die Dimerisierung der Transmembransequenz über GxxxG-Motive bei verschiedenen Proteinen essentiell für ihre Funktion ist. Beispielsweise besitzt APH-1, eine Komponente des γ -Sekretase-Komplexes, ebenfalls zwei aufeinander folgende GxxxG-Motive in TMS4 (siehe 1.2.5.1.). Werden die Glycinreste gegen andere Aminosäuren ausgetauscht, wird die Komplexassemblierung und folglich die proteolytische Aktivität der γ -Sekretase verhindert (Araki et al., 2006; Lee et al., 2004; Niimura et al., 2005). Intakte GxxxG-Motive sind auch für die korrekte Oligomerisierung und Funktion der ATP-Synthase und des „copper-uptake“-Transportes (CTR) notwendig (Aller et al., 2004; Arselin et al., 2003). Weitere Beispiele für Proteine, die essentielle GxxxG-Motive haben, sind der G-Protein gekoppelte α -Faktor-Rezeptor (STE2), das „vacuolating toxin“ (VacA), die „ATP-binding cassette transporters“ (ABCG2) und das Peroxin Pex14p (Itoh and Fujiki, 2006; McClain et al., 2003; Overton et al., 2003; Polgar et al., 2004).

Um die Funktion eines Proteins zu gewährleisten, können GxxxG-Motive sowohl die Bildung von symmetrischen Homodimeren als auch von Heterodimeren mit anderen Helices vermitteln (Senes et al., 2004). Untersuchungen zur Struktur von GxxxG-vermittelten Homodimeren

zeigten, dass in einer α -helikalen Konformation der Transmembransequenzen die Glycinreste auf einer Seite der Helices liegen, wo sie wegen der fehlenden Seitenketten eine Rinne bilden (Senes et al., 2004). Diese Rinne ermöglicht es den Helices, sich mit einer leichten rechtshändigen Verkreuzung so anzunähern, dass stabilisierende Wechselwirkungen wie van-der-Waals-Interaktionen und Wasserstoff-Brücken ausgebildet werden können (Senes et al., 2004). Dabei ermöglichen GxxxG-Motive auch die Ausbildung von Wasserstoff-Brücken, die vom $C\alpha$ -Atom ausgebildet werden ($C\alpha-H\cdots O$ Bindungen) (Senes et al., 2001). Wird nun die Kontaktfläche des Dimers gezielt verändert, indem beispielsweise eines der Glycine gegen ein Alanin ausgetauscht wird, führt dies zu einer sterischen Hinderung, die die stabilisierenden Wechselwirkungen behindert und die Dimerisierungsstärke herabsetzt (Fleming and Engelman, 2001). Die Struktur von GxxxG-Motiven wurde intensiv am Beispiel des Glycophorin A (GpA) untersucht (Langosch et al., 1996; MacKenzie et al., 1997). Wurden die Glycinreste G79 oder G83 von GpA gegen Alanin ausgetauscht, reduzierte sich die Stärke der Dimerisierung um etwa 70% bis 80%, wobei Mutationen benachbarter Aminosäuren kaum Auswirkung auf die Stabilität der Dimerisierung zeigten (Langosch et al., 1996).

APP enthält drei konsekutive GxxxG-Motive, die die Aminosäuren 621–633 in der APP-Sequenz bzw. die Aminosäuren 25–37 in der A β -Sequenz (nach der A β -Nummerierung) umfassen. Das erste $G_{25}xxxG_{29}$ -Motiv befindet sich außerhalb der Membran (Abb. 1). Die zwei folgenden $G_{29}xxxG_{33}xxxG_{37}$ -Motive liegen im N-terminalen Bereich der APP-Transmembransequenz (Abb. 1). Bislang gibt es keine Veröffentlichungen, die die GxxxG-Motive und eine mögliche Dimerisierung der APP-Transmembransequenz untersucht haben.

1.4. Zielsetzung

Für das Verständnis der molekularen Ursachen der Alzheimer Krankheit ist es wichtig zu ergründen, wie und warum Schlüsselmoleküle wie BACE, PS-1 und APP homodimerisieren. Im APP vermitteln zwei Regionen die Dimerisierung der Ektodomäne. Darüber hinaus besitzt die Transmembransequenz von APP drei konsekutive GxxxG-Motive, die bei anderen Proteinen entdeckt wurden und dafür bekannt sind, die Homodimerisierung von Transmembransequenzen zu vermitteln. Daraus ließ sich vermuten, dass die APP-Transmembransequenz eine dritte Dimerisierungs-Region darstellen könnte.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war, die GxxxG-Motive der APP-Transmembransequenz zu charakterisieren und ihre Funktion hinsichtlich der Dimerisierung und Prozessierung von APP zu untersuchen. Es sollte festgestellt werden, welche Aminosäuren der Transmembransequenz eine mögliche Dimerisierung stabilisieren und wie sich diese dritte Kontaktstelle auf das Vollängen-APP auswirkt. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob und wie die GxxxG-Motive die Entstehung von A β -Peptiden beeinflussen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, den Einfluss der GxxxG-Motive auf die Oligomerisierung und Fibrillenbildung der A β -Peptide zu untersuchen.