

3. Diskussion

3.1. GxxxG-Motive in anderen γ -Sekretase Substraten

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die APP-Transmembransequenz dimerisieren kann. Diese Dimerisierung wird durch ein zentrales GxxxG-Motiv um die Glycinreste G29 und G33 vermittelt.

Die Transmembransequenzen einiger weiterer Substrate der γ -Sekretase enthalten ebenfalls ein GxxxG-Motiv. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die GxxxG-Motive von E-Cadherin und ErbB-4 die Dimerisierung der Transmembransequenzen vermitteln (Huber et al., 1999; Mendrola et al., 2002). Die Transmembransequenzen von Nectin-1 und APLP1 besitzen ebenfalls GxxxG-Motive, wobei diese Motive noch nicht näher untersucht wurden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Volllängen-Proteine Nectin-1 und APLP1 ähnlich wie APP dimerisieren (Miyahara et al., 2000; Soba et al., 2006; persönliche Mitteilung D. Kaden und G. Multhaupt). Das γ -Sekretase Substrat Notch enthält kein GxxxG-Motiv, dennoch dimerisiert sowohl die Notch-Transmembransequenz als auch das Volllängen-Protein durch Ligandenbindung (Vooijs et al., 2004). Ein Vergleich der Transmembransequenzen von ausgewählten Substraten der γ -Sekretase mit der Transmembransequenz von APP verdeutlicht die Verteilung der GxxxG-Motive in den Transmembransequenzen (Abb. 28). Die Transmembransequenzen sind in dieser Abbildung am Glycinrest G33 der A β -Sequenz ausgerichtet dargestellt. Die Substrate ErbB-4, E-Cadherin, „voltage-gated sodium channel β -subunit 2“ (VGSC β 2) und Nectin-1 (Kim et al., 2005a; Kim et al., 2002; Marambaud et al., 2002; Ni et al., 2001; Wong et al., 2005) enthalten jeweils ein GxxxG-Motiv, das in einer vergleichbaren Position zum G₃₃xxxG₃₇-Motiv der A β -GxxxG Wiederholungen liegt. Das Substrat APLP1 enthält auch ein GxxxG-Motiv, das sich jedoch inmitten der Transmembransequenz befindet. Da diese GxxxG-Motiv-enthaltenden Substrate von

	25	29	33	37	41	42	ζ	ϵ
APP	G	S	N	K	G	A	I	L
ErbB-4	L	I	A	G	V	I	G	L
E-Cadherin	E	R	I	L	G	I	L	L
VGSC β 2	A	V	I	G	A	S	V	G
Nectin-1	T	A	I	G	V	A	G	E
APLP1	R	A	V	E	G	L	I	N

Abb. 28: Vergleich der Transmembransequenzen verschiedener γ -Sekretase Substrate mit der APP-Transmembransequenz. In der APP-Sequenz sind G25, G29, G33 und G37 sowie die γ -, ζ - und ϵ -Schnittstellen eingetragen. GxxxG-Motive sind grau unterlegt, G33 und entsprechende Glycinreste sind schwarz unterlegt. Alle Sequenzen wurden an G33 ausgerichtet, wobei die Transmembransequenz-Enden (an K oder R) weitgehend übereinstimmen. ErbB-4: Rezeptor Tyrosin-Protein Kinase ErbB-4, VGSC β 2: „voltage-gated sodium channel β -subunit 2“, APLP1: „amyloid precursor-like proteins 1“.

der γ -Sekretase abgebaut werden können, scheint die Dimerisierung an diesen GxxxG-Motiven die Prozessierung nicht zu beeinflussen. Dieser Sequenzvergleich zeigt, dass die Transmembransequenz von APP sowohl aufgrund der drei konsekutiven GxxxG-Motive als auch aufgrund der Lage der GxxxG-Motive in der Transmembransequenz ein besonderes Substrat der γ -Sekretase ist.

3.2. Die γ -Sekretase kann dimerisierte Substrate spalten

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass die γ -Sekretase in der Lage ist dimerisierte Substrate zu prozessieren. Diese Ergebnisse widersprechen der Veröffentlichung von Struhl und Adachi, nach der dimere Substrate von der γ -Sekretase nicht gespalten werden können (Struhl and Adachi, 2000). Die Experimente dieser Studie wurden mit chimären Proteinen durchgeführt ohne biochemische Beweise für eine korrekte Dimerisierung und Lokalisation der Chimäre zu liefern (Struhl and Adachi, 2000). Dadurch gelangten die Autoren möglicherweise zu dieser Schlussfolgerung, die nicht unmittelbar auf die Dimerisierung der Chimäre zurückgeführt werden kann und ist damit möglicherweise falsch. Aufgrund der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse ist vielmehr davon auszugehen, dass die γ -Sekretase dimerisierte Substrate spalten kann. Im Folgenden werden die experimentellen Befunde dieser Arbeit und Hinweise aus verschiedenen Veröffentlichungen aufgeführt, die diese Annahme untermauern:

In dieser Arbeit konnte mittels FRET-Studien erstmals die Dimerisierung von Volllänge-APP in lebenden HEK293-Zellen nachgewiesen werden. Weiterhin konnte abgeleitet werden, dass mindestens 50% aller APP Moleküle Dimere formen, was auf eine biologische Funktion der Dimerisierung hindeutet.

Auch andere Substrate der α -, β - und γ -Sekretase wie zum Beispiel Notch, E-Cadherin, ErbB-4, Nectin-1, APLP1 und APLP2 bilden Homodimere aus (Ferguson et al., 2000; Miyahara et al., 2000; Soba et al., 2006; Troyanovsky et al., 2003; Vooijs et al., 2004). Ein bekannter Ligand für ErbB-4 ist Neuregulin. Die Bindung von Neuregulin an ErbB-4 induziert die Homodimerisierung von ErbB-4 (Sardi et al., 2006). Vor Kurzem konnte gezeigt werden, dass die Prozessierung von ErbB-4 durch TACE und die γ -Sekretase erst stattfinden kann, wenn Neuregulin gebunden hat (Sardi et al., 2006). Die Dimerisierung von ErbB-4 ist demnach notwendig, um von der γ -Sekretase prozessiert zu werden.

Im direkten Substrat der γ -Sekretase, dem β -CTF, ist das $G_{29}xxxG_{33}$ -Motiv das einzig bekannte Dimerisierungsmotiv. In dieser Arbeit konnte durch die Experimente mit kovalent-verbundenem SPA4CT-L17C bzw. SPA4CT-L17C/G33I gezeigt werden, dass über das GxxxG-Motiv die Dimerisierung des β -CTF vermittelt wird (siehe Abb. 12). Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass Zellen, die APP-L17C exprimieren, A β -Peptide produzieren, die teilweise kovalent über eine Disulfidbrücke verbunden sind (siehe Abb. 14G). Da bereits APP-L17C und β -CTF-L17C kovalente Dimere bildet (siehe Abb. 11B, Abb. 12), kann davon ausgegangen werden, dass kovalente A β -Dimere nicht nach der γ -Sekretase Prozessierung entstehen sondern direkt die kovalent verbundenen Substrate von der γ -Sekretase gespalten werden.

Weiterhin spricht für die Prozessierung dimerer Substrate durch die γ -Sekretase, dass bekannt ist, dass PS-1 im γ -Sekretase-Komplex als Dimer enthalten ist (Cervantes et al., 2004; Hebert et al., 2003; Schroeter et al., 2003). Von Aspartatproteasen ist bekannt, dass sie zur Ausbildung eines katalytischen Zentrums zwei Aspartatreste benötigen. In PS-1 ist je ein katalytisch aktives Aspartat in TMS6 und TMS7 von PS-1 enthalten. Durch die Dimerisierung von PS-1 stehen theoretisch vier Aspartatreste zur Verfügung, die zwei aktive Zentren bilden könnten. Diese theoretische Überlegung ergänzt sich mit den oben genannten Ergebnissen: Um dimerisierte Substrate prozessieren zu können, braucht die γ -Sekretase zwei aktiven Zentren, mit denen sie parallel beide Substrat-Helices spalten kann.

Die aufgeführten Ergebnisse hinsichtlich der Dimerisierung der γ -Sekretase Substrate lassen sich wie folgt zusammenfassen: Erstens wurde die Dimerisierung von Vollängen-APP festgestellt, was bereits für andere Substrate der α -, β - und γ -Sekretasen bekannt war. Zweitens konnte die Dimerisierung der APP-Transmembransequenz über GxxxG-Motive nachgewiesen werden. Drittens konnte die Dimerisierung von β -CTF über das GxxxG-Motiv gezeigt werden. Viertens konnten kovalent-verbundene A β -Dimere aus der Prozessierung von L17C-Mutanten nachgewiesen werden. Fünftens kann die γ -Sekretase theoretisch zwei aktive Zentren ausbilden, die notwendig für die Prozessierung eines Dimers sind. Diese Ergebnisse leiten zu der Theorie, dass die γ -Sekretase dimere Substrate spalten kann.

3.3. Korrelation der Dimerisierung und A β 42-Entstehung

In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass Mutationen im GxxxG-Motiv von APP nicht die Effizienz der Spaltungen durch die α -, β - oder γ -Sekretasen beeinflussen, d.h. alle GxxxG-Mutanten sind mit APP-wt vergleichbar gute Substrate. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Interaktion von APP mit der γ -Sekretase nicht negativ durch GxxxG-Mutationen beeinflusst wird. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die GxxxG-Mutationen eine Verschiebung der Spaltstelle erzeugten. Dabei sind APP- oder SPA4CT-Mutanten, die einen einzigen Austausch von Glycin zu Alanin tragen, also G25A, G29A und besonders G33A, sind die günstigsten Mutanten, um den Einfluss der GxxxG-Motive auf die Prozessierung zu untersuchen. Die Prozessierung der APP-Mutanten APP-G25A, APP-G29A und APP-G33A führte zu einem selektiv veränderten Mengenverhältnis von A β 42 zu A β 38 ohne die A β 40-Menge zu beeinflussen. Diese Mutanten wirkten sich folglich nur auf eine Produktlinie (A β 48-A β 45-A β 42) aus, so dass überlappende Effekte mit der zweiten Produktlinie (A β 49-A β 46-A β 43-A β 40) bei diesen Mutanten nicht berücksichtigt werden müssen. Diese drei Mutationen führten in der Reihenfolge G25A, G29A und G33A zur Produktion immer geringerer A β 42-Mengen und immer höherer A β 38-Mengen (Abb. 18, 21). Die Doppelmutation G29/33A und die Isoleucin-Mutation G33I führten zu einer Verstärkung der Effekte der Einzel-Alanin-Mutationen und generierten kein A β 42, dafür aber hohe Mengen A β 38. Darüber hinaus bewirkten die Mutationen G29/33A und G33I zusätzlich die Verringerung der A β 40-Mengen und wirkten sich somit auch auf die zweite Produktlinie aus. Der Befund, dass sich die Effekte der Einzel-Alanin-Mutanten in Abhängigkeit ihrer Position verstärken lassen, sowie der Befund, dass sich die Effekte durch stärkere Mutationen des GxxxG-Motivs (Doppelmutation oder G33I) weiter steigern lassen, weisen darauf hin, dass die nachgewiesenen Veränderungen in der Entstehung der A β -Spezies spezifisch durch die GxxxG-Mutationen herbeigeführt werden.

Es gibt zwei Veröffentlichungen, in denen Mutationen in der APP-Transmembransequenz eingeführt wurden, um die Länge der Transmembransequenz zu bestimmen. Bei diesen Mutationen wurden die GxxxG-Motive zerstört (Lichtenthaler et al., 2002; Murphy et al., 1999). In beiden Veröffentlichungen sind Mutationen eingeführt worden, die die Transmembransequenz sehr viel stärker veränderten, als die in dieser Arbeit verwendeten Punktmutationen. Vier Mutationen sind bei der Interpretation der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit interessant: zwei Insertionsmutanten, die das G₂₉xxxG₃₃ Motiv um zwei, bzw. drei

Aminosäuren verlängerten (GAVLIIG bei Lichtenthaler et al. und GAIIGAIIG bei Murphy et al.), eine Deletionsmutante, die das erste GxxxG-Motiv entfernte (G - - KG) (Lichtenthaler et al., 2002) und eine Punktmutation G29P (Murphy et al., 1999). Alle vier APP-Mutanten führten zur Entstehung kürzerer A β -Spezies, während die A β 42-Bildung unterbunden wurde und A β 40 noch generiert werden konnte. Beide Veröffentlichungen schließen aus ihren Ergebnissen, dass Mutationen im N-terminalen Bereich der Transmembransequenz die Prozessierung stärker beeinflussen als Mutationen im C-terminalen Bereich. Diese Veröffentlichungen untermauern damit die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, da GxxxG-Mutationen ebenfalls zur Bildung kürzerer A β -Spezies führten und die GxxxG-Motive im N-terminalen Bereich der APP-Transmembransequenz liegen.

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit erzeugen GxxxG-Mutationen zwei Effekte: Sie setzen die Stärke der Transmembransequenz-Dimerisierung herab und sie beeinflussen die Bildung der A β -Spezies, besonders die Entstehung von A β 42. Folglich kann vermutet werden, dass die Generierung von A β 42 mit der Stärke der Dimerisierung korreliert. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde die produzierte A β 40- oder A β 42-Menge einer Mutation (mittels ELISA quantifiziert) gegen die Stärke der Dimerisierung des entsprechenden Konstrukts im ToxR-System aufgetragen (Abb. 29). Aus diesen Diagrammen wird ersichtlich, dass die Entstehung von A β 42 deutlich von der Stärke der Dimerisierung der Transmembransequenz abhängig ist (Abb. 29). Eine Schwächung der Dimerisierung von etwa 30% reicht zur Inhibition der A β 42-Bildung aus. Hingegen wird die Entstehung von A β 40 von der Stärke der Dimerisierung kaum beeinträchtigt. Erst wenn die Dimerisierung beinahe unterbunden ist, wird auch die A β 40-Produktion herabgesetzt (Abb. 29). Diese Korrelationen weisen darauf hin, dass die γ -Sekretase die verschiedenen A β -Spezies in Abhängigkeit der Stabilität des Substrat-Dimers erzeugt. Die Entstehung des neurotoxischen Peptids A β 42 wird durch das

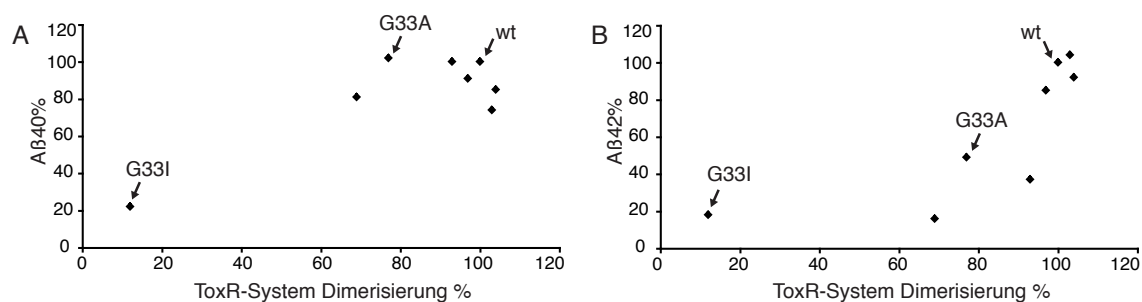


Abb. 29: Korrelation der Dimerisierungsstärke mit den generierten A β 40- und A β 42-Mengen. (A) Nur die Mutation G331 führt zu einer deutlichen Verminderung der A β 40-Menge und verhindert die Dimerisierung der Transmembransequenz (B) Mutationen führen bereits zu gesenkten A β 42-Mengen, wenn diese Mutationen die Transmembransequenz-Dimerisierung nur leicht destabilisieren.

stabil dimerisierende Substrat, β -CTF-wt, erzeugt. Folglich kann die Theorie aufgestellt werden, dass die Dimerisierung der APP-Transmembransequenz ein Risikofaktor für die Entstehung der Alzheimer Krankheit ist.

Diese Theorie der „Substrat-Dimerisierung als Risikofaktor der Alzheimer-Krankheit“ soll im Folgenden in den Kontext bisher publizierter Risikofaktoren diskutiert werden. Bekannte Risikofaktoren, die zu einem Anstieg der A β 42-Menge im Gehirn führen, sind in erster Linie die FAD-Mutationen im APP oder im PS-1 sowie beispielsweise ein zu hohes Serum-Cholesterin, oxidativer Stress, ein gestörter Lipidstoffwechsel oder eine veränderte Metallionenhomöostase (Borchardt et al., 1999; Deibel et al., 1996; Kaether et al., 2006b; Saunders et al., 1993; Shobab et al., 2005). Es wäre denkbar, dass all diese Faktoren auf verschiedene Weise das Dimer des Substrats β -CTF stabilisieren könnten. Beispielsweise könnten die Membrandicke, die Konformation von APP oder β -CTF oder die Konformation und Flexibilität der γ -Sekretase so verändert werden, dass die Dimerisierung von β -CTF stabilisiert wird. Dadurch würde die Entstehung von A β 42 verstärkt und die Entstehung der Alzheimer Krankheit beschleunigt werden. Auch wenn derzeit keine experimentellen Beweise für diese Vermutung vorliegen, die diese Idee ent- oder bekräftigen würden, so eröffnet die in dieser Arbeit entwickelte Theorie immerhin die Möglichkeit, die bestehenden Erkenntnisse und Risikofaktoren in einem einzigen und schlüssigen Modell zusammenzufassen.

3.4. Mechanismus der Entstehung von A β 42

Mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnte basierend auf dem einleitend beschriebenen Modell der sequentiellen Proteolyse das Modell für den Schnittmechanismus der γ -Sekretase wesentlich erweitert werden (Abb. 30). Es konnte gezeigt werden, dass die γ -Sekretase dimerisiertes β -CTF prozessieren kann, wie in Abbildung 30A dargestellt ist. In diesem Fall wird das Substrat zuerst durch den ϵ -Schnitt zwischen den Aminosäuren 50/49 bzw. 49/48 gespalten. Die entstandenen A β -Spezies A β 49 und A β 48 sind die Substrate für den ζ -Schnitt und werden um weitere drei Aminosäuren zu A β 46 bzw. A β 45 gekürzt (Kakuda et al., 2006; Qi-Takahara et al., 2005). Durch die dann folgenden γ -Schnitte entsteht aus A β 46 über A β 43 letztlich A β 40 bzw. aus A β 45 entsteht A β 42. A β 40 und A β 42 können die Membran verlassen und im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden. Basierend auf den Daten dieser Arbeit wird nun postuliert, dass bei Morbus Alzheimer die γ -Sekretase an den Positionen 40 bzw. 42 aufgrund einer sterischen Hinderung durch das Dimer angehalten

die Folge einer unvollständigen Degradation. Diese Schlussfolgerung wirft die Frage auf, warum die γ -Sekretase nur die APP-Transmembransequenz unvollständig abbaut und nicht auch die Transmembransequenzen anderer Substrate. Diese Frage kann mit dem unter 3.1. erläuterten Punkt erklärt werden: APP ist sowohl aufgrund der dreifachen Wiederholung des GxxxG-Motivs als auch wegen ihrer N-terminalen Position in der Transmembransequenz ein besonderes Substrat der γ -Sekretase. In anderen Substraten wurde bislang noch kein GxxxG-Motiv entdeckt, das dem $G_{29}xxxG_{33}$ Motiv entspricht. Vermutlich ist gerade der Überkreuzungspunkt bei G29 und G33 die kritische Stelle, die eine sterische Hinderung erzeugen und den sequentiellen Proteolysemechanismus der γ -Sekretase an den Aminosäurepositionen 40 und 42 blockieren kann.

In anderen Veröffentlichungen konnten dennoch A β -ähnliche Peptide für Notch, CD44 und APLP2 nachgewiesen werden. Dies wirft wiederum die Frage auf, warum keine Erkrankungen bekannt sind, die von diesen Peptiden hervorgerufen werden (Eggert et al., 2004; Lammich et al., 1999; Okochi et al., 2002). Möglicherweise spielt bei dieser Frage die Stabilität der Peptide eine entscheidende Rolle. A β zeigt eine besondere Aggregationsfähigkeit, die von den Glycinresten und besonders G33 unterstützt wird (Abb. 26, 27) und (Kim et al., 2005b; Xu et al., 2005). Durch die Aggregation von A β -Peptiden wird ihre Stabilität erhöht und der Abbau durch andere Proteasen wie „Insulin-degrading enzyme“ (IDE) oder Neprilysin ist erschwert (Tanzi et al., 2004). Da die Transmembransequenzen anderer Substrate kein zu $G_{29}xxxG_{33}$ vergleichbares Motiv aufweisen, werden sie vermutlich entweder vollständig von der γ -Sekretase degradiert oder die entstehenden Peptide sind weniger stabil und können somit von anderen Proteasen abgebaut werden.

3.5. Einfluss familiärer Mutationen auf die A β 42-Menge

3.5.1. Die APPsw-Mutation

Bislang wurde angenommen, dass APPsw ein besseres Substrat für die β -Sekretase ist, die APPsw etwa drei- bis sechsfach besser schneidet als APP. Dies soll zu einer Erhöhung der Gesamtmenge von A β führen ohne Einfluss auf die A β -Spezies (Citron et al., 1992; Citron et al., 1994). Im Widerspruch zu diesen Veröffentlichungen wurde in der vorliegenden Arbeit festgestellt, dass die Prozessierung von APPsw zu der vierfachen A β 42-Menge, aber nur zur doppelten A β 40-Menge im direkten Vergleich zur Prozessierung von APPwt führte. Dabei ist anzumerken, dass in den meisten Publikationen, in denen APPsw

untersucht wurde, nicht gezielt die Entstehung der A β -Spezies aus APPsw mit APP-wt verglichen wurde. Möglicherweise wird die unterschiedliche Prozessierung der A β -Spezies von APPsw-transfizierten Zellen erst bei einem direkten Vergleich zu der Prozessierung von APP-wt deutlich. Die schwedische Mutation wird in sehr vielen Studien verwendet und meistens bei APP-transgenen Mäusen eingesetzt. Die in dieser Arbeit nachgewiesene gesteigerte Entstehung von A β 42 aus APPsw ist eine wichtige Information für die bisherigen und weiteren Arbeiten mit APPsw. Aufgrund der erhöhten A β 42-Produktion können Effekte der APPsw-Mutante nicht allein auf eine gesteigerte Gesamtmenge von A β zurückgeführt werden.

3.5.2. Die APParc-Mutation

Bei Patienten, die die arktische Mutation tragen, konnten niedrigere Konzentrationen von A β 42 und A β 40 im Blutplasma beobachtet werden (Nilsberth et al., 2001). In Zellkulturexperimenten ist die A β 42-Menge im Vergleich zu APP-wt um 19% gesenkt (Nilsberth et al., 2001). Dennoch verstärkt die arktische Mutation die Prozessierung durch die β -Sekretase und vermindert die Prozessierung durch die α -Sekretase (Stenh et al., 2002). Die neuronale Degeneration wird vermutlich durch eine verstärkt-neurotoxische Konformation der A β arc-Peptide hervorgerufen, da diese Peptide schnell Protofibrillen bilden (Nilsberth et al., 2001). Wie im Fall der APPsw-Mutation wurde in dieser Arbeit im Gegensatz zu den genannten publizierten Daten im Zellkulturmedium APParc-exprimierender SH-SY5Y-Zellen eine leicht erhöhte A β 42-Menge (um 15%) und eine erhöhte A β 40-Menge (um 22%) nachgewiesen (Abb. 24B, C). Dieser Unterschied könnte durch die Verwendung unterschiedlicher Zelltypen zustande kommen, da in den veröffentlichten Experimenten HEK293-Zellen und keine neuronalen SH-SY5Y-Zellen verwendet wurden.

3.6. GxxxG-Motive dominieren über FAD-Mutationen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass die GxxxG-Motive eine Schlüsselrolle in der Entstehung von A β 42 spielen. Um weitere Evidenzen dafür zu finden, wurde untersucht, ob FAD-Mutationen den Einfluss der GxxxG-Mutationen wieder rückgängig machen können. Wenn die GxxxG-Motive tatsächlich eine Schlüsselrolle einnehmen, so sollten GxxxG-Mutanten über die FAD-Mutationen dominieren.

3.6.1. APPsw-GxxxG-Mutanten und APParc-GxxxG-Mutanten

Die Kombination der GxxxG-Mutationen mit der APPsw- oder APParc-Mutation zeigte, dass sich die GxxxG-Mutationen noch immer auf die Mengen der A β -Spezies auswirkten und zwar in einem vergleichbaren Maß, wie es die GxxxG-Mutationen im APP allein bewirken können. Da die arktische und besonders die schwedische Mutation den α -sekretorischen Weg schwächen und die β -sekretorische-Prozessierung verstärken, zeigt dieses Ergebnis, dass das GxxxG-Motiv die Prozessierung erst beeinflusst, nachdem die schwedische und die arktische Mutation die Prozessierung durch die α - oder β -Sekretase verändert haben. Dieses Ergebnis unterstützt die bisherigen Befunde, dass das GxxxG-Motiv eine entscheidende Rolle in der Prozessierung von β -CTF durch die γ -Sekretase spielt und Einfluss auf die Länge der produzierten A β -Peptide nehmen kann.

3.6.2. PS-1-FAD-Mutationen kombiniert mit GxxxG-Mutationen

Auf diesen Ergebnissen aufbauend stellt sich die Frage, ob die FAD-Mutationen des PS-1 die Effekte der GxxxG-Mutationen rückgängig machen können. Im Vergleich zu FAD-Mutationen des APP sind FAD-Mutationen des PS-1 häufig für einen sehr frühen Krankheitsbeginn verantwortlich und scheinen folglich einen schwerwiegenderen Einfluss auf die Prozessierung von APP zu haben. Im Rahmen der Diplomarbeit von Anne Siekhaus wurde der Zusammenhang von FAD-Mutationen des PS-1 und der GxxxG-Mutation APP-G33A untersucht (Siekhaus, 2007). In dieser Arbeit wurden die PS-1 FAD-Mutationen L250V, G378V, G384A, S390I und G394V verwendet (Campion et al., 1999; Cruts et al., 1995; Furuya et al., 2003; Janssen et al., 2003; Rogaeva et al., 2001). HEK293-Zellen wurden mit je einem PS-1-Konstrukt und jeweils entweder APP-wt oder APP-G33A kotransfiziert. Die Quantifizierung der entstandenen A β -Spezies mittels ELISA ergab, dass PS-1-FAD-Mutationen in Gegenwart von APP-wt zu einer erhöhten Produktion von A β 42 führten, wobei der A β 40-Spiegel nicht verändert oder sogar verringert wurde (Siekhaus, 2007). Die Prozessierung von APP-G33A durch die PS-1-FAD-Mutationen führte jedoch zu verringerten A β 42-Mengen im Vergleich zur Prozessierung von APP-wt, wobei die generierten A β 40-Spiegel von APP-wt und APP-G33A vergleichbar waren (Siekhaus, 2007). Die GxxxG-Mutation G33A kann folglich sogar die FAD-auslösenden Effekte der PS-1-Mutationen verändern und die A β 42-Menge verringern. Diese Daten, die Anne Siekhaus in ihrer Diplomarbeit erzeugt hat, unterstützen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und bekräftigen die zentrale Rolle des GxxxG-Motivs in der Prozessierung von APP.

3.7. GxxxG-Motive in der Fibrillenbildung von A β

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass A β 42-Peptide mit einer GxxxG-Mutation zwar höhere SDS-stabile Oligomere bilden, aber nur kürzere Fibrillen formen können. Besonders Peptide mit einer Mutation an dem Glycinrest G33 verhindern die Fibrillenbildung. Vermutlich ist die Konformation dieser Peptide in einer Weise verändert, die zwar die Oligomerisierung zulässt, aber die fortschreitende Aggregation zu Fibrillen unterbindet. Durch die Zugabe des inhibitorischen Peptids konnte indirekt geschlossen werden, dass dieses Peptid nur an das intakte, wildtypische GxxxG-Motiv bindet und die Aggregation erschwert. Dieses Ergebnis zeigt, dass die GxxxG-Motive im A β notwendig sind, um lange Fibrillen auszubilden.

Vincent Marchesi postulierte in einer theoretischen Betrachtung, dass das A β -Peptid neurotoxisch sein könnte, so lange es noch in der Membran eingebettet ist (Marchesi, 2005). Dort könnte es lateral diffundieren und über die GxxxG-Motive die Interaktion anderer Transmembransequenzen und folglich verschiedene Signaltransduktionswege behindern. Sein Modell kann allerdings nicht erklären, warum das Fragment p3 nicht die gleiche Neurotoxizität ausübt wie A β . Eine experimentelle Arbeit zu den GxxxG-Motiven in A β konnte zeigen, dass die Punktmutationen G29L und G33L die Toxizität von A β 42 fast vollständig aufheben konnten (Kim et al., 2005b). Die Toxizität der Peptide scheint also auch von den GxxxG-Motiven abhängig zu sein. Folglich zeigen A β -Peptide mit GxxxG-Mutationen eine veränderte Konformation und sind nicht toxisch. Diese Befunde zusammen mit den Ergebnissen dieser Arbeit weisen darauf hin, dass A β 42-wt durch eine GxxxG-bedingte Konformation toxisch ist.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass das G₂₉xxxG₃₃-Motiv in zweifacher Hinsicht die Entstehung der Alzheimer Krankheit unterstützt. Erstens vermittelt es die Dimerisierung der APP-Transmembransequenz solange die Transmembransequenz in die Membran eingebettet ist und eine α -helikale Konformation hat. In diesem Fall entscheidet das GxxxG-Motiv über die Entstehung von A β 42. Zweitens unterstützen die Glycinreste im A β -Peptid die Aggregation und die Fibrillenbildung. Den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zufolge würde die Alzheimer Krankheit nicht existieren, wenn die APP-Transmembransequenz an Stelle des Glycins G33 ein Alanin tragen würde.

3.8. Diagnose und Therapie der Alzheimer Krankheit

3.8.1. Diagnostik basierend auf dem γ -Sekretase Schnittmechanismus

Die Möglichkeit, frühzeitig die Alzheimer Krankheit sicher zu diagnostizieren ist notwendig, um erste Therapiemaßnahmen ergreifen zu können. So kann versucht werden, die neuronale Degeneration frühzeitig zu verhindern. Mit dem in dieser Arbeit aufgestellten Schnittmechanismus der γ -Sekretase wird postuliert, dass das Fragment A β 42 eine Zwischenstufe im gewöhnlichen Abbau der APP-Transmembransequenz ist und aufgrund der verhinderten sequentiellen Proteolyse nicht weiter prozessiert wird. Dabei würde in der A β 42-Produktlinie auf A β 42 die Entstehung von A β 38 und A β 35 folgen. Folglich sollten die A β 42-, A β 38- und A β 35-Mengen direkt voneinander abhängig sein. Wird die A β 42-Menge erhöht, so muss dies mit einer Verringerung der A β 38-Menge einhergehen. Wird weniger A β 38 aufgrund einer verstärkten A β 42-Produktion generiert, so muss auch der A β 35-Spiegel sinken. Dieser Befund impliziert, dass eine sichere Diagnose der Alzheimer Krankheit durch die Quantifizierung der A β -Mengen dieser einen Produktlinie gestellt werden kann. Es sollte labormedizinisch möglich sein, aus Cerebrospinalflüssigkeit oder aus Blut das Verhältnis von A β 42 zu A β 38 zu bestimmen. Ein bestimmtes Verhältnis würde dann anzeigen, dass eine durchschnittlich gute Prozessierung von APP vorliegt und der Patient gesund ist. Erreicht das Verhältnis A β 42 zu A β 38 einen Schwellenwert, würde dies anzeigen, dass die γ -Sekretase durchschnittlich häufiger die sequentielle Proteolyse nicht beenden kann. Dies würde bedeuten, dass sich der Patient in einem frühen Stadium der Alzheimer Krankheit befindet. Steigt das Verhältnis zunehmend an, würde dies bedeuten, dass der Verlauf der Alzheimer Krankheit fortschreitet. Gleichermaßen könnte man diesen Nachweis nutzen, um den Erfolg einer Therapie bei einem Patienten zu verfolgen. Diese Idee zur Diagnostik der Alzheimer Krankheit wurde unter der Nummer EP06011829 zum Patent angemeldet.

3.8.2. Therapie basierend auf der Transmembransequenz Dimerisierung

Eine Therapie von Morbus Alzheimer, die an den Ursachen der Krankheit ansetzt, existiert gegenwärtig nicht. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zum GxxxG-Motiv zeigen jedoch die Möglichkeit für einen neuen Ansatzpunkt einer Therapie auf. Wenn die Dimerisierung der APP-Transmembransequenz über die Glycinreste G29 und G33 der Auslöser zur Bildung von A β 42 ist, so müsste ein Weg gefunden werden, die Stärke der Dimerisierung gezielt

herabzusetzen. Dadurch könnte direkt die Entstehung des neurotoxischen Peptids A β 42 unterbunden werden bzw. die vollständige Proteolyse des A β -Peptids unterstützt werden.

Wie einleitend beschrieben sind NSAIDs in der Lage, die Prozessierung der γ -Sekretase zu modulieren und eine reziproke Veränderung der A β 42- und A β 38-Mengen zu erzeugen (Kukar et al., 2005; Weggen et al., 2001). Diese reziproke Veränderung wurde auch bei den GxxxG-Mutanten beobachtet. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit könnten NSAIDs die Prozessierung modulieren, indem sie Dimer-stabilisierend oder -destabilisierend wirken. Bislang wird angenommen, dass NSAIDs an den γ -Sekretase-Komplex binden (Weggen et al., 2003). Es wäre möglich, dass NSAIDs durch diese Bindung eine Konformationsänderung des Enzyms erzeugen, das dann bevorzugt dimerisiertes oder monomerisiertes Substrat prozessiert. Darüber hinaus wäre es denkbar, dass zumindest einige NSAIDs direkt an die APP-Transmembransequenz binden und die Stabilität des Dimers beeinflussen. Erste Ergebnisse aus BIAcore-Messungen bestätigen diese Vermutung: Dr. Carina Treiber konnte bereits eine Bindung von Fenofibrat und Sulindac-Sulfid an A β 42 nachweisen (Dr. Carina Treiber, persönliche Mitteilung). Interessant ist dabei, dass Sulindac-Sulfid die A β 42-Entstehung senkt und die A β 38-Menge erhöht, während Fenofibrat den gegenteiligen Effekt bewirkt.

Allgemein könnten Substanzen, die die Dimerisierung der APP-Transmembransequenz destabilisieren, als Therapeutikum in Betracht gezogen werden. Dies könnten Peptide oder niedermolekulare Substanzen sein, die vermutlich teilweise hydrophobe Bereiche haben sollten, um sich in die Membran und an die APP-Transmembransequenz anlagern zu können. Die einmalige Struktur des APP-GxxxG-Motivs könnte dabei genutzt werden, um die spezifische Bindung der Substanzen an ausschließlich APP zu erreichen. Wenn das G₂₉xxxG₃₃-Motiv als Bindungsmotiv für eine therapeutische Substanz genutzt wird, so hat dies den Vorteil, dass vermutlich sogar die familiären Fälle der Alzheimer Krankheit mit dieser Substanz behandelt werden können, wie es sich in den Experimenten mit den FAD-Mutationen aus APP und PS-1 abzeichnet. Die Idee, basierend auf der Dimerisierung der APP-Transmembransequenz eine Therapie der Alzheimer Krankheit aufzubauen, ist in dem Patent Nummer EP06011829 enthalten.