

4. Zusammenfassung

Das A β -Peptid mit 42 Resten (A β 42) führt zur neuronalen Degeneration als Ursache der Alzheimer Krankheit. Es entsteht durch die Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins (APP) durch die β - und γ -Sekretasen. Neben A β 42 werden auch weitere A β -Spezies unterschiedlicher Länge gebildet.

APP kann über zwei Stellen der Ektodomäne dimerisieren. Eine dritte Dimerisierungsstelle wird von drei konsekutiven GxxxG-Motiven in der APP-Transmembransequenz gebildet, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, die GxxxG-Motive der APP-Transmembransequenz zu charakterisieren und den Einfluss dieser Motive auf die Dimerisierung und Prozessierung von APP selbst, dem Substrat der γ -Sekretase (APP-CTF) und dem A β -Peptid zu untersuchen. Weiterhin sollte der Einfluss der GxxxG-Motive auf die Oligomerisierung und Fibrillenbildung des A β -Peptids untersucht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass APP wie vermutet, eine dritte Dimerisierungsstelle in der Transmembransequenz enthält. Mittels FRET-Analysen konnte erstmals *in vivo* gezeigt werden, dass Volllängen-APP als Dimer vorliegt. Dabei beeinflussten GxxxG-Mutationen jedoch nicht die Dimerisierung des Volllängen-APP. Das bedeutet, dass die Dimerisierungsstellen der Ektodomäne zunächst über die GxxxG-Mutationen dominieren. Nach der Abspaltung der Ektodomäne durch die α - oder β -Sekretasen wurde jedoch nachgewiesen, dass APP-CTF ausschließlich über die GxxxG-Motive stabilisiert wird. Mit Hilfe eines bakteriellen Test-Systems konnte festgestellt werden, dass die Dimerisierung der Transmembransequenz von APP durch ein zentrales GxxxG-Motiv mit den Glycinresten G29 und G33 vermittelt wird. Der Einfluss einzelner Punktmutationen des GxxxG-Motivs auf die Prozessierung von APP wurde mittels A β 42-, A β 40- und A β 38-spezifischer ELISAs und Western Blot-Analysen untersucht. Danach führten GxxxG-Mutationen zu einer Verringerung der A β 42-Spiegel und einer Erhöhung der A β 38-Spiegel. Erst GxxxG-Mutationen, die die Stabilität des Dimers deutlich herabsetzten, verminderten auch die A β 40-Mengen. Darüber hinaus konnte mittels MALDI-MS-Analysen nachgewiesen werden, dass GxxxG-Mutationen die Entstehung kürzerer A β -Fragmente wie A β 37, A β 35 und A β 34 begünstigten. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte ein Modell-Mechanismus zur Entstehung von A β entwickelt werden. Darauf basierend konnte die Theorie aufgestellt

werden, dass die Dimerisierung der APP-Transmembransequenz ein Risikofaktor für die Entstehung der Alzheimer Krankheit ist. Diese Daten wurden im „The EMBO Journal“ veröffentlicht (Munter et al., 2007).

Darüber hinaus wurde die Prozessierung von APP-GxxxG-Mutanten in Kombination mit Mutationen, die familiäre Formen der Alzheimer auslösen (FAD-Mutationen), untersucht. Weder die schwedische oder die arktische Mutation im APP, noch die untersuchten FAD-Mutationen im PS-1 konnten die Effekte der GxxxG-Mutanten kompensieren.

Der Einfluss der GxxxG-Motive auf A β wurde mit synthetischen A β 42-Peptiden untersucht. Es wurde gezeigt, dass Peptide mit einer Mutation am Glycinrest 33 höhere SDS-stabile Oligomere formen, diese Peptide jedoch kürzere Fibrillen bilden als A β 42-Wildtyp.

Die Ergebnisse zeigen, dass GxxxG-Motive an der Pathogenese der Alzheimer Krankheit beteiligt sind. Solange die GxxxG-Motive in einer α -helikalen Konformation vorliegen und in die Membran eingebettet sind, fördern sie die Dimerisierung der Transmembransequenz und begünstigen die Bildung von A β 42. Sobald A β 42 eine β -Faltblatt-Konformation angenommen hat, verursachen die GxxxG-Motive die Aggregation der Peptide.

Nach dem in dieser Arbeit entwickelten Modell für den Mechanismus der A β -Entstehung führt eine verminderte Stabilität des APP-Transmembransequenz-Dimers zur Entstehung kürzerer A β -Spezies, indem der γ -Sekretase ermöglicht wird, APP-CTF über A β 42 bzw. A β 40 hinaus abzubauen. An diesem Modell können neue Ansätze für Diagnostik und Therapie der Alzheimer Krankheit abgeleitet werden, die teilweise bereits zum Patent angemeldet wurden.

Summary

The A β peptide with 42 residues (A β 42) contributes to cytotoxicity, amyloid accumulation, and neuronal degradation in Alzheimer's disease (AD). Processing of the amyloid precursor protein (APP) by β - and γ -secretases leads to the generation of A β peptides. Besides A β 42, other A β species with varying lengths are generated.

APP homodimerization is mediated by two different sites of the ectodomain. A third dimerization site is formed by three consecutive GxxxG motifs of the APP transmembrane sequence, as shown in this study.

Therefore, the aim of the present thesis was, to investigate the function of the APP GxxxG motifs by analyzing the effects on dimerization and processing of APP, the γ -secretase substrate APP-CTF and the amyloid- β peptides. Furthermore, the importance of the GxxxG motifs in oligomerization and fibril formation of the A β molecule was studied.

In this study, it was shown that APP has a third dimerization site within the transmembrane sequence, as expected. Based on a FRET approach, homodimerization of APP in living cells was demonstrated for the first time. Disturbance of the GxxxG motifs did not influence full-length APP dimerization and thus GxxxG-mediated interactions may be crucial only for β - or α -secretase cleavage products of APP. It was shown, that β -CTF dimers are stabilized by GxxxG motifs. Investigations with a bacterial test system identified glycine residues G29 and G33 to constitute the core of the dimer interface. The impact of GxxxG mutants on APP processing was studied using A β 42-, A β 40- and A β 38-specific ELISAs and Western blot analysis. For GxxxG mutants, an inverse relationship between A β 42 and A β 38 generation was observed. A β 40 levels remained unaffected except for mutants which impaired the dimerization of the APP transmembrane sequence to a greater extent. Furthermore by using MALDI-MS analysis, GxxxG mutants led to increased levels of shorter A β species, that are, A β 37, A β 35 and A β 34. Based on these results, a model mechanism of the generation of A β was developed. It was hypothesized, that the APP transmembrane sequence dimerization is a risk factor for the onset of AD. This data was published in "The EMBO Journal" (Munter et al., 2007).

Additionally, GxxxG mutants were combined with known mutations that cause familial AD (FAD). Neither the Swedish or Arctic mutation in APP nor the studied FAD-PS-1 mutations

were able to rescue the effects of GxxxG mutants. Thus, the GxxxG effects are superior to the FAD-mutations in the amyloid cascade.

The importance of the GxxxG motifs within the A β molecule was studied by using synthetic peptides. It was shown, that mutations at Glycine residue 33 led to the formation of SDS-stable higher oligomers. Nevertheless these peptides showed impaired fibril formation compared to the wild-type.

The results show, that GxxxG motifs are involved in the pathogenesis of AD. As long as the APP transmembrane sequence is in an α -helical conformation and embedded within the membrane, the GxxxG motifs assist the dimerization of the transmembrane sequence and promote the generation of A β 42. As soon as the A β peptide has adopted a β -sheet conformation, the GxxxG motifs facilitate the aggregation of the peptides.

According to the model mechanism for the generation of A β a reduced dimerization strength of the transmembrane sequence facilitates the generation of shorter A β species by allowing the γ -secretase to proceed sequential cleavages beyond A β 42 and A β 40. Based on this model, new strategies for diagnosis and therapeutics of AD were developed and partially applied for a patent.