

# 1. Einleitung

## ***1.1 Die Alzheimer Krankheit und das Amyloid-Vorläuferprotein***

Die Alzheimer Krankheit („Alzheimer’s disease“, AD) ist eine degenerative, bisher nicht heilbare Erkrankung des zentralen Nervensystems. Nach fast einem Jahrhundert der Forschung wird diese Erkrankung erst heute in Ansätzen verstanden, jedoch ist offensichtlich das Altern selbst die wichtigste Ursache für ihre Entstehung. Betroffen sind schätzungsweise 7 – 10% der über 65-jährigen und möglicherweise bis zu 40% der über 80-jährigen womit die AD die häufigste Form von Demenz im mittleren bis hohen Alter repräsentiert (Sisodia SS, 1999). Gegenwärtig sind weltweit schätzungsweise etwa 30 Millionen Menschen von der Krankheit betroffen, wobei die AD aufgrund der höheren Lebenserwartung in den westlichen Industrieländern vor allem dort auftritt. (Selkoe DJ, 2004). Mit weiter zunehmender Lebenserwartung wird sich auch die Zahl der an Alzheimer erkrankten Personen weiter erhöhen, so dass der Prävention und Behandlung eine immer größere Bedeutung zukommt.

Es handelt sich um eine sehr komplexe und genetisch heterogene Erkrankung, bei der man zwischen den sporadischen und den selteneren familiären Formen unterscheidet. Die meisten Patienten mit sporadischer AD zeigen im Verlauf ihrer 7. Lebensdekade klinische Anzeichen, wohingegen vererbte Fälle schon im mittleren Lebensabschnitt Demenz aufweisen. Alzheimerpatienten zeigen Ausfälle bezüglich Erinnerung, Sprache, Urteilsvermögen und Problemlösung. Mit fortschreitender Erkrankung werden auch psychotische Symptome wie Halluzinationen, Wahnvorstellungen und Apathie beobachtet. Alltägliche Tätigkeiten sind für Patienten ohne fremde Hilfe nicht mehr zu bewältigen und selbst die nahe stehenden Personen werden von den Betroffenen nicht mehr erkannt. Im späten Stadium sind die Patienten bettlägerig und inkontinent. Ursache für all diese Symptome sind Ausfälle der selektiv betroffenen Neuronen im Neokortex, Hippokampus, Amygdala, Anterior Thalamus, basalen Vorderhirn sowie bestimmten Hirnstammregionen (Sisodia SS, 1999).

Alois Alzheimer beschrieb 1907 in einem umfangreichen Bericht erstmalig eine Frau mittleren Alters, die unter erheblicher Beeinträchtigung des Erinnerungsvermögens und fortschreitendem Verlust kognitiver Fähigkeiten litt. Die Autopsie zeigte die

Präsenz von neurofibrillären Bündeln und senilen Plaques im Neokortex und Hippokampus. Diese so genannten amyloiden Ablagerungen wurden erstmalig von Virchow in der Mitte des 19. Jahrhundert beschrieben und als stärkeähnliche Substanz fehlinterpretiert. Tatsächlich ist der Hauptbestandteil der Plaques aber das A $\beta$ -Peptid, welches Mitte der 80er Jahre mit Hilfe der Proteinsequenzierung, als Fragment des Amyloid-Vorläuferproteins („Amyloid Precursor Protein“, APP) identifiziert wurde (Glennner GG and Wong CW, 1984, Kang J, et al., 1987, Masters CL, et al., 1985).

APP bildet zusammen mit den homologen „Amyloid Precursor Like Proteins“ (APLP1 und APLP2) die APP-Genfamilie in Säugern (Sprecher CA, et al., 1993, Wasco W, et al., 1992, Wasco W, et al., 1993). Zusammen mit Homologen in anderen Spezies besteht die Super-Genfamilie der Amyloid-Vorläuferproteine aus insgesamt 16 Mitgliedern (Bayer TA, et al., 1999, Coulson EJ, et al., 2000). Bei allen handelt es sich um Typ I Transmembranproteine, mit einer im Verhältnis zur intrazellulären Domäne größeren extrazellulären Domäne. APP und die APLP stellen Substrate für die als  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase bezeichneten Proteasen dar. Durch ihre Aktivität wird das A $\beta$ -Peptid aus APP freigesetzt, wobei die  $\beta$ -Spaltung die A $\beta$ -Entstehung initiiert (Haass C, 2004, Hussain I, et al., 1999, Li Q and Sudhof TC, 2004, Vassar R, et al., 1999, Yan R, et al., 1999). Die Prozessierung von APP ist ein überaus komplexer Vorgang und wird daher in Kapitel 1.3 noch ausführlich behandelt.

Auf der Ektodomäne, die den größten Teil von APP einnimmt, befinden sich angefangen mit dem Signalpeptid von AS 1-17 eine Reihe unterschiedlicher Domänen. Neben einer sauren und einer cysteinreichen Domäne gibt es spezifische Bindungsstellen für Heparin, Kupfer und Zink. Die Kupferbindung wird über die Histidine an Position 147, 149 und 151 vermittelt, wobei Kupfer (II) zu Kupfer (I), unter Oxidation der Cysteine an Position 144 und 158 und der Bildung einer neuen Disulfidbrücke, reduziert wird (Multhaup G, et al., 1996). Die Zinkbindung im Bereich der Aminosäuren 181-200 moduliert die Bindung von Heparin an APP sowie die Inhibition des Blutgerinnungsfaktors XIa über die ebenfalls auf der Ektodomäne befindlichen KPI (Kunitz-Typ Proteaseinhibitor) Domäne (Bush AI, et al., 1993, Multhaup G, et al., 1994).

APP kann über drei auf der Ektodomäne gelegene Interaktionsstellen in einem postulierten Reissverschlussverfahren dimerisieren, wodurch die Prozessierung (siehe Kapitel 1.3) beeinflusst wird (Scheuermann S, et al., 2001). Die Kontaktstellen

zwischen APP als Substrat und den Enzymen der Prozessierung sind allerdings noch nicht näher determiniert. Auch die Funktion, die APP im Organismus ausübt konnte bisher noch nicht eindeutig bestimmt werden, da APP defiziente Mäuse kaum Beeinträchtigungen zeigen (Zheng H, et al., 1995). Dagegen zeigen Studien zur funktionellen Redundanz bei Kombination der Deletionen von APP oder APLP1 zusammen mit APLP2 einen letalen Effekt (Heber S, et al., 2000).

## **1.2 Die $\beta$ -Sekretase (BACE)**

Für lange Zeit bestand Unklarheit darüber, welches Enzym die  $\beta$ -Sekretase-Aktivität vermittelt und somit für die Generierung des N-Terminus von A $\beta$  verantwortlich ist. Schließlich wurde 1999 in drei unabhängigen Studien BACE („ $\beta$ -Site APP Cleaving Enzyme“, synonym: BACE1, Asp2, Memapsin2) als neues und ungewöhnlicherweise membranständiges Mitglied der Aspartatproteasefamilie identifiziert (Hussain I, et al., 1999, Sinha S, et al., 1999, Vassar R, et al., 1999).

In Mäusen mit homozygoter Deletion des bace-Gens wird kein A $\beta$  generiert, was die bedeutende Rolle der  $\beta$ -Sekretase bei der Amyloidogenese unterstreicht (Luo Y, et al., 2001, Roberds SL, et al., 2001). Andererseits lässt sich eine erhöhte  $\beta$ -Sekretase Aktivität in sporadischen Alzheimerfällen beobachten (Holsinger RM, et al., 2002, Yang LB, et al., 2003). Die erhöhten BACE-mRNA Spiegel und die damit einhergehende Proteinexpression sind nicht auf Mutationen im ORF zurückzuführen, sondern sind eher mit einer Veränderung der Translationseffizienz zu erklären (Li R, et al., 2004, Rogers GW, Jr., et al., 2004).

BACE1 besteht aus 501 Aminosäuren und wird von 9 Exons codiert, die auf Chromosom 11 lokalisiert sind. Eine Verbindung zwischen zwei Polymorphismen die bei BACE1 auftreten und einem erhöhten Risiko für AD besteht scheinbar nicht (Murphy T, et al., 2001). Obwohl BACE1 durch die Generierung des  $\gamma$ -Sekretase Substrates  $\beta$ -CTF, eine entscheidende Rolle in der Alzheimerpathogenese spielt, gibt es keine genetische Verbindung zu Mutationen, die in familiärer oder sporadischer AD resultieren (Cruts M, et al., 2001). BACE1 ist wie sein hauptsächliches Substrat APP ein integrales Transmembranprotein (Transmembrandomäne: AS 455-480) des Typs I, welches durch eine N-terminale, 21 Aminosäuren umfassende Signalsequenz in das ER geschleust wird. Der Großteil des Proteins wird von der Ektodomäne (AS 21-460) eingenommen, auf der sich die beiden potentiell aktiven Aspartatreste an

den Positionen 93 und 289 befinden. Es besteht eine enge Verwandtschaft zu anderen Proteinen der Pepsinfamilie, die für gewöhnlich jedoch nicht membranständig sind, so dass BACE hier eine Sonderstellung einnimmt (Vassar R, et al., 1999). Auch BACE2 (DRAP, Asp1, Memapsin1) welches durch genomische Datenbanksuche als Homolog zu BACE1 identifiziert wurde, besitzt alle Merkmale einer typischen Aspartatprotease und zeichnet sich durch seine Membranständigkeit aus. Auf Proteinebene zeigt BACE2 zu BACE1 eine 64%ige Übereinstimmung und die AS im Bereich der aktiven Aspartate sind hochkonserviert (Acquati F, et al., 2000, Yan R, et al., 1999).

BACE1 ist auf Ebene der Proteinsequenz 30 – 37% homolog zu anderen Aspartatproteasen, wobei auch hier die Motive der aktiven Zentren hochkonserviert sind (-DTGS-, -DSGT-, Abbildung 1.1). Trotz dieser Homologie ist das Muster der Disulfidverbindungen ungewöhnlich für die Pepsin Familie, da typischerweise nur in der Primärsequenz benachbarte Cysteine Disulfidbrücken zueinander ausbilden. BACE besitzt jedoch drei intramolekulare Disulfidbrücken, die Cys<sup>216</sup> und Cys<sup>420</sup>, Cys<sup>278</sup> und Cys<sup>443</sup>, sowie Cys<sup>330</sup> und Cys<sup>380</sup> miteinander verbinden und dadurch die extrazelluläre katalytische Domäne stabilisieren. Des weiteren gibt es vier potentielle N-Glycosylierungsstellen an Asn<sup>153</sup>, Asn<sup>172</sup>, Asn<sup>223</sup> und Asn<sup>354</sup> (Haniu M, et al., 2000). Das Di-Leucin Motiv DDISLLK und die Phosphorylierung von Ser<sup>498</sup> am C-Terminus von BACE1 regulieren die korrekte intrazelluläre Lokalisation (Capell A, et al., 2000, Huse JT, et al., 2000, Walter J, et al., 2001). Die Cysteine der intrazellulären Domäne an den Positionen Cys<sup>478</sup>, Cys<sup>482</sup> und Cys<sup>485</sup> werden über eine Thioesterbindung palmitoyliert (Benjannet S, et al., 2001). Dadurch erhält BACE1 möglicherweise, wie der Mannose-6-Phosphat Rezeptor, einen zweiten Membrananker, was zu einer Reorganisation der zytoplasmatischen Domäne führt und zur korrekten Sortierung des Proteins beiträgt (Schweizer A, et al., 1996).

Durch Furin oder auch andere Prokonvertasen wird das Propeptid nach dem Erkennungsmotiv RXXR zwischen Position 45 und 46 abgespalten (Abbildung 1.2). Im Gegensatz zu anderen Proteasen wird BACE nicht als Zymogen synthetisiert. Durch das Propeptid werden Aspartatproteasen üblicherweise inaktiviert, wodurch eine strikte Regulierung gewährleistet wird, jedoch ist diese inhibitorische Wirkung im Fall von BACE eher gering. Vielmehr wird durch die Abspaltung des Propeptids die korrekte Faltung der katalytischen Domäne veranlasst (Shi XP, et al., 2001). So wurde auch gezeigt, dass BACE in Anwesenheit des Propeptids aktiv sein kann und

damit zur intrazellulären A $\beta$ -Produktion beiträgt (Bennett BD, et al., 2000, Creemers JW, et al., 2001).

Neben der Abspaltung des Propeptids scheint auch die Disulfidbrückenstruktur nicht essentiell für die Aktivität des Enzyms zu sein. Zwar entstehen durch Mutation der beteiligten Cysteine BACE-Formen deren Reifung und Aktivität beeinträchtigt sind, jedoch reift ein gewisser Anteil des Enzyms ganz normal und ist vollständig aktiv (Fischer F, et al., 2002).

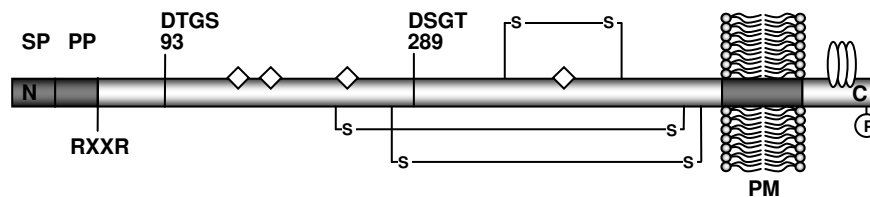


Abbildung 1.1

**Schematische Darstellung von BACE. Hervorgehoben sind die aktiven Aspartate an Position 93 und 289. Durch weiße Quadrate sind die potentiell glykosylierten Asparaginreste angedeutet (Asn<sup>153</sup>, Asn<sup>172</sup>, Asn<sup>223</sup>, Asn<sup>354</sup>). Die intramolekular verbundenen Cysteine sind durch schematische Disulfidbrücken dargestellt (Cys<sup>216</sup>-Cys<sup>420</sup>, Cys<sup>278</sup>-Cys<sup>443</sup>, Cys<sup>330</sup>-Cys<sup>380</sup>). Die palmitoylierten Cysteine Cys<sup>478</sup>, Cys<sup>482</sup> und Cys<sup>485</sup> sind durch weiße Ellipsen dargestellt. SP: Signalpeptid, (AS 1-21) PP: Propeptid (AS 21-46), PM: Plasmamembran, P: Phosphorylierung an Serin<sup>498</sup>.**

BACE tritt in 4 verschiedenen Spleissvarianten auf, die sich in ihrem Glykosylierungsmuster unterscheiden (Tanahashi H and Tabira T, 2001). Dies könnte direkten Einfluss auf die Substratspezifität und die Aktivität haben, da potentielle Schlüsselemente für die Enzymsubstratwechselwirkung durch das Spleissen wegfallen (Furnham N, et al., 2004). Wie alle Aspartatproteasen besitzt BACE eine flexible Region, welche essentiell für die Substratbindung, Selektivität und Aktivität ist (Leung D, et al., 2000). Wie eine Art Scharnier bringt sie das Enzym nach der Substratbindung von dem offenen in einen geschlossenen Zustand, wodurch das Substrat festgehalten und für die Proteolyse ausgerichtet wird (Dunn BM, 2002).

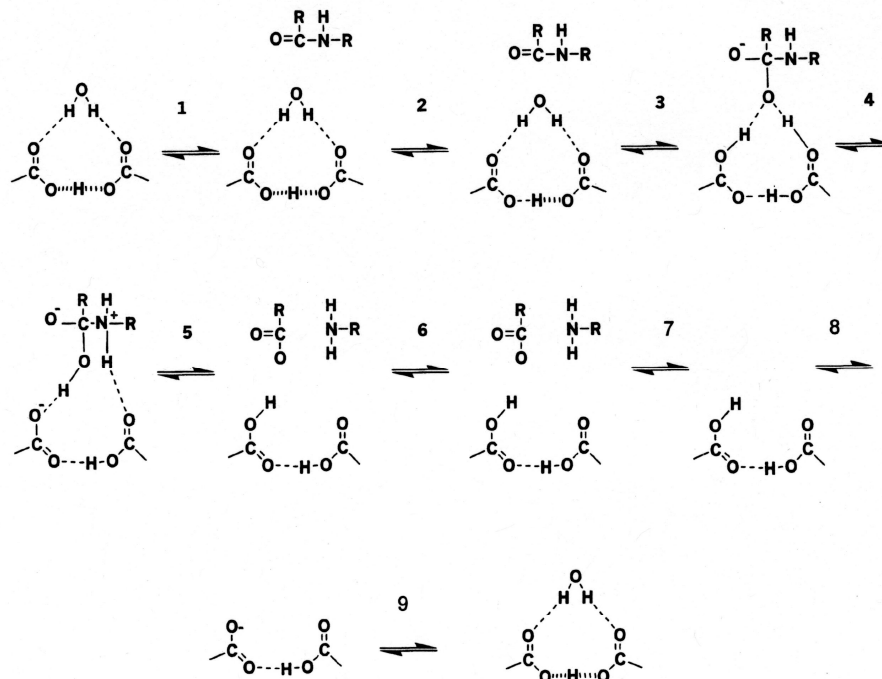


Abbildung 1.2

Mechanismus der Hydrolyse einer Säureamidbindung durch eine Aspartatprotease nach Northrop (Northrop DB, 2001). Als Nukleophil dient ein aktiviertes Wassermolekül, das durch die Aspartate entsprechend polarisiert ist. Im ersten Schritt wird das Substrat lose gebunden. Im zweiten Schritt erfolgt die korrekte geometrische Ausrichtung des Substrates zu den beteiligten Aspartaten und dem aktivierten Wassermolekül. Im dritten Schritt wird ein Proton vom Wasser abgespalten, wodurch der nukleophile Angriff auf den Carbonylkohlenstoff erleichtert wird. Der vierte Schritt stellt einen Protonentransfer auf den Stickstoff der Säureamidbindung dar, wodurch im fünften Schritt die Bindung schließlich aufgebrochen wird. Im sechsten Schritt öffnet sich das aktive Zentrum des Enzyms, so dass im darauf folgenden siebten Schritt die Produkte freigesetzt werden können. Anschließend deprotoniert im achten Schritt das Aspartat und durch Akquirierung eines Wassermoleküls in Schritt neun wird der Ausgangszustand wiederhergestellt.

Der Vorgang der Proteolyse erfolgt analog zu dem anderer Aspartatproteasen und erfordert die konzertierte Aktion zweier Aspartate, die ein Wassermolekül für den nukleophilen Angriff auf die Säureamidbindung aktivieren (Northrop DB, 2001). Der optimale pH-Wert für die Spaltung liegt für BACE bei etwa 4,5 (Sinha S, et al., 1999). Eines der Aspartate koordiniert die Deprotonierung des Wassers, wodurch der nukleophile Angriff auf den Carbonylkohlenstoff erleichtert wird. Durch einen

Protonentransfer auf den Stickstoff der Säureamidbindung wird die eigentliche Spaltung eingeleitet (Abbildung 1.2).

Als Substrate für BACE sind neben APP auch die APLPs sowie die Sialyltransferase ST6Gal-I und der P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1) beschrieben (Kitazume S, et al., 2003, Li Q and Sudhof TC, 2004, Lichtenthaler SF, et al., 2003). So wurde für BACE gezeigt, dass es die APLP2 Prozessierung *in vivo* moduliert. Im Falle von BACE-defizienten Mäusen konnte eine Reduktion der APLP2 Spaltprodukte gezeigt werden, wohingegen im transgenen BACE-Mausmodell eine verstärkte Prozessierung beobachtet wurde (Pastorino L, et al., 2004).

Neben diesen membranständigen Substraten wird auch A $\beta$  als Substrat erkannt und prozessiert (siehe Kapitel 1.3). Dieser Schnitt findet nur nach der vorausgegangen A $\beta$ -Produktion statt und erfolgt in einem anderen Kontext, da keine Übereinstimmung in der erkannten Primärsequenz besteht und das Substrat im Gegensatz zu APP nicht membranständig ist. Auch BACE2, welches eine andere Substratspezifität als BACE1 aufweist und APP in einen  $\alpha$ -ähnlichen Prozessierungsweg leitet, ist in der Lage A $\beta$ 1-40/42 zu A $\beta$ 1-34 umzusetzen (Fluhrer R, et al., 2003). Daraus lässt sich schließen, dass zwar unterschiedliche Erfordernisse für BACE1 und BACE2 hinsichtlich der Substraterkennung bei APP bestehen, die Voraussetzungen für die Spaltung des löslichen A $\beta$  Peptids jedoch sehr ähnlich sein müssen (Fluhrer R, et al., 2003). Insgesamt zeigt BACE hinsichtlich der Substraterkennung wenig Spezifität für die Primärsequenz, wie der Vergleich der  $\beta$ -Spaltstellen in APP und den APLPs zeigt, die in diesem Bereich keine überzeugende Homologie aufweisen (Li Q and Sudhof TC, 2004). Stattdessen wird die Enzym-Substrat-Wechselwirkung vermutlich durch andere Faktoren wie die Struktur der Erkennungs- und Spaltstelle, welche im APP  $\alpha$ -helikale Konformation aufweist (Sisodia SS, et al., 1990) und möglicherweise durch den Abstand zur Plasmamembran bestimmt (Li Q and Sudhof TC, 2004).

Interessant ist die Verwandtschaft zu Proteasen der retroviralen Familie. Diese sind deutlich kleiner und umfassen nur eine einzige Domäne, wohingegen die Mitglieder der Aspartatproteasefamilie eine zweilappige Struktur besitzen, die sich aus zwei einander sehr ähnlichen Domänen zusammensetzt. Möglicherweise sind die eukaryotischen Aspartatproteasen aus den phylogenetisch älteren Retropepsinen durch Genduplikation hervorgegangen, womit sich die Zweidomänenstruktur und die Homologie erklärt (siehe hierzu: Pfam (Protein families database of alignments and HMMs), Accession number: PF00026). Die Peptidasen der Familie A2

(Retropepsine), zu denen beispielsweise die HIV-1 Protease zählt, zeigen eine dimere Konformation (Weber IT, et al., 1989). Sie arbeiten nach dem oben dargestellten Mechanismus, wobei jeweils ein aktiver Aspartatrest von jedem Monomer an dem Mechanismus beteiligt ist.

### **1.3 Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins**

APP stellt die einzige Quelle für das amyloide A $\beta$ -Peptid dar, jedoch unterliegen auch die APLP der Prozessierung durch die  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase. In Abbildung 1.3 sind die wichtigsten Prozessierungsschritte von APP dargestellt.

Das Zusammenspiel der Sekretasen und deren Regulation wird bislang nur wenig verstanden. Vor allem die Maschinerie für die  $\gamma$ -Spaltung, die in der Plasmamembran stattfindet, ist überaus komplex und erfordert die Anwesenheit von Presenilin 1 (PS1), Aph1, Pen2 und Nicastrin (Wolfe MS, 2002). Den initialen Prozess bei der Amyloidentstehung stellt die proteolytische Aktivität an der  $\beta$ -Schnittstelle von APP dar. Das hierbei entstehende C-Terminale Fragment ( $\beta$ CTF) wird von dem  $\gamma$ -Sekretase Komplex innerhalb der Transmembrandomäne weiter prozessiert, wobei das 4kDa große A $\beta$  freigesetzt wird. Die  $\gamma$ -Sekretase bildet hierbei hauptsächlich zwei verschiedene C-Termini des A $\beta$ -Peptides wodurch sich die Längen zwischen 40 und 42 AS unterscheiden. Normalerweise liegen A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 in einem Verhältnis von etwa 90% zu 10% vor, jedoch kommt es bei familiären Alzheimerfällen häufig zu einer Verschiebung zugunsten von A $\beta$ 42 (siehe Kapitel 1.5) (Selkoe DJ, 2004). Diese amyloidogene Prozessierung unterscheidet sich von der sehr viel häufiger vorkommenden, nicht-amyloidogenen Prozessierung bei der kein A $\beta$  gebildet wird. Letzterer wird von der  $\alpha$ -Sekretase (ADAM10) eingeleitet und von der  $\gamma$ -Sekretase unter der Abspaltung des p3 Peptides, welches nicht an der Plaquebildung beteiligt ist, abgeschlossen (Lammich S, et al., 1999). In beiden Fällen entsteht AICD, welches im Komplex mit Fe65 und der Histon Acetyltransferase Tip60 in den Kern gelangt und bei der Genexpression aktiv ist (Cao X and Sudhof TC, 2001). Die Spaltung von APP kann folglich als ein durch Sekretasen vermittelter Signalübertragungs-mechanismus angesehen werden.

Neben der Entstehung von A $\beta$ 1-40, respektive A $\beta$ 1-42 werden auch verkürzte A $\beta$ -Formen beobachtet. Bei A $\beta$ 11-40 ist dies auf eine alternative  $\beta$ -Schnittstelle ( $\beta'$ )



zurückzuführen, was einen  $\alpha$ -ähnlichen Prozessierungsweg darstellt (Vassar R, et al., 1999, Yan R, et al., 1999).

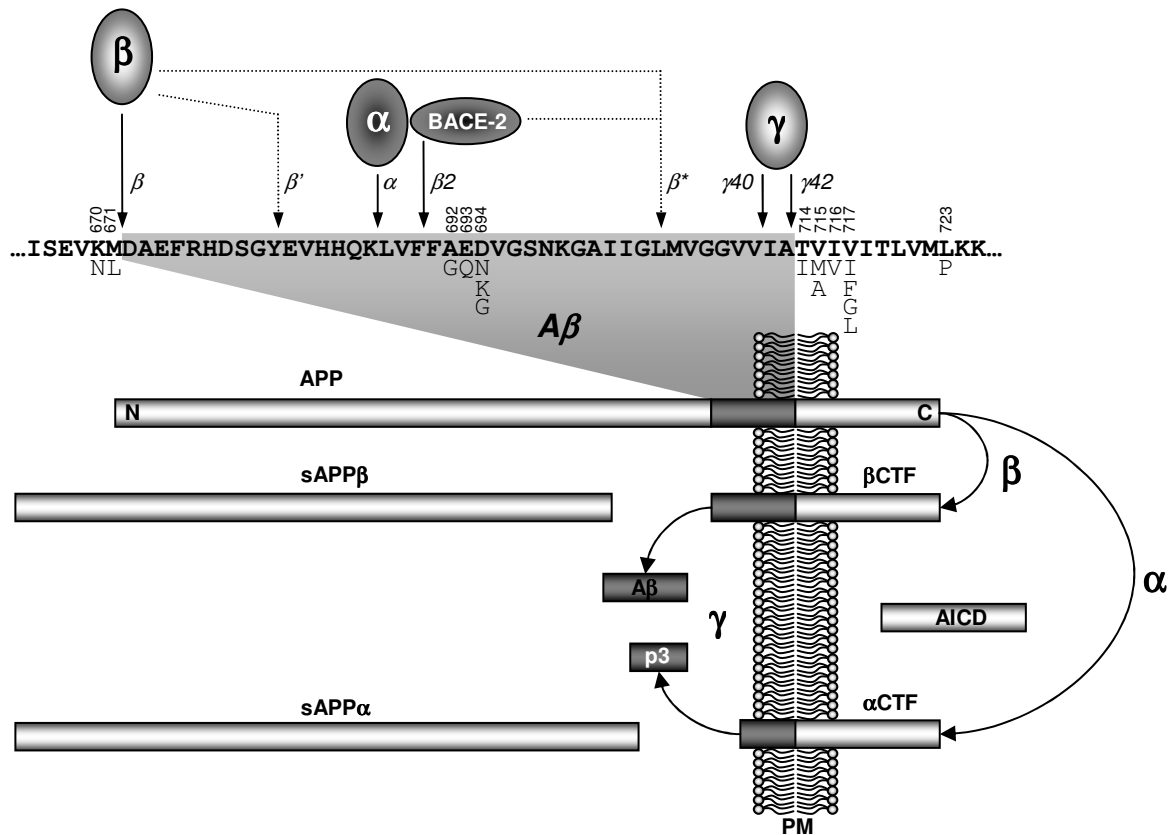


Abbildung 1.3

Prozessierungswege von APP. Das Volllänge APP<sub>770</sub> ist schematisch dargestellt, wobei die Sequenz der A $\beta$ -Region hervorgehoben ist und die Schnittstellen durch Pfeile gekennzeichnet werden. Mutationen wie sie bei familiärer AD auftreten, sind unterhalb und die Nummer der Codons (bezogen auf die APP<sub>770</sub> Nummerierung) oberhalb aufgelistet.  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  bezeichnen die entsprechenden Sekretasen und die kursiven Buchstaben die korrespondierenden Schnittstellen. N: N-Terminus, C: C-Terminus, sAPP $\beta$ :  $\beta$ -geschnittenes N-terminales Fragment (s: sekretiert), sAPP $\alpha$ :  $\alpha$ -geschnittenes N-terminales Fragment (s: sekretiert),  $\beta$ CTF:  $\beta$ -geschnittenes C-terminales Fragment,  $\alpha$ CTF:  $\alpha$ -geschnittenes C-terminales Fragment, AICD: „APP Intracellular Domain“, PM: Plasmamembran.

BACE2 zeigt weniger Präferenz für die BACE1 Schnittstelle und schneidet stattdessen deutlich effizienter an Pos F19/F20 innerhalb der A $\beta$  Sequenz, weshalb von einem  $\alpha$ -ähnlichen Prozessierungsweg gesprochen werden kann (Farzan M, et al., 2000, Yan R, et al., 2001). Tatsächlich spielt BACE2 bei der Amyloidogenese

eine untergeordnete Rolle, denn die A $\beta$ -Produktion ist gänzlich von BACE1 abhängig, was durch die Deletion von BACE1 belegt wird (Cai H, et al., 2001, Luo Y, et al., 2001, Roberds SL, et al., 2001).

Das A $\beta$ -Peptid wird *in vivo* sowohl von BACE1 als auch von BACE2 als Substrat erkannt und durch einen entsprechenden Schnitt nach Position 34 ( $\beta^*$ ) verkürzt. Da die hierbei entstehende A $\beta$  Spezies 1-34 kaum Aggregation zeigt könnte diese Form der  $\beta$ -Sekretase Aktivität unerwartet Einfluss auf die Auflösung der Amyloidplaques nehmen (Fluhrer R, et al., 2003).

### **1.4 Molekulare Ursachen der Alzheimer Krankheit**

Die Alzheimer Krankheit ist charakterisiert durch zwei Typen von Proteinaggregaten im Hirn. Zum einen sind dies intrazelluläre neurofibrilläre Bündel („neurofibrillary tangles“ NFT) aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein und zum anderen extrazelluläre amyloide Plaques die aus dem A $\beta$ -Peptid bestehen. Hieraus ergeben sich zwei Hypothesen zur Entstehung von AD.

Auf der einen Seite gibt es die Amyloid-Hypothese, nach der das A $\beta$ -Peptid Initiator einer pathologischen Kaskade ist. Diese führt zu amyloiden Plaqueablagerungen, NFT, neuronaler Dysfunktion, möglicherweise auch zu inflammatorischen Prozessen und letztendlich zur Demenz (Annaert W and De Strooper B, 2002). Amyloide Plaques unterscheidet man nach neuritischen und diffusen Typen, jedoch bestehen beide hauptsächlich aus Aggregaten des A $\beta$ -Peptids. Während neuritische Plaques aus unlöslichen A $\beta$ -Fibrillen bestehen, sind in diffusen Plaques in erster Linie nicht fibrillären Formen (Präamyloid) zu finden (Tagliavini F, et al., 1988, Yamaguchi H, et al., 1988). Neben den beiden Extremfällen der neuritischen und diffusen Plaques gibt es sämtliche Übergangsformen, in denen fibrilläre und nicht fibrilläre Formen in unterschiedlichen Verhältnissen zueinander vorkommen. Besonders A $\beta$ 42, welches viel stärker der Aggregation unterliegt als das kürzere und weniger hydrophobe A $\beta$ 40, ist der Hauptbestandteil der Ablagerungen in den diffusen Plaques (Iwatsubo T, et al., 1994). Da scheinbar ein Zusammenhang zwischen einem erhöhten kortikalen A $\beta$ 42-Spiegel und den kognitiven Ausfällen besteht, kann eine Verschiebung im Verhältnis von A $\beta$ 40 zu A $\beta$ 42 für die Krankheitsentstehung verantwortlich gemacht werden (Naslund J, et al., 2000). Obwohl die amyloiden

Plaques ein wichtiges Merkmal der Krankheit sind, korreliert der Krankheitsgrad kaum mit der Plaquedichte (Braak H and Braak E, 1991, Dickson DW, et al., 1995, Terry RD, et al., 1981). Stattdessen sind scheinbar hauptsächlich in Lösung vorliegende präfibrilläre A $\beta$ -Oligomere, die im Gehirn von Alzheimerpatienten massiv erhöht sind, für die toxischen Effekte verantwortlich (Gong Y, et al., 2003, Walsh DM, et al., 2002, Wirths O, et al., 2002).

Die Tau-Hypothese beschreibt die als intrazellulär in Neuronen auftretenden Ablagerungen von NFT als Auslöser der Krankheit. Diese bestehen aus helikal gewundenen, hyperphosphorylierten Tau-Proteinen. Durch die Hyperphosphorylierung entstehen unlösliche Formen des normalerweise gut löslichen, microtubuliassoziierten Proteins (Goedert M and Spillantini MG, 2000). Ablagerungen des Tau-Proteins beobachtet man aber vor allem auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen, was die Amyloid-Hypothese stark unterstützt. Es ist daher unwahrscheinlich, dass NFT ursächlich für die Entstehung der Alzheimer Krankheit sind und stattdessen eine Begleiterscheinung neuro-pathologischer Prozesses sind (Annaert W and De Strooper B, 2002, Hardy J, 2004, Selkoe DJ, 2001, 2004).

Als genetische Ursachen sind zahlreiche „missense“ Mutationen im APP und den Presenilinen zu nennen, welche unmittelbar die APP-Prozessierung beeinflussen wodurch entweder verstärkt A $\beta$  gebildet oder das Verhältnis zu A $\beta$ 42 verschoben wird (siehe Kapitel 1.5). Aus diesem Grund ist der entscheidende Ansatzpunkt für eine therapeutische Strategie generell den kortikale A $\beta$ - und im besonderen den A $\beta$ 42-Spiegel zu senken (De Strooper B and König G, 2001). Dennoch bleibt die präzise Verbindung auf molekularer Ebene zwischen dem A $\beta$ -Peptid und der neuronalen Dysfunktion bisher verborgen, wenngleich A $\beta$  mit Porenbildung in Membranen, gestörter Kalziumhomöostase, Apoptose sowie der Generierung von Radikalen und anderen toxischen Prozessen in Verbindung gebracht werden kann (Small DH, et al., 2001).

### ***1.5 Genetische Ursachen der Alzheimer Krankheit***

Der Anteil familiärer Alzheimerfälle beträgt Schätzungen zufolge 10% – 40%, wobei der Anteil von Mutationen im APP (Abbildung 1.3) mit einem Gesamtanteil von 0,1% verschwindend gering ist (Selkoe DJ, 2004).

Bei den familiären Formen der AD unterscheidet man zwischen „early onset“ (EOAD), also einem frühen Auftreten der Krankheit bereits in der 4. – 5. Lebensdekade und entsprechend späterem Eintreten, dem „late onset“ (LOAD). Üblicherweise sind Mutationen, welche die Preseniline betreffen, verantwortlich für die früh bis sehr früh auftretenden Alzheimerfälle zwischen dem 35. und 60. Lebensjahr (Levy-Lahad E, et al., 1995, Rogaev EI, et al., 1995, Sherrington R, et al., 1995).

Alle Mutationen, die den A $\beta$ -Bereich flankieren, beeinflussen direkt die Prozessierung von APP durch die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase, so dass mehr A $\beta$  bzw. mehr A $\beta$ 42 gebildet wird. Beispielsweise bewirkt die „swedish“ Doppelmutation im Bereich der  $\beta$ -Schnittstelle (Codons 670/671, KM zu NL) eine erhöhte BACE-Aktivität. Auf diese Weise steht mehr Substrat ( $\beta$ CTF) für die  $\gamma$ -Sekretase bereit und es wird mehr A $\beta$  gebildet (Cai XD, et al., 1993, Johnston J, et al., 1994), was in dem entsprechenden Mausmodell zu Plaqueablagerungen führt (Sturchler-Pierrat C, et al., 1997). Mutationen der  $\gamma$ -Schnittstelle wie unter anderem in Codon 717, sowie der Preseniline führen zu einer Verschiebung im A $\beta$ 40/A $\beta$ 42 Verhältnis zugunsten von A $\beta$ 42 (Maruyama K, et al., 1996). Mutationen, die in Nachbarschaft zur  $\alpha$ -Schnittstelle auftreten, verursachen eine weniger effiziente Prozessierung durch die  $\alpha$ -Sekretase, so dass APP bevorzugt in den amyloidogenen Weg geleitet wird.

Des Weiteren gibt es Mutationen innerhalb der A $\beta$  Region, welche die Aggregation direkt beeinflussen (Levy E, et al., 1990). Mutationen, die in A $\beta$ -Überproduktion oder verstärkter A $\beta$ -Aggregation resultieren, sind für die meisten EOAD Fälle verantwortlich (Rubinsztein DC, 1997, Vassar R and Citron M, 2000). Über die genetischen Ursachen der LOAD ist hingegen nur wenig bekannt. Allerdings wird das  $\epsilon$ 4 Allel des Apolipoproteins E (ApoE), welches an A $\beta$  binden kann, als Risikogen mit LOAD in Verbindung gebracht. Dennoch sind die bei ApoE auftretenden genetischen Polymorphismen keine deterministischen Faktoren, sondern stellen lediglich ein erhöhtes Risiko dar, an Alzheimer zu erkranken (Saunders AM, et al., 1993, Strittmatter WJ, et al., 1993).