

2. Zielsetzung der Arbeit

Die Spaltung von APP durch BACE ist der entscheidende Schritt der Amyloidogenese, da APP erst dadurch für die Prozessierung durch die γ -Sekretase zugänglich wird. Da BACE-defiziente Mäuse überdies kaum Beeinträchtigungen aufweisen, stellt die β -Sekretase ein ideales therapeutisches Ziel dar (Luo Y, et al., 2001). Aus diesem Grund ist das Verständnis der Interaktion zwischen BACE und APP von größter Bedeutung. Hierbei sind Erkenntnisse über die Struktur von BACE von großem Nutzen.

Ansätze zur Strukturaufklärung von BACE wurden bisher mit löslichen, nichtglykosylierten Formen durchgeführt, die ohne Transmembran- und zytoplasmatische Domäne exprimiert wurden (Bruinzeel W, et al., 2002, Hong L, et al., 2000, Hong L, et al., 2002). Diese löslichen Formen von BACE zeigen wenig Substratspezifität und unerwartet niedrige Umsatzraten für die Substrate APPwt und APPswe (Gruninger-Leitch F, et al., 2002). In allen Fällen wurde lediglich die katalytische Domäne untersucht wobei man die Rolle der Transmembrandomäne und die des C-Terminus außer Acht ließ. Während die katalytische Domäne ausschließlich als Monomer vorliegt, gibt es für das Vollängenproteine Hinweise auf eine dimere Konformation (Marlow L, et al., 2003, Sidera C, et al., 2002). Überwiegend wird BACE in der Literatur jedoch als Monomer beschrieben.

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel diesen Widerspruch aufzuklären. Hierzu sollten humane Hirnproben auf die Anwesenheit und biochemischen Eigenschaften des potentiell vorhandenen Dimers untersucht werden. Falls sich das Dimer nachweisen lässt, sollte es mittels immobilisiertem Proteaseinhibitor mit der monomeren Ektodomäne hinsichtlich der Stabilität der Bindung verglichen werden.

Um das Dimermodell weiter zu untersuchen, sollten die beiden potentiell aktiven Aspartate an den Positionen 93 (-DTGS-) und 289 (-DSGT-) durch gerichtete Mutagenese zu Alanin getauscht werden. Da alle Aspartatproteasen zur Aktivitätserhaltung auf die Anwesenheit von zwei Aspartaten angewiesen sind, wäre schon durch das Wegfallen eines Aspartatrestes eine Inaktivierung zu erwarten. Ausgehend von den Hinweisen, dass BACE als Dimer vorkommt kann es jedoch nicht als gesichert angesehen werden, dass beide benötigten Aspartate innerhalb eines Moleküls lokalisiert sind. So sind beispielsweise alle bekannten Retropepsine als nichtkovalente Dimere mit identischen Untereinheiten aktiv, wobei diese aus nur

jeweils einer Domäne mit einem -DTGA- Motiv bestehen. Zwei Monomere lagern sich mit dem C-Terminus zum N-Terminus zusammen und bilden so das aktive Dimer (Wlodawer A and Gustchina A, 2000). Eine vergleichbare Konstellation wäre auch für BACE denkbar, wenngleich es hier durch die Zweidomänenstruktur zwei potentiell aktive Aspartatreste je Untereinheit gibt. Durch den Austausch der Aspartate sollten wahlweise jeweils eine oder beide Hälften des Enzyms inaktiviert werden. Mit Hilfe entsprechender BACE-Mutanten sollte die Frage geklärt werden, ob BACE als Monomer oder als Dimer aktiv ist und welche Aspartate tatsächlich an der Spaltung beteiligt sind.

Die nächste Fragestellung beschäftigte sich damit, wie die monomere Ektodomäne in einer dimeren Form untersucht werden kann. Hierzu sollten am C-Terminus des verkürzten Proteins mehrere aufeinander folgende Aminosäuren gegen Cysteine ausgetauscht werden. Für diesen Bereich wird eine α -helikale Konformation vorhergesagt (Kapitel 4.6, Abbildung 4.10), so dass im Falle einer räumlichen Nähe zwischen den Untereinheiten mit großer Wahrscheinlichkeit Disulfidbrücken ausgebildet werden. Diese Ergebnisse könnten zum weiteren Verständnis der Dimerisierung beitragen, da es bisher keine Anhaltspunkte für eine homophile Interaktion über Kontaktstellen auf der Ektodomäne gibt.

In einer weiteren Studie sollte die Bindung der rekombinanten Ektodomäne an immobilisierte Metallionenchelator Komplexe untersucht werden. Durch IMAC-Bindungsstudien der rekombinanten Ektodomäne sollte eine eventuell vorhandene Bindungsstelle für divalente Kationen gefunden und charakterisiert werden. In Zellkulturexperimenten wurde der konzentrationsabhängige Einfluss von Kupfer auf die APP-Prozessierung bereits untersucht, wobei sich zeigt, dass eine Verschiebung zugunsten des nicht-amyloidogenen Abbauwegs stattfindet (Borchardt T, et al., 1999). Hierbei wäre es denkbar, dass BACE über Bindung von Metallionen reguliert wird.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit umfasste die Untersuchung einer möglichen Autoproteolyse von BACE. Aufgrund einer Sequenzhomologie, wie sie zwischen BACE1/APPwt und BACE2/APPswe besteht, könnte eine Autokatalyse an den folgenden Positionen angenommen werden:

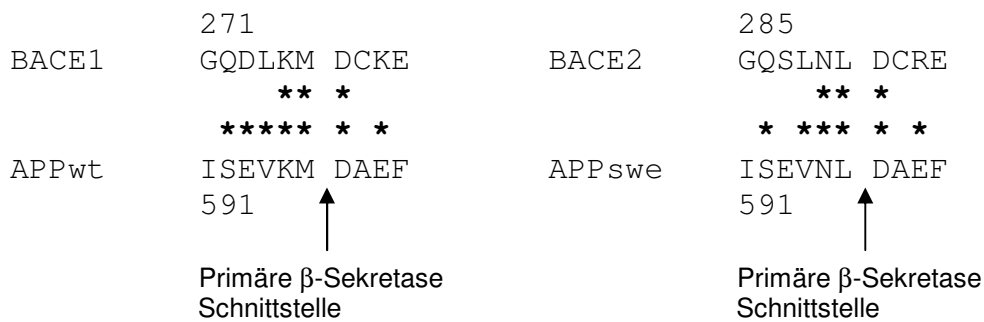


Abbildung 2.1

Die Sequenzanalyse zeigt Übereinstimmungen der Aminosäuren, die mit ** gekennzeichnet sind. Konservierte Reste werden durch * angedeutet (Nach Gene Stream Align). Das Motiv der β-Sekretase Schnittstelle in APPwt findet sich in BACE1 und die mutierte Sequenz der APP^{swe} Mutante in BACE2 wieder.

Im Fall einer autokatalytischen Spaltung ergäben sich Möglichkeiten zur Regulation der enzymatischen Aktivität. Da ein Schnitt an der putativen Spaltstelle das Enzym in zwei Einzeldomänen mit jeweils nur einem aktiven Aspartat zerteilen würde, wäre anzunehmen, dass das Enzym dadurch inaktiviert würde. Allerdings könnte auch eine einzelne Domäne in dimerer Form, ähnlich den Retropepsinen (siehe 1.2), aktiv sein, da so das Vorhandensein von zwei Aspartaten, die für den Spaltungsmechanismus essentiell sind, gewährleistet wäre.

Die Untersuchung des „β-Site APP cleaving enzyme“ unter dem Gesichtspunkt der Dimerisierung ist somit für das Verständnis der Funktionsweise des Proteins von entscheidender Bedeutung.