4. Ergebnisse

4.1 Mutagenese von BACE

Eine Zielsetzung dieser Arbeit war die Untersuchung der BACE-Aktivität nach Mutation der Aspartate innerhalb der aktiven Zentren. Durch gerichtete Mutagenese von BACE wurden die Aspartate der Positionen 93 und 289 nach Alanin ausgetauscht. Danach wurde durch Kombination der beiden Klone D93A und D289A die Doppelmutante D93/289A erzeugt.

Eine andere Fragestellung der vorliegenden Arbeit beschäftigte sich mit einer postulierten Autoproteolyse von BACE. Ausgehend von Sequenzhomologien zwischen APPwt und BACE1, sowie APPswe und BACE2 wurden die zur β-Schnittstelle homologen Aminosäuren an Position 275 und 276 von KM nach NL ausgetauscht. Damit wurde dieser Bereich in BACE der swe-Mutation in APP nachempfunden, wodurch eine bessere Spaltbarkeit erzielt werden sollte. Dagegen sollte der Austausch von M an Position 276 nach V bewirken, dass BACE nicht mehr gespalten werden kann. Dieses trifft auf eine entsprechende Mutantion der β-Schnittstelle in APP zu, so dass diese Annahme für BACE übernommen wurde.

Für die Untersuchung der BACE Ektodomäne (BACE-NT) wurde diese mit einem entsprechenden, nach Aminosäureposition 461 terminierenden Primer (B1-NT-NotI-rev) aus dem Volllängenkonstrukt amplifiziert. Das Valin an Position an 461 ist normalerweise die erste Aminosäure der Transmembrandomäne, stellt nun aber den C-Terminus des trunkierten Proteins dar. Da die Ektodomäne keine stabilen Dimere bildet, wurden durch gerichtete Mutagenese Cysteine an den Positionen 457-460 (QC), bzw. einzelne Cysteinaustausche an den Positionen 457, 459 und 460 eingeführt, wofür die entsprechend abgewandelten Primer verwendet wurden. Auf diese Weise wurden intermolekulare Disulfidbrücken zwischen zwei Monomeren erzeugt, so dass konstitutive Homodimere gebildet werden (siehe 4.6). In Abbildung 3.1 sind die erstellten Konstrukte schematisch dargestellt. Die Konstrukte in pBluescript dienten als Subklone zur Mutagenese, während die pCDNA3.1zeo Konstrukte der Expression in Säugerzellkultur dienten.

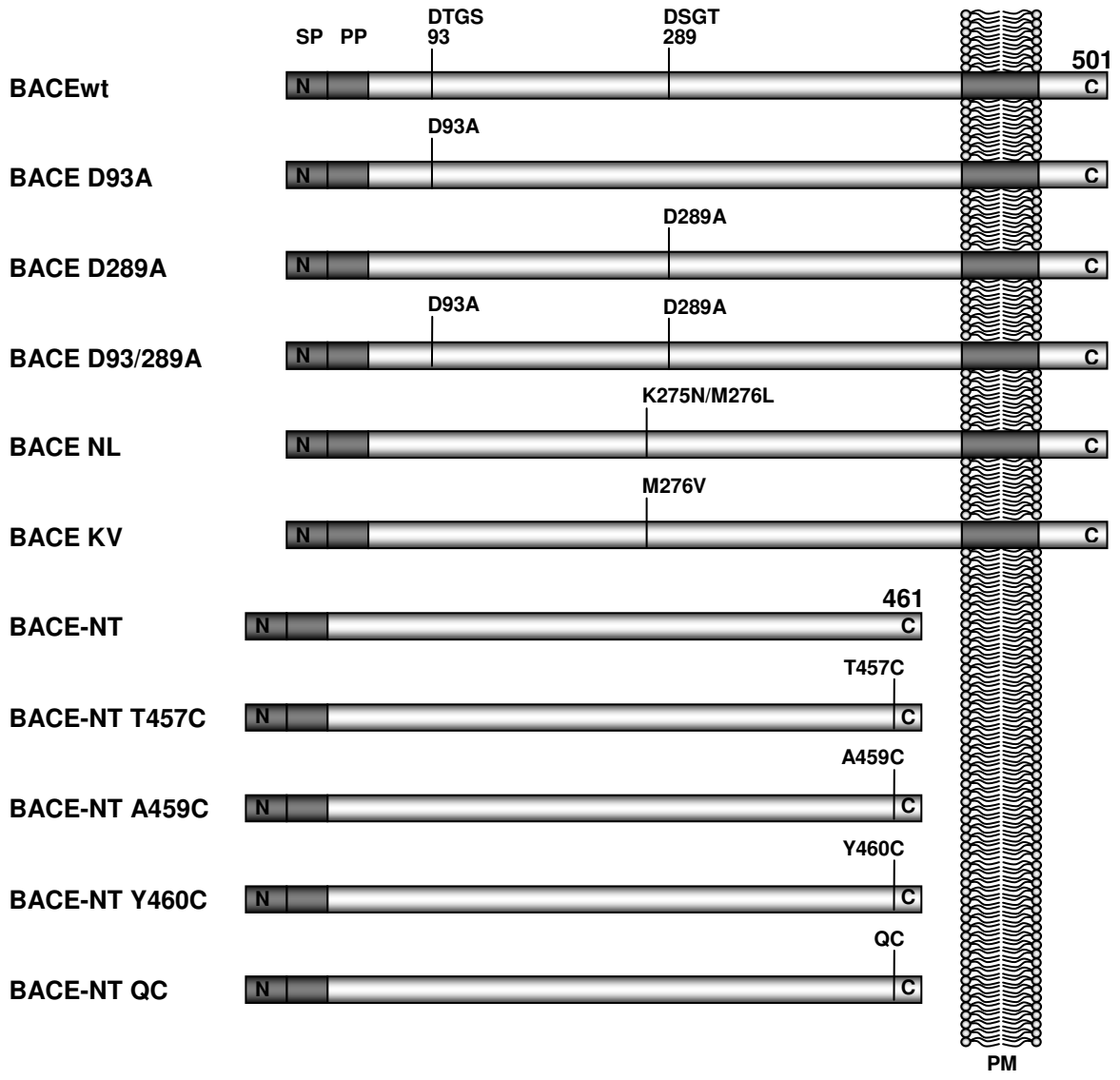

Abbildung 4.1

Schematische Darstellung der erstellten BACE Konstrukte. Alle BACE-NT Formen sind C-terminal trunkiert und enden mit AS 461. Sie sind nicht membranständig und werden von Säugerzellen in den Kulturüberstand sekretiert. BACE-NT Formen mit einzelnen Cystein-Mutation werden sowohl als Monomer, als auch als Dimer sezerniert. BACE-NT QC bildet überdies Oligomere. SP: Signalpeptid, (AS 1-21) PP: Propeptid (AS 21-46), PM: Plasmamembran, QC: Quadrupel Cysteinmutation.

Aus den BACE-NT Formen gehen lösliche, sekretierte Formen hervor, die im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden können, während alle anderen Klone membranständig sind und einen Zellaufschluss zum Nachweis der Expression erfordern (Kapitel 4.6).

4.2 BACE bildet Dimere im humanen Hirn

Die Experimente zu folgenden Ergebnissen wurden freundlicherweise von Andrea Schlicksupp durchgeführt.

BACE besitzt anders als die meisten anderen eukaryotischen, einzelkettigen Aspartatproteasen ungewöhnlicherweise eine Transmembranregion und eine C-terminale luminale Domäne. Das Expressionsmuster von endogenem BACE aus humanem Hirnhomogenat, welches durch eine Kombination aus „Dounce"-Homogenisation und Detergenzextraktion hergestellt wurde, zeigt einen beträchtlichen Anteil von BACE-Dimeren. Ein nahe liegender Grund dafür könnte das Vorhandensein der zusätzlichen luminalen Domäne und der Transmembranregion sein.

Unter Anwendung eines gegen den C-Terminus von BACE gerichteten Antikörpers GM168 wurden die detergenzlöslichen Bestandteile des 10.000 x g Überstands und die detergenzunlöslichen Bestandteile des 10.000 x g Sediments mittels Immunblot charakterisiert. Zusätzlich wurde das Sediment mit dem gegen das Propeptid gerichteten Antikörper GM190 analysiert. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abbildung 4.2 dargestellt. Der Antikörper GM168 zeigt sowohl im Überstand als auch im Sediment eine Doppelbande bei ~120/~135kDa, wohingegen eine zusätzliche ~110kDa ausschließlich im Sediment erscheint und hier auch vom Antikörper GM190 erkannt wird. Im Gegensatz zu der ~110 und ~135kDa Bande wird die ~120kDa Bande nicht von GM190 detektiert, woraus sich ableiten lässt, dass dieser Form das Propeptid fehlt. Den Größen entsprechend handelt es sich jeweils um dimere Formen. Da GM190 zwei der Dimerbanden erkennt, kann man daraus schließen, dass BACE bereits vor der Maturierung und Propeptidspaltung dimerisiert.

Der größte Anteil von BACE wird bei einem apparenten Molekulargewicht von 110kDa im Sediment detektiert, was mit der Größe des unmodifizierten, im endoplasmatischen Retikulum vorliegenden Dimer korreliert (Capell A, et al., 2000). Neben den dimeren Formen findet man außerdem eine ~65kDa Doppelbande, welche vor allem in der löslichen Fraktion auftritt und der monomeren Form entspricht. Diese charakteristische Doppelbande wird in Gegenwart von reduzierenden Agenzien üblicherweise detektiert (Huse JT, et al., 2000). Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um unterschiedliche Glykosylierungsmuster. Außerdem findet man im Sediment eine 53kDa Bande die wahrscheinlich eine unglykosylierte Spezies repräsentiert (Abbildung 4.2).

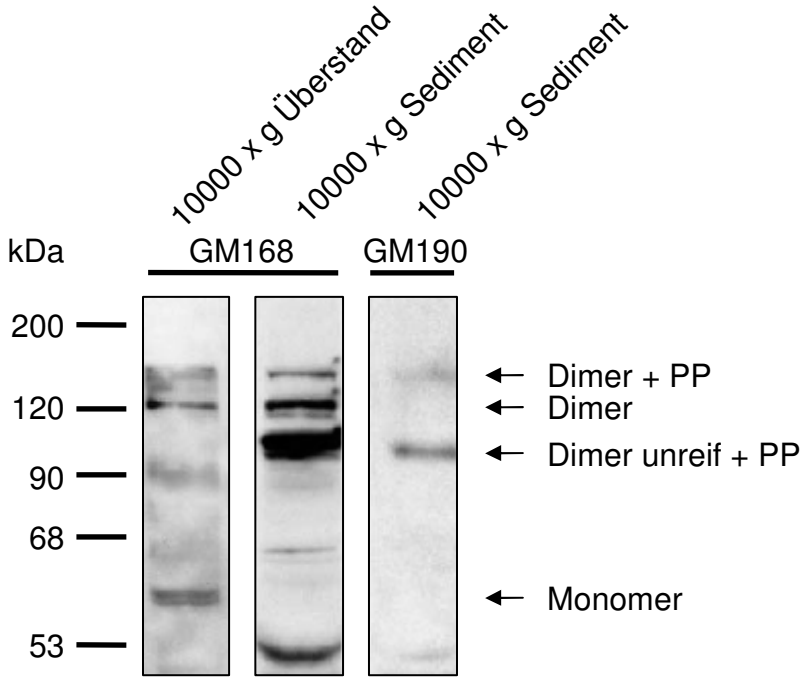

Abbildung 4.2

BACE Immunblot von Überstand (10.000 x g Überstand) und Sediment (10.000 x g Sediment) von Detergenz-solubilisiertem Hirnhomogenat. Die Detektion erfolgte mit dem C-terminal gerichteten, polyklonalen Antikörper GM168 und dem gegen das Propeptid gerichteten Antikörper GM190. Es sind durch die Detergenzbehandlung teilweise gelösten BACE-Dimere zu sehen (Dimer). Daneben erkennt man unreife (~110 kDa, Dimer unreif + PP) und reife (~135 kDa, Dimer + PP) BACE-Dimere, welche beide noch das Propeptid tragen, wie die Immunreaktivität mit GM190 zeigt. Die Doppelbande, welche das Monomer repräsentiert wird ausschließlich im Überstand gefunden. Die BACE-Formen, die das Propeptid tragen werden präferenziell im Sediment gefunden, wohingegen die reifen, dimeren Formen überwiegend im Überstand und im Sediment zu finden sind. Die Gelelektrophorese erfolgte unter reduzierenden Bedingungen. PP: Propeptid.

Bei der Untersuchung verschiedener Hirnregionen nach Gewebsaufschluss werden im Detergenzextrakt ebenfalls SDS-stabile Dimere gefunden. Insbesondere findet man BACE in Bereichen, welche für die Alzheimer Krankheit relevant sind. Hierzu zählen der frontale Kortex, occipitale Kortex sowie der Hippokampus. Dagegen sind im rostralen Pons nur noch geringe Mengen BACE detektierbar. Homogenate des Cerebellums und der Medulla Oblongata zeigen nahezu keine Immunreaktivität mit dem Antikörper GM168 (Abbildung 4.3).

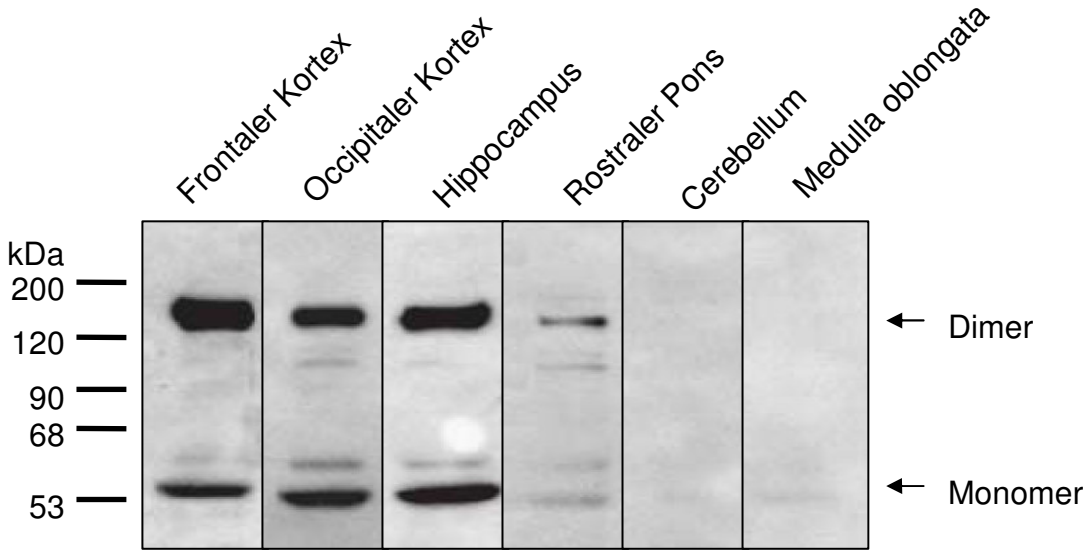

Abbildung 4.3

Immunblot verschiedener Hirnregionen nach Aufschluss und Detektion mit dem C-terminal gerichtetem Antikörper GM168. Monomer und Dimer sind durch entsprechende Beschriftungen gekennzeichnet. Die Gelelektrophorese erfolgte unter reduzierenden Bedingungen und die Detektion erfolgte mit dem Antikörper GM168.

Diese Daten lassen vermuten, dass BACE für die krankheitsrelevante Aβ-Produktion entscheidend ist. Dies steht im Einklang mit erhöhter BACE Aktivität während des Alterns in Hirnen verschiedener Spezies. Hierbei werden sowohl altersbedingte postranslationale Veränderungen, als auch eine allosterische Modulation der Enzymaktivität (Fukumoto H, et al., 2004) sowie die Bildung höherer Komplexe, die aktiver als das Monomer sind, diskutiert (Marlow L, et al., 2003). Auffällig ist, dass Monomer und Dimer sich in einem definierten Verhältnis zueinander befinden, dessen Regulation möglicherweise die Aktivität steuert.

4.3 Charakterisierung von BACE aus humanem Hirngewebe

Die Ionenaustauschchromatographie wurde freundlicherweise von Andrea Schlicksupp durchgeführt.

Um BACE anzureichern und gegebenenfalls eine Trennung zwischen Monomeren und Dimeren zu erzielen, wurde eine Ionenaustauschchromatographie durchgeführt und die erhaltenen Fraktionen mittels Immunblot analysiert. In Abbildung 3.4 ist das Elutionsprofil von BACE in einem von 550 – 800mM ansteigenden Kochsalzgradienten dargestellt.

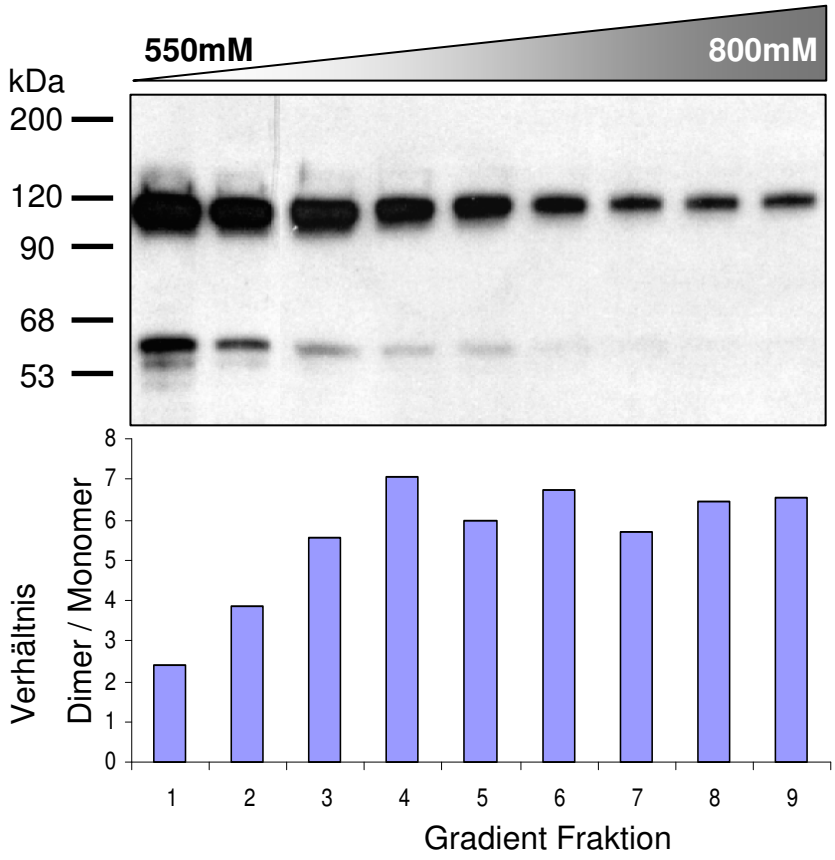

Abbildung 4.4

Detergenz solubilisierte Proteine wurden auf eine Q-Sepharose Säule geladen und in einem Kochsalzgradienten fraktioniert. Nach Analyse der Fraktionen auf einem 12,5%igen PA-Gel unter reduzierenden Bedingungen wurden im Immunblot mit dem Antikörper GM168 die BACE-haltigen Fraktionen ermittelt. BACE lässt sich in Fraktionen zwischen 550mM und 800mM NaCl (in Keilform dargestellt) nachweisen, wobei das Monomer bei geringeren Konzentrationen als das Dimer eluiert.

Das ~62kDa Monomer und auch unterrepräsentierte kleinere Spezies werden zunächst zusammen mit dem ~120kDa Dimer bereits in den ersten Fraktionen gefunden. Die vollständige Trennung des Dimers vom Monomer wird erst ab höherer Salzkonzentration möglich.

Da bei diesen Salzkonzentrationen keine Monomere auftreten, kann man ausschließen, dass die anfänglich eluierten Monomere aus der Dissoziation der Dimeruntereinheiten hervorgegangen sind und die Interaktion der Untereinheiten unempfindlich gegenüber hohen Ionenkonzentrationen ist. Die Quantifizierung des Verhältnisses von Dimer zu Monomer durch eine densiometrische Methode veranschaulicht die Zunahme des Dimeranteils mit steigender Salzkonzentration. Insgesamt erfolgt die Elution des Dimers verzögert gegenüber dem Monomer, so dass eine erhebliche Verschiebung der Ladungsverteilung auf der Oberfläche des Proteins angenommen werden muss, was mit der gegenüber SDS und hohen Salzkonzentrationen beobachteten Stabilität des BACE-Dimers korreliert (Abbildung 4.4).

Um die Stabilität und die Unterschiede in der Oberflächenladungsverteilung weiter zu analysieren, wurden die aus der der Ionenaustauschchromatographie des Hirnhomogenats gewonnenen Dimerfraktionen zusammengefasst und einer isoelektrischen Fokussierung unterzogen. Diese wurde freundlicherweise von Andrea Schlicksupp wie beschrieben durchgeführt (Schmechel A, et al., 2004). Der theoretische Wert für den isoelektrischen Punkt von BACE liegt bei einem pH-Wert von etwa 4,7. Die anschließende SDS-PAGE ermöglicht die Auftrennung in der zweiten Dimension (2D Gelelektrophorese). Die hierbei stark denaturierende Behandlung mit hohen Harnstoff- sowie SDS-Konzentrationen, überführte das BACE-Dimer teilweise in die monomere Form. Die zerstreuten Punkte, die im Molekulargewichtsbereich des Monomers auftreten, weisen auf unterschiedlich modifizierte Monomerspezies mit einer Größe von etwa 65kDa hin. Das Dimer zeigt einen isoelektrischen Punkt von etwa 4, wohingegen die Monomerspezies etwa bei pH 5 zu finden sind (Abbildung 4.5).

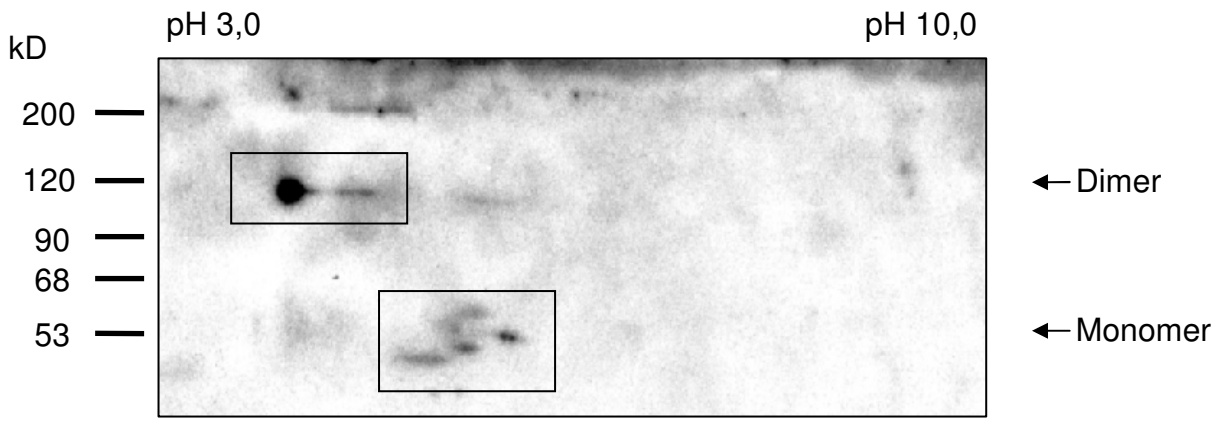

Abbildung 4.5

Analyse der Dimerfraktionen von Hirnhomogenaten nach Ionenaustauschchromatographie durch 2D Gelelektrophorese. Das-SDS stabile Dimer wird zum Teil in das Monomer überführt. Während der isoelektrische Punkt des Dimers in etwa der Vorhersage entspricht, weicht das Monomer davon ab. Dies weist auf posttranslationale Modifikationen hin, welche im Dimer durch die homophile Interaktion maskiert werden.

Diese Verschiebung des isoelektrischen Punkts der monomeren Formen gegenüber dem Dimer lässt auf unterschiedliche Ladungsverteilungen auf der Oberfläche schließen und deckt sich mit der Beobachtung unterschiedlichen Elutionsverhaltens bei der Ionenaustauschchromatographie.

Insgesamt kann man aus der Unempfindlichkeit des Dimers gegenüber hohen Salz- und Harnstoffkonzentrationen, nicht ionischen und ionischen Detergenzien sowie Hitzedenaturierung und reduzierenden Agenzien auf sehr starke intermolekulare Interaktionen schließen. Wahrscheinlich lassen die dramatischen Unterschiede in der Oberflächenladungsverteilung auf hydrophobe Bereiche im Inneren des Proteins schließen. Durch die Dimerisierung wird dieser Unterschied scheinbar noch verstärkt. Es ist überdies anzunehmen, dass die homophile Interaktion zwischen den BACE-Monomeren hydrophober Natur ist, da das Dimer deutlich fester an den Ionentauscher bindet. Dies erklärt sich durch die Vergrößerung des Verhältnisses von Oberfläche zu Ladung. Ein weiterer Aspekt, der für die hydrophobe Interaktion spricht, ist die Unempfindlichkeit des Dimers gegenüber hohen Salzkonzentrationen, da hierdurch in erster Linie hydrophile Wechselwirkungen gestört werden.

4.4 Affinitätschromatographie von BACE-Dimeren und monomerem BACE-NT

Durch Ionenaustauschchromatographie angereicherte BACE-Dimere aus Hirnhomogenat zeigten eine Bindung an Lentil-Lectin-Sepharose. Lentil-Lectin besitzt eine Präferenz für die Bindung von N-glykosidisch gebundener α-D-Glucose und α-D-Mannose. Außerdem wird eine starke Bindung von BACE an Heparin beobachtet, was die vermutete Ausrichtung der positiven Ladungen an der Oberfläche des Proteins weiter unterstützt (ohne Abbildung). Um zusätzliche Informationen über die Spezifität einer möglichen BACE-Inhibitor-Interaktion zu erhalten wurde über Ionenaustauschchromatographie angereichertes BACE mit Peptstatin-A-Agarose versetzt und die Bindungseigenschaften analysiert.

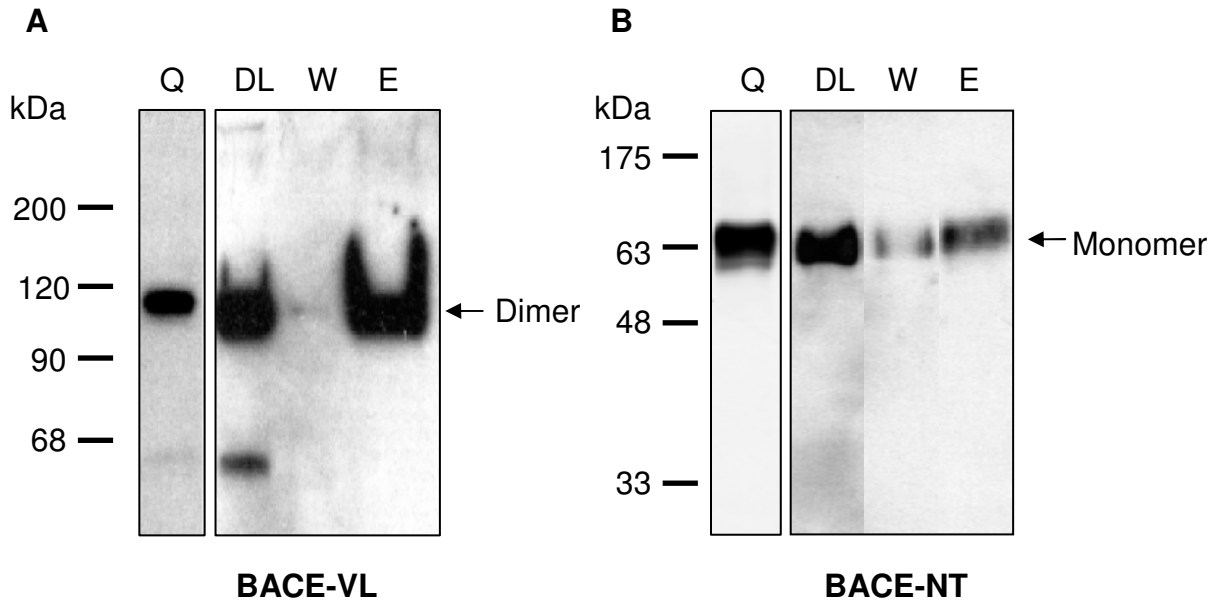

Abbildung 4.6

Bindung von BACE an Pepstatin-A-Agarose. Über Q-Sepharose (Q) angereichertes BACE-Dimer aus Hirnhomogenat (A), bzw. die rekombinante, monomere Ektodomäne aus Zellkulturüberstand (B) wurden in einer Affinitätschromatographie auf ihr Bindungsverhalten untersucht. Das Dimer wurde durch den polyklonalen, gegen den C-Terminus gerichteten Antikörper GM168 nachgewiesen, die monomere Ektodomäne durch den monoklonalen Antikörper BSC-1. Das meiste Dimer erscheint im Eluat, wohingegen die Ektodomäne überwiegen im Durchlauf zu finden ist. DL: Durchlauffraktion, W: Waschfraktion, E: Elutionsfraktion, BACE VL: Vollängen BACE, BACE NT: rekombinante BACE Ektodomäne.

BACE-Dimer Fraktionen aus der Ionenaustauschchromatographie des Hirnhomogenats zeigten nach der Bindung an Pepstatin-A neben der typischen Dimerbande eine ~62kDa Bande, welche dem Monomer entspricht, so dass eine teilweise Monomerisierung während der Inkubation mit Pepstatin-A-Agarose angenommen werden kann. Die Waschfraktion enthält nahezu kein BACE und in der Elutionsfraktion erscheint exklusiv Dimer (Abbildung 4.6, A).
Auffälligerweise ist keine Dimerbande bei der rekombinanten Ektodomäne aus Zellkulturüberstand zu sehen. Stattdessen erhält man aus Zellkulturüberstand nur das ~62kDa Monomer. Über Ionenaustauschchromatographie aus Zellkulturüberstand von 293 Zellen gereinigtes BACE-NT zeigt kaum Affinität zu immobilisiertem Pepstatin-A und befindet sich daher überwiegend in der Durchlauffraktion (Abbildung 4.6, B).
Offensichtlich ist also der Inhibitor Pepstatin-A für BACE Dimere ein besserer Bindungspartner als für das verkürzte, monomere BACE. Da Pepstatin-A die Bindungstasche des Enzyms besetzt, kann demnach davon ausgegangen werden, dass diese im Monomer nicht den Anforderungen für eine stabile Interatktion zwischen Enzym und Inhibitor genügt. Vielmehr scheint das Dimer diese Voraussetzungen zu erfüllen und mit dem Inhibitor in spezifischer Weise zu interagieren. Hieraus lässt sich folgern, dass BACE in dimerer Form an das Substrat bindet, was in Analogie zu der Inhibitorbindung steht.

4.5 Prozessierung von APP durch putative BACE-Dimere

Um der Frage nachzugehen ob die dimere Form von BACE im SH-SY5Y Zellkultursystem enzymatische Aktivität aufweist, wurden durch gerichtete Mutagenese Alanin Mutanten der potentiell aktiven Aspartate D93 und D289 erstellt. Ausgehend von der Hypothese, dass von BACE im Dimerverbund nur eines der -DTGS- / -DSGT- Motive genutzt wird und jeweils ein Aspartat je Monomer für den Spaltungsmechanismus zur Verfügung steht, sollte sich entsprechend β-prozessiertes APP im Zellkulturüberstand BACE D93A bzw. BACE D289A finden. Der Nachweis hierfür erfolgt mit dem Antikörper 879, der gegen das Neoepitop am C-Terminus von β-geschnittenem APP gerichtet ist, so dass nur von BACE prozessierte APP Formen erfasst werden.

Abbildung 4.7 zeigt das BACE Expressionsmuster in APP_{695} kotransfizierten SH-SY5Y Zellen. Neben Monomer und Dimer sind auch vermutlich unreife Formen, bzw. nur teilweise modifizierte Formen zu sehen. Die Überexpression wird ersichtlich durch starke Signale bei der partiell modifizierten Form. Offensichtlich ist die zelluläre Maschinerie zur posttranslationalen Modifikation ausgelastet, so dass das Protein nicht vollständig reifen kann. Das Dimer wird nur in Form des endogenen Signals sichtbar. Interessanterweise wird die Doppelmutante BACE D93/289A fast gar nicht prozessiert und größtenteils scheinbar sogar abgebaut. Im gewählten Gelsystem unter reduzierenden Bedingungen sind die Dimermengen zwischen allen Mutanten gleich. Tatsächlich ist sogar nicht mehr BACE-Dimer zu sehen als bei der Kontrolle (Abbildung 4.7).

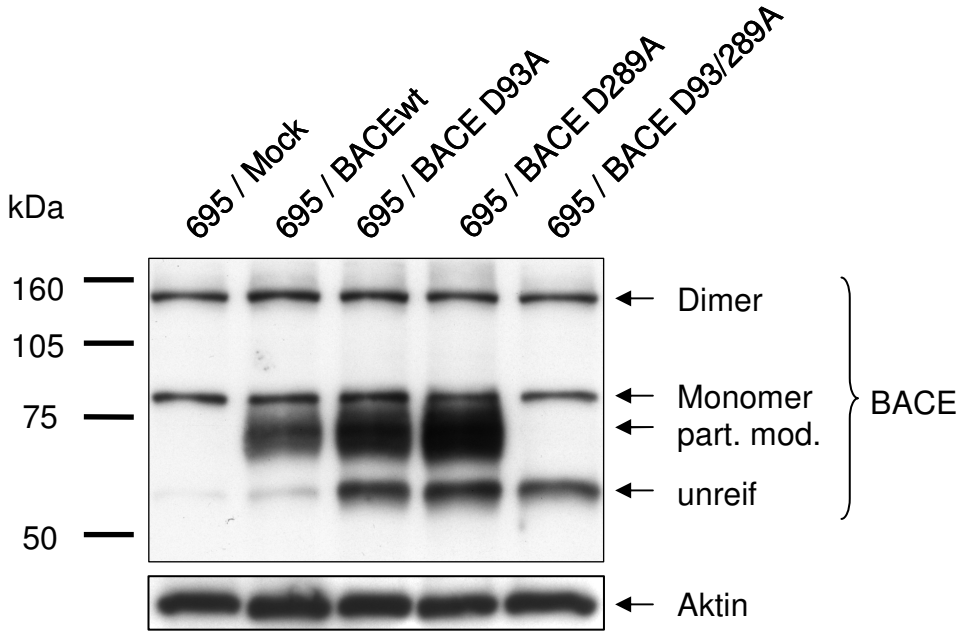

Abbildung 4.7

Expressionsmuster von APP / BACE kotransfizierten SH-SY5Y Zellen. BACE wurde aus Zellysat mit BSC-1 Antikörper detektiert. Es sind dimere (~120kDa) und monomere (~80kDa) Formen zu sehen. Außerdem gibt es Formen, die vermutlich unreif (~55kDa) und nur partiell modifiziert sind (~70kDa, part. mod.). Die Aktin Kontrolle zeigt, dass die Proteinmengen und folglich die Zellzahl für alle Ansätze gleich sind. Die Gelelektrophorese wurde mit einem 10%igen PA-Gel unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt.

Dennoch ist die Annahme, dass das Dimer für die Aktivität verantwortlich ist haltbar, da in einem Gelsystem unter nicht reduzierenden Bedingungen die Dimermengen mit der Überexpression übereinstimmen (Abbildung 4.8). Offensichtlich ist das Dimer des

rekombinanten Proteins nicht so stabil wie das der endogen exprimierte β-Sekretase. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich in der nicht vollständigen Prozessierung, so dass für die Dimerisierung wichtige Bereiche nicht ihrer finalen Form entsprechen. Als Konsequenz ist die Bindung nicht so stabil und wird nach Reduktion der Disulfidbrücken mit β-Mercaptoethanol unter Einwirkung von SDS aufgebrochen. Dies zeigt die Bedeutung der Disulfbrückenstruktur für die stabile Dimerisierung wenn die Glykosilierung nicht vollständig ausgeprägt ist. Überdies wird hierbei auch der Einfluss der Glykosylierung für die Dimerisierung deutlich, da umgekehrt das endogene BACE, welches vollständig modifiziert wurde auch unter reduzierenden Bedingungen stabile Dimere ausbildet.

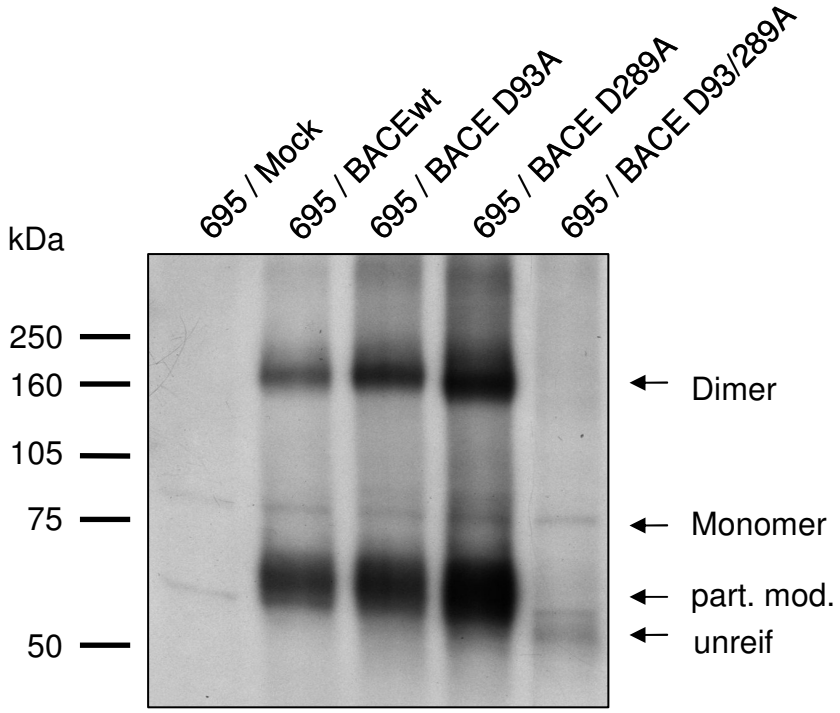

Abbildung 4.8

Lysate von APP / BACE kotransfizierten SH-SY5Y Zellen wurden unter nicht reduzierendem Bedingungen in einem 10%igen Gel aufgetrennt und nach Immunblot mit BSC-1 Antikörper analysiert. Da die Expositionszeit kurz war, ist das Signal des endogenen BACE-Dimers nicht sichtbar. Die Überexpression von BACE zeigt vor allem partiell modifizierte Formen (part. mod.) und Dimer. Die Doppelmutante BACE D93/289A zeigt kaum Signal.

Ausgehend von der Tatsache, dass sich endogenes und überexprimiertes BACE darin unterscheiden, dass das rekombinante Protein aus oben genanntem Grund nicht vollständig modifiziert werden kann, muss davon ausgegangen werden, dass

trotz des Fehlens bestimmter Modifikationen BACE aktiv ist. Hierbei kommt das Fehlen von N-Glykosylierungen, Phosphorylierung oder Palmitoylierung in Betracht. Das Disulfbrückenmuster dagegen wird sehr wahrscheinlich vollständig ausgebildet, wie das intensive Dimersignal unter nicht reduzierenden Elektorphoresebedingungen belegt. Überdies liegt nach Reduktion der Disulfidbrücken rekombinantes BACE nur noch als Monomer vor, was bedeutet, dass alle Dimermoleküle intramolekulare Disulfidbrücken haben müssen, da ohne diese die Stabilität des Dimers gegenüber SDS nicht gewährleistet ist. Wie in Abbildung Abbildung 4.9 dargestellt, zeigt die Immunpräzipation der β-sekretierten APP Formen aus konditionierten Medien eine deutliche Erhöhung bei BACEwt transfizierten Zellen gegenüber der Kontrolle (Mock). Die Mutante BACE D93A und die Doppelmutante BACE D93/289A sekretieren zu der vektortransfizierten Kontrolle vergleichbare Mengen. Bei BACE D289A dagegen wird mehr APP zu sAPPβ umgesetzt als bei der Kontrolle, wenn auch nicht die Signalstärke des Wildtyps erreicht wird. Möglicherweise spielt der mutierte Bereich eine Rolle bei der Enyzm Substrat Wechselwirkung, so dass diese geschwächt wird und entsprechend weniger APP geschnitten wird.

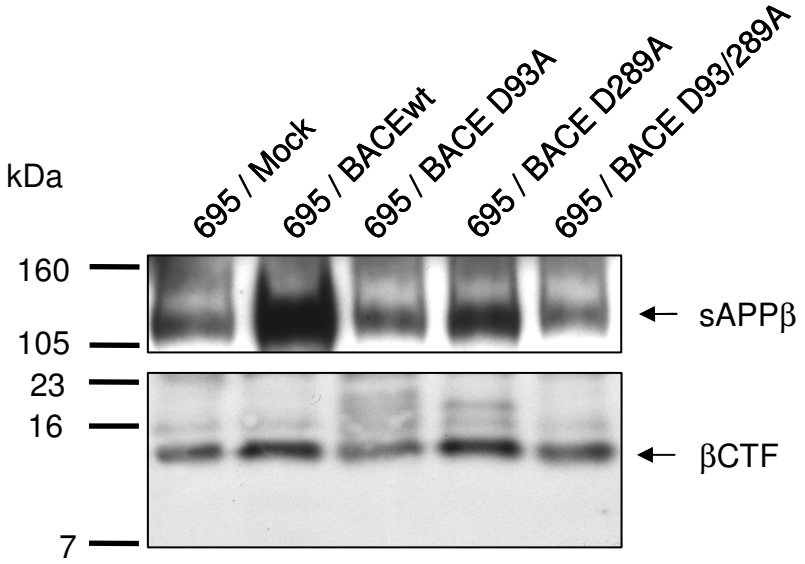

Abbildung 4.9

Immunpräzipiation β-prozessierter APP Formen aus Zellkulturüberstand APP / BACE kotransfizierter SH-SY5Y Zellen. Die IP zur Detektion von sAPPβ wurde mit Antikörper 879 durchgeführt, zur Auftrennung wurde ein 10%iges PA Gel verwendet und die Detektion im Immunblot erfolgte mit dem Antikörper 22C11. βCTFs wurden durch IP mit Antikörper 27576 aus entsprechenden SH-SY5Y Lysaten isoliert und nach Auftrennung in einem 10-20%igem PA Gel mit dem Antikörper W0-2 nachgewiesen.

Die Immunpräzipitation der βCTFs zeigt ebenfalls, dass die Signalstärke bei BACEwt und BACE D289A vergleichbar sind, wohingegen BACE D93A und die Doppelmutante BACE D93/289A sich auf dem Niveau der vektortransfizierten Kontrollen befinden. Der Unterschied zwischen den betrachteten Konstrukten fällt bei den βCTFs geringer aus, als bei sAPPβ, was daran liegt, dass dieser Metabolit von der γ-Sekretase weiter abgebaut wird und sich daher nicht anreichert (Abbildung 4.9). Zusammengenommen kann man für die Aktivitätsentfaltung die Hypothese formulieren, dass BACE in dimerer Form aktiv ist und scheinbar jeweils das Aspartat an Position 93 ausreichend ist. Durch die Dimerisierung wird jeweils ein Aspartat je Untereinheit bereitgestellt, so dass die Proteolyse nach dem für Aspartatproteasen beschriebenen Mechanismus ablaufen kann.
Die unerwartet niedrige Aktivität und die geringe Spezifität für die Substrate APPwt und APPswe wie sie für die rekombinante, monomere Ektodomäne beschrieben wird, (Gruninger-Leitch F, et al., 2002) lässt vermuten, dass nicht das Monomer für die Spaltung von APP *in vivo* verantwortlich zu sein scheint. Vielmehr wird durch das Dimersierungsmodell ein Mechanismus vorgeschlagen, welcher eine Erklärung für die geringe Substratspezifität des Monomers darstellt. Demnach ist das Monomer durch das Vorhandensein von 2 Aspartaten an den Positionen 93 und 289 zwar nicht vollständig inaktiv, jedoch scheint BACE nur als Dimer die notwendige Substratspezifität und die volle Aktivität aufzuweisen.

4.6 Dimerisierung der BACE-Ektodomäne über Disulfidbrücken

4.6.1 Expression verkürzter BACE-Formen

Bislang unternommene Experimente, die Ektodomäne rekombinant herzustellen, waren immer mit dem Nachteil behaftet, dass ausschließlich Monomere gewonnen wurden. Die hier in HEK 293 Zellen exprimierte Ektodomäne reicht bis Position 461 und erwartungsgemäß wurden nur monomere Formen beobachtet. Daher wurden 4 Cysteine an den Positionen 457-460 eingeführt (QC) um eine Dimerisierung über Disulfidbrücken zu erzwingen. Laut Strukturvorhersage liegen diese AS in einem Bereich mit hoher Wahrscheinlichkeit für eine α-helikale Konformation. Hierbei erstreckt sich die α-Helix, welche die Membran durchspannt, noch weiter zum N-Terminus hin und reicht somit bis AS 452 (Abbildung 4.10).

Durch die Positionierung der Sulfhydrilgruppen an den Seitenketten des Cysteins sollten diese im rechten Winkel zur Helixachse nach außen ragen und im Falle einer günstigen Ausrichtung zweier BACE Moleküle zu einer Verbrückung führen. Bei 4 Cysteinen sollte demnach ein Cysteinrest richtig orientiert sein, da eine Helixwindung aus 3,6 AS besteht. Zwar wird nach der *in silico* Verkürzung auf 461AS eine eher lineare Struktur vorhergesagt, aber in der Praxis wird dennoch eine Dimerisierung erzielt, was wiederum für die α-helikale Struktur dieser Region spricht.

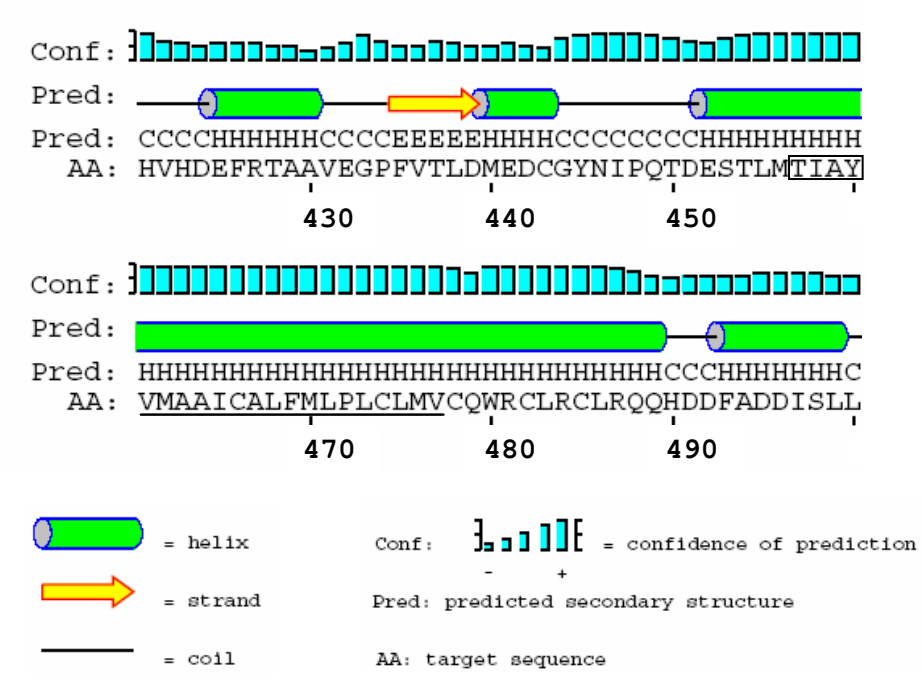

Abbildung 4.10

Strukturvorhersage für BACE (Positionen 420 - 500) nach PSIPRED (McGuffin LJ, et al., 2000). Die Aminosäuren 457-461, die mutiert wurden, sind mit einem Kasten, die Transmembrandomäne durch Unterstreichen markiert.

Erstaunlicherweise wird neben der Dimerisierung aber auch die Bildung von oligomeren Formen beobachtet (Abbildung 4.11, A). Unter den Bedingungen einer reduzierenden Gelelektrophorese wird hingegen eine vollständige Monomerisierung erzielt. Überdies kann beobachtet werden, wie die obere Bande der monomeren Isoformen in die untere Bande überführt wird. Scheinbar handelt es sich hierbei um Strukturisomere, die partiell SDS-stabil sind (Abbildung 4.11, B).

Zwar stellt das Dimer bei dem BACE-NT QC Konstrukt eine unterrepräsentierte Spezies dar, jedoch ist dies wahrscheinlich auf ein Überangebot an freien Disulfidbrücken zurückzuführen. Um das Problem der schwachen Dimerausbeute

und ungewollten Oligomerisierung zu umgehen, wurden nun einzelne Aminosäuren an den Positionen 457, 459 und 460 zu Cystein ausgetauscht um die ideale Position für eine Dimerisierung zu finden. Man erhält so wiederum Disulfidbrücken am C-Terminus des rekombinanten trunktierten Proteins was dazu führen sollte, dass das Enzym konstitutiv als Dimer synthetisiert wird. Durch das Fehlen zusätzlicher intermolekularer Disulfidbrücken wird eine weitere Aggregation jedoch vermieden.

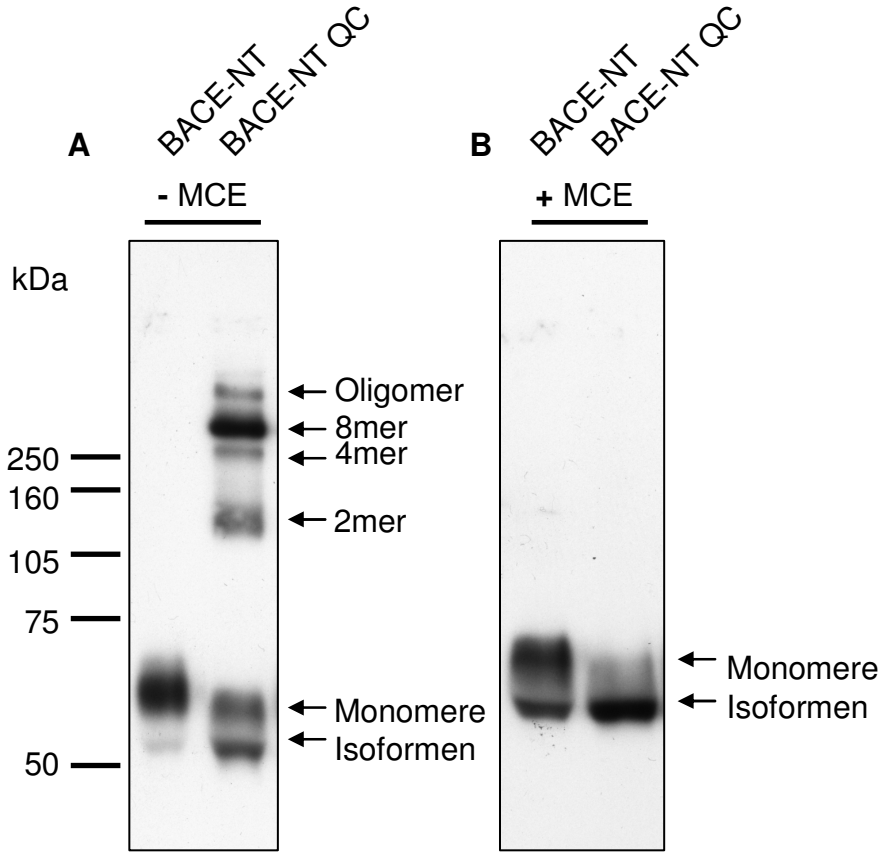

Abbildung 4.11

Expression rekombinanter BACE-Ectodomänen in HEK293 Zellen. Die QC-Mutation führt zu einer Stabilisierung von n-meren Formen des BACE-NT. Durch Zugabe von β-Mercaptoethanol lassen sich alle Oligomere in die monomere Form reduzieren. Das Monomer liegt in 2 isomeren Formen vor, die sich teilweise durch Behandlung mit β-Mercaptoethanol ineinander überführen lassen. Auch wird ein etwas anderes Laufverhalten im SDS Gel unter reduzierenden Bedingungen augenscheinlich. Hierbei erscheinen die monomeren Isoformen in ihrem apparenten Laufverhalten nach oben versetzt.

Durch die unterschiedliche Positionierung der Cysteine in der Helix wären neben dem Dimer unterschiedliche Monomeranteile zu erwarten. Tatsächlich wurde bei der Untersuchung der Zellkulturüberstände ein unterschiedlicher Dimerisierungsgrad

zwischen den verschiedenen Mutanten beobachtet (Abbildung 4.11, A). Dieses System zeichnet sich durch den Vorteil aus, dass der Dimeranteil deutlich höher ist als bei dem BACE- NT QC Konstrukt. Das Protein liegt in löslicher Form vor und wird in den Kulturüberstand sezerniert, was die anschließende Aufreinigung des Proteins stark vereinfach. Das Expressionssystem in HEK 293 Zellen gewährleistet überdies ein realistisches Glykosylierungsmuster, so dass dieses System für die rekombinante Expression des BACE-Dimers die besten Voraussetzungen erfüllt.

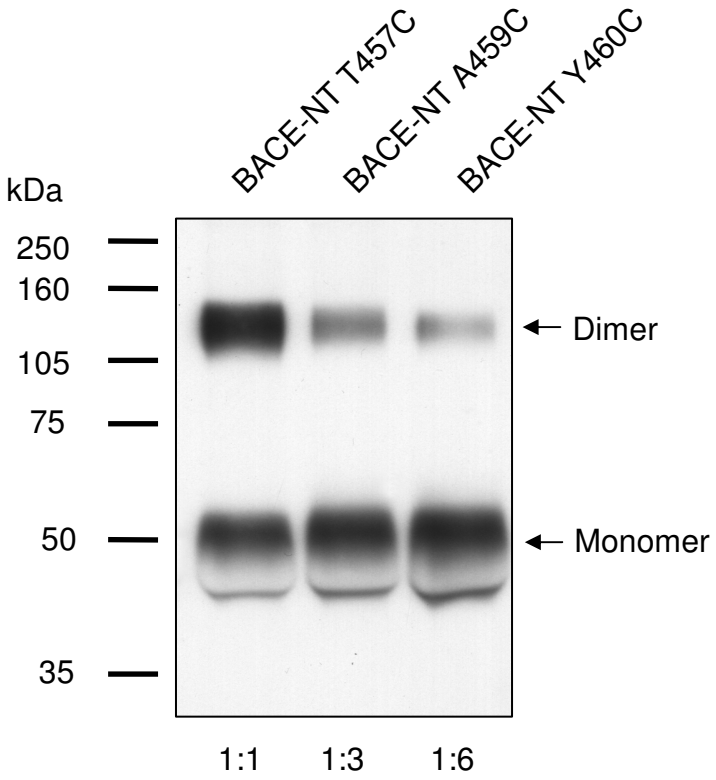

Abbildung 4.12

Die BACE-Ektodomäne dimerisiert über Disulfidbrücken. Der Überstand war für 3 Tage konditioniert und die Zellen etwa gleich konfluent. Das Verhältnis von Dimer zu Monomer unterscheidet sich deutlich und beträgt bei 457 etwa 1:1, bei 459 etwa 1:3 und bei 460 etwa 1:6. Die sekretierten Proteinmengen waren jeweils etwa identisch, was zeigt, dass die Transfektionseffizienz ebenfalls vergleichbar ist.

Einmal aus dem zellulären System entlassen, ist die Rekonstitution des über Disulfidbrücken stabilisierten Dimers aus Monomeren mit freier Thiolgruppe nicht mehr möglich. Obwohl Sulfhydrilgruppen unter Einwirkung von Sauerstoff, wie man ihn auch in wässrigen Lösungen vorfindet, zu Persulfiden oxidieren können,

entstehen keine neuen Disulfidbrücken, die monomeres BACE zu Dimeren verbinden. Auch wenn man versucht eine räumliche Nähe zwischen zwei Monomeren über die Bindung an ein Substrat herzustellen, gelingt es nicht eine Disulfidbrückenbildung zu induzieren. So wird durch Inkubation des Monomers mit verschiedenen Peptiden, die die β-Schnittstelle mimikrieren und somit eine Bindung zu BACE herstellen sollten, kein Dimer gebildet. Auch wenn man das isolierte Monomer mit in Kultur wachsenden APP_{695} überexprimierenden SH-SY5Y Zellen inkubiert, werden keine Dimere über neugebildete Disulfidbrücken generiert (ohne Abbildung).

Behandelt man die konditionierten Medien mit reduzierenden Reagenzien wie β-Mercaptoethanol oder DTT wird, wie bei dem BACE-NT QC Konstrukt unter den Bedingungen einer SDS-PAGE, eine vollständige Monomerisierung erzielt (ohne Abbildung). Offensichtlich sind die Wechselwirkungen der Ektodomäne, welche zur Dimerisierung führen, deutlich schwächer als die des Volllängenproteins. Jedoch muss grundsätzlich eine Wechselwirkung angenommen werden, da sonst eine Dimerisierung über die stabilisierenden Disulfidbrücken nicht möglich wäre.

4.6.2 *In vivo* Aktivität verkürzter BACE-Formen

Um die Aktivität der verkürzten Konstrukte zu untersuchen wurden die von HEK293 Zellen in den Zellkulturüberstand sekretierten sAPPβ Formen quantitativ in einem Immunblot erfasst. Der Hypothese zufolge, dass BACE in dimerer Form APP prozessiert, würde man eine erhöhte β-Sekretase Aktivität bei dimeren Formen erwarten.

Die Aktivität der monomeren, rekombinanten Ektodomäne (BACE-NT) zeigt hinsichtlich der Generierung β-sekretierter APP Formen eine Erhöhung gegenüber der Vektorkontrolle. Eine signifikante Aktivitätserhöhung der über vier Cysteinbrücken dimerisierten und oligomerisierten Formen (BACE-NT QC) gegenüber der ausschließlich monomeren Form (BACE-NT) lässt sich jedoch nicht beobachten (Abbildung 4.13). Auch lässt sich kein Unterschied zwischen den Aktivitäten von BACE-NT T457C, BACE-NT A459C und BACE-NT Y460C feststellen (ohne Abbildung). Dimerisierungsgrad und Enzymaktivität lassen sich demnach im Rahmen dieses Versuchsansatzes nicht korrelieren. Als Grund dafür kommt eine unzureichende Enzym-Substrat-Wechselwirkung in Betracht, da diese

möglicherweise über die zytoplasmatische und transmembranäre Domäne, die den BACE-NT formen fehlen, stabilisiert wird. Auch könnte eine schlechte Zugänglichkeit des Enzyms zum Substrat eine Rolle dabei spielen, da die fehlenden Bereiche eine richtige räumliche Orientierung gewährleisten könnten. Als weiterer Grund ist anzuführen, dass möglicherweise die Sättigung des Kulturüberstands mit sAPPβ den Rückschluss von unterschiedlich starker β-Sekretase Aktivität in Folge unterschiedlich starker Dimerisierung nicht zulässt. Eine zeitabhängige Beobachtung wäre demnach sinnvoll, ist jedoch aufgrund der geringen Sensitivität des Antikörpers 897 nicht möglich. Da sAPPβ erst nach etwa 2 – 3 Tagen im konditionierten Medium nachweisbar ist, kann eine kurzfristige Erhöhung nicht erfasst werden.
Auffällig ist die unerwartet hohe Aktivität bei BACE-NT. Möglicherweise finden sich hier kurzzeitig zwei Untereinheiten am Substrat zusammen um aktiv zu werden, lösen sich anschließend wieder ab und zerfallen dabei wieder in die Untereinheiten.

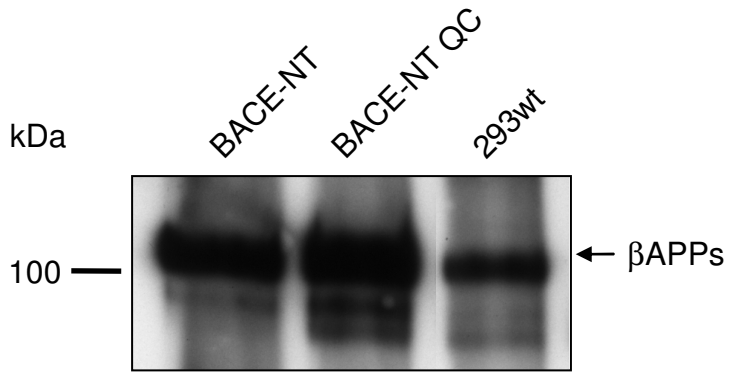

Abbildung 4.13

Immunpräzipitation von konditioniertem Medium transfizierter HEK293 Zellen. IP mit 22734, Detektion mit 879. Die Überexpression von rekombinantem BACE-NT, sowie von BACE-NT QC zeigt einen erhöhten sAPPβ Spiegel gegenüber den wt Zellen.

Des Weiteren wurden Experimente unternommen wobei über 3 Tage mit BACE angereicherte Zellkulturüberstände auf APP_{695}-transfizierte SY5Y Zellen gegeben wurden. Hierbei hätte man einen β-Schnitt von APP durch BACE an der Plasmamembran erwartet. Jedoch zeigte sich nach Immunpräzipitation wie oben keine Erhöhung von sAPPβ gegenüber nicht behandelten Zellen. Dies könnte jedoch mit dem Umstand zusammenhängen, dass APP_{695} transfizierte SY5Y Zellen per se sehr viel β-sekretiertes APP im Zellkulturüberstand aufweisen. Hierdurch würde das

sAPPβ, welches durch das zugegebene BACE generiert wurde, überlagert werden. Daher wurde das gleiche Experiment mit SY5Ywt Zellen durchgeführt, was jedoch zu der gleichen Beobachtung führte. Auch die Zugabe von isolierten Monomer- bzw. Dimerfraktionen des BACE-NT T457C Konstruktes zu SY5Y Zellen zeigte keinerlei Erhöhung des sAPPβ-Spiegels in derart behandeltem Medium (ohne Abbildung). Als Erklärung kommt möglicherweise wiederum die falsche Orientierung von Enzym zu Substrat in Betracht. Auch ist der pH-Wert im Zellkulturmedium oberhalb des Optimums für die BACE Spaltung, welche bevorzugt im Sauren stattfindet, so dass die volle Entfaltung der Aktivität nicht gesichert ist. Jedoch ist BACE auch an der Plasmamembran lokalisiert, so dass die BACE-Aktivität bei einem physiologischen pH-Wert aus diesem Grund nicht überraschend, sondern sogar zu erwarten wäre.
Allerdings sind möglicherweise noch andere Komponenten für das Zusammenfinden von Enzym und Substrat erforderlich, so dass durch deren Fehlen die Aktivität nicht vermittelt werden kann.

4.7 Metallbindungsstudien

Kupfer und Zink sind Bindungspartner für APP und überdies steht eine Dishomöostase von Metallionen in Verbindung mit der Entstehung von β-amyloiden Ablagerungen und dem Auftreten neurotoxischer Erscheinungen (Bush AI, 2003). Aus diesem Grunde lag es nahe die Metallbindungseigenschaften von BACE zu untersuchen.
Vergleicht man die Bindung des BACE-Dimers an chelatiertes Zink mit der Bindung an chelatiertes Kupfer, so fällt auf, dass wesentlich mehr BACE im Durchlauf der Zink-Säule nachzuweisen ist, als bei der entsprechenden Fraktion des Kupferexperiments. Erwartungsgemäß wird deutlich mehr BACE von der Kupfersäule eluiert, als bei der Zinksäule (Abbildung 4.14). Beim BACE-Monomer wird der gesamte Anteil im Durchlauf der Zinksäule gefunden und entsprechend kann keinerlei Protein im Eluat detektiert werden. Folglich zeigt das BACE-Monomer keinerlei Bindungsspezifität für chelatiertes Zink. Im Gegensatz dazu bindet das Monomer überaus gut an die Kupfersäule, wie das minimale Signal der Durchlauffraktion und das starke Signal der Elutionsfraktion zeigen. Bei dem Vergleich von Monomer mit der dimeren Form fällt auf, dass das BACE-Dimer im

Gegensatz zum Monomer eine erhöhte Bindungsaffinität zu Zink aufweist, welche jedoch geringer ist als die des Dimers zu Kupfer.

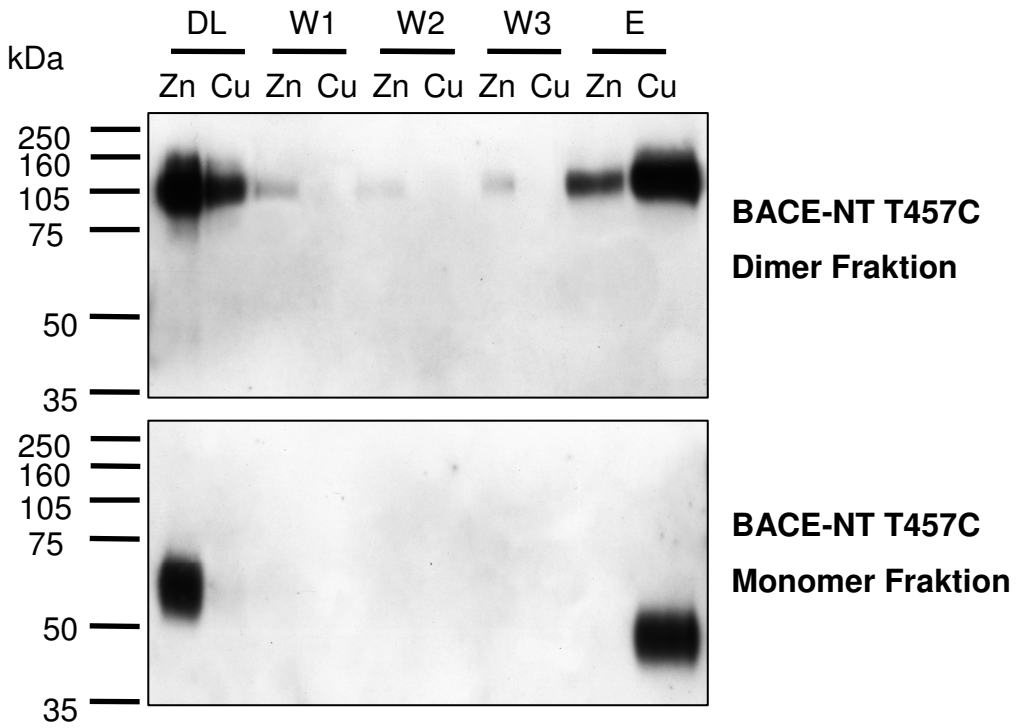

Abbildung 4.14

IMAC Profil von BACE-NT T457C Dimeren und Monomeren. Diese wurden durch Anreicherung über Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltrationschromatographie gewonnen. Cu^{2+}- und Zn^{2+}-Ionen wurden an chelatierender Sepharose immobilisiert und das Bindungsverhalten der monomeren und dimeren Form untersucht. Die Fraktionen wurden in einem 10%igen PA Gel unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und nach Immunblot mit BSC-1 analysiert. DL: Durchlauffraktion, W1: Waschfraktion 1, W2: Waschfraktion 2, W3: Waschfraktion 3, E: Elutionsfraktion.

Die höchste Bindungsaffinität weißt das Monomer zu Kupfer auf. Folglich kann folgende Reihe für die relative Bindungsaffinität von BACE-Monomer, bzw. Dimer zu den divalenten Kationen Kupfer und Zink aufgestellt werden:

BACE-Monomer / Cu > BACE-Dimer / Cu > BACE-Dimer / Zn > BACE-Monomer / Zn

Da BACE in dimerer Form in gewissem Umfang an Zink bindet, jedoch als Monomer nicht, muss eine strukturelle Veränderung mit der Dimerisierung einhergehen, welche

die Bindung an Zink gestattet. Dieser Schluss wird auch durch die Bindung des Monomers an Kupfer belegt, welches deutlich besser bindet als das Dimer. Insgesamt lässt diese Beobachtung auf eine deutlich unterschiedliche Struktur des Monomers gegenüber der Struktur im Kontext des Dimers schließen.

Vergleicht man die BACE-NT T457C mit BACE-NT zeigt sich ein analoges Ergebnis, so dass eine Beteiligung des Cysteins, welches zwecks Dimerisierung eingeführt wurde, ausgeschlossen werden kann (ohne Abbildung). Demnach weist die BACE Ektodomäne per se eine hohe Affinität zu Kupfer auf und erhält diese nicht durch die Mutation.

Die BACE-QC Mutante zeigt ein ähnliches Bindungsverhalten. Hierbei wurde ungereinigter Zellkulturüberstand auf seine Bindungseigenschaften zu Kupfer, Zink und Nickel untersucht. Auch hier wurde die stärkste Bindung an Kupfer beobachtet, wogegen die Bindung an Nickel am schwächsten war (ohne Abbildung).

4.8 Bestimmung des BSC-1 Epitops

Der Antikörper BSC-1 wurde freundlicherweise von Dr. Brockhaus (Fa. Roche) zur Verfügung gestellt, jedoch ohne Angabe des erkannten Epitops.

Durch die Expression der rekombinanten BACE-Fragmente BACE 46-128, BACE 46-196, sowie BACE 224-324 in *E. coli* konnte das Epitop auf die AS 46-128 eingegrenzt werden. Sonifizierte Rohlysate wurden mit BSC-1 analysiert, wobei nur die Fragmente 46-128 und 46-196 erkannt wurden (ohne Abbildung).