

## 5. Diskussion

Über die zellulären Regulationsmechanismen der  $\beta$ -Sekretase Aktivität ist bislang wenig bekannt. Gleiches gilt für die Interaktion zwischen BACE und seinen Substraten, allen voran APP. Das Verständnis der Regulation von BACE sowie der Interaktion mit APP ist von größter Wichtigkeit im Hinblick auf künftige Therapiemöglichkeiten der Alzheimer Krankheit. Ansätze zur Aufklärung der Regulation der  $\beta$ -Sekretase Aktivität konnten im Rahmen dieser Arbeit erzielt werden. So scheint das Dimer die eigentlich aktive Form des Enzyms zu sein, bzw. in seiner monomeren Form eine andere Substratspezifität aufzuweisen als das Dimer. Somit ginge die Regulation der Dimerisierung mit der Regulation der Aktivität einher.

Die biochemischen Eigenschaften des Vollängenproteins, die während der Detergenzextraktion und Reinigung über verschiedene chromatographische Methoden beobachtet wurden, weisen die Merkmale eines dimeren integralen Membranproteins auf. Das Dimer lässt sich als natürlich vorkommende, SDS stabile Form mit einem C-terminal gerichteten Antikörper im humanen Hirn nachweisen. Der Nachweis mit einem N-terminal gerichteten Antikörper zeigt BACE-Dimere auch in dem SH-SY5Y Säugerzellexpressionssystem. Offensichtlich ist das BACE-Dimer eine physiologische Form des Enzyms. Diese dimere Form erweist sich als überaus robust, denn sie ist nicht nur SDS-stabil sondern auch nach mehreren chromatographischen Schritten noch intakt. Eine teilweise Monomerisierung des Proteins wird jedoch bei der zweidimensionalen Elektrophorese beobachtet. Man kann demnach annehmen, dass nur durch die stark denaturierenden Bedingungen unter der Einwirkung von Harnstoff die homophile Interaktion zerstört wird. Diese partielle Monomerisierung des Proteins, die während der zweidimensionalen Elektrophorese eintritt, unterstützt zusammen mit den anderen Beobachtungen die These einer Homodimerisierung *in vivo* (Schmechel A, et al., 2004).

Auch in der Literatur werden deutliche Hinweise auf eine Dimerisierung von BACE gefunden (Huse JT, et al., 2000). Die rekombinant in der Insektenzelllinie Sf9 exprimierte BACE Ektodomäne wird ausschließlich als Proenzym sekretiert und bildet keine Dimere, wogegen aufgereinigtes Vollängen BACE eine zusätzliche Bande bei 110kDa aufweist, die mit der Größe des Dimers korrespondiert (Grüniger-Leitch F, et al., 2002). Nach Natriumkarbonatextraktion von

Membranproteinen wurden bei BACE transfizierten HEK 293 Zellen ebenfalls Dimere nachgewiesen, wenngleich diese von den Autoren nicht explizit als solche ausgewiesen wurden (Haniu M, et al., 2000). Auch von anderen Autoren wurde ein potentiell, gegenüber Reduktionsmitteln und stark denaturierenden Agenzien resistentes Dimer beschrieben (Sidera C, et al., 2002). Unsere Beobachtungen zeigen allerdings, dass die rekombinant exprimierte Volllängeform der  $\beta$ -Sekretase unter reduzierenden Bedingungen keine SDS-resistenten Dimere aufweist. Folglich scheint die Disulfidbrückenstruktur einen erheblichen Einfluss auf die Stabilität des Dimers zu haben. Endogenes BACE, welches in vollem Umfang reifen kann zeigt diese Sensitivität gegenüber Reduktionsmitteln jedoch nicht.

Die Tatsache, dass nicht ausschließlich Dimere *in vivo* beobachtet werden lässt vermuten, dass die Dimerisierung einer strengen Kontrolle unterliegt. Dies wird ebenfalls durch die Tatsache belegt, dass C-terminal verkürzte BACE Formen nur in Anwesenheit einer artifiziellen intermolekularen Disulfidbrücke und nach Durchlaufen des zellulären Systems stabile Dimere bilden. Über Ionenaustauschchromatographie und Gelpermeation isolierte Monomere mit einer freien Thiolgruppe an gleicher Position dimerisieren dagegen nicht. Offensichtlich werden also nur *de novo* gebildete, C-terminal trunkierte BACE Moleküle zu Dimeren zusammengefügt. Überdies scheinen die Transmembran- und / oder die zytoplasmatische Domäne für eine stabile Dimerisierung, welche auch gegenüber Detergenzbehandlung unempfindlich ist, essentiell zu sein. Neben der Stabilisierung wären diese Bereiche außerdem Ansatzpunkte für regulatorische Prozesse, welche die BACE-Dimerisierung, respektive Aktivität *in vivo* steuern. Dennoch verfügt die Ektodomäne scheinbar über Kontaktstellen, die eine lose homophile Interaktion zulassen, wie die Generierung der über Disulfidbrücken stabilisierten Dimere aus trunkierten BACE-Monomeren zeigt. Es scheint sogar die Tendenz zu bestehen höhere oligomere Formen auszubilden, wie das BACE-NT QC Konstrukt zeigt. Dies könnte zwar durch die Aufeinanderfolge von 4 Cysteinen einer artifiziellen Gestaltung des C-Terminus zuzuschreiben sein, jedoch ist auch die Möglichkeit nicht auszuschließen, dass oligomere Formen von BACE  $\beta$ -Sekretase Aktivität besitzen. Es bleibt festzuhalten, dass durch das Einführen einzelner Cysteine am C-Terminus die Dimerausbeute im Vergleich zum QC Konstrukt deutlich verbessert wird. Im Falle der BACE-NT T457C Mutante befinden sich Dimer und Monomer in

einem 1:1 Verhältnis, was sich auch bei dem Volllängenprotein aus humanem Hirnhomogenat beobachten lässt.

Die Frage nach dem Mechanismus der Dimerisierung stellt sich an diesem Punkt, kann jedoch nicht eindeutig beantwortet werden. Bisher wird angenommen, dass BACE-Dimere im ER gebildet werden, jedoch erhält man daraus noch keine Rückschlüsse über den Mechanismus der Dimerisierung (Westmeyer GG, et al., 2004). Widersprüche zu dieser Studie gibt es bei der Beurteilung der Autoren hinsichtlich der Stabilität des beobachteten Dimers (Marlow L, et al., 2003, Sidera C, et al., 2002), wenngleich dies möglicherweise durch die Verwendung unterschiedlicher Antikörper erklärt werden kann, die gegen Regionen gerichtet sind, welche direkt oder indirekt zur homophilen Interaktion beitragen.

In jedem Fall ist dem Bereich der zytoplasmatischen und Transmembrandomäne eine besondere Bedeutung beizumessen, da er BACE die Eigenschaft eines Transmembranproteins verleiht, welches ein für Aspartatproteasen einzigartiges Merkmal darstellt. Neben der Lokalisierung von BACE in späten Golgi-Kompartimenten wird hierdurch auch der Zugang zu APP als Substrat gewährleistet (Yan R, et al., 2001).

Interessant ist auch die Rolle des Propeptids, welches bei anderen Proteasen für die Regulation der Aktivität mittels Inhibition von entscheidender Bedeutung ist. Bei BACE spielt es nur eine untergeordnete Rolle, da das Enzym scheinbar auch in Anwesenheit des Propeptids aktiv ist und stattdessen nur die korrekte Faltung erleichtert (Shi XP, et al., 2001). Möglicherweise kommt dem Propeptid im Fall der  $\beta$ -Sekretase eine Funktion im Rahmen der Dimerisierung zu, indem es diese unterstützt oder inhibiert und somit an der Regulation der Aktivität beteiligt ist.

Weitere Ansätze zur Regulation der  $\beta$ -sekretorischen Aktivität können in der Bindung von Metallionen an BACE vermutet werden. Mögliche Einflüsse divalenter Kationen auf die Struktur von BACE können aufgrund der Tatsache angenommen werden, dass BACE in seiner monomeren Form deutlich besser an Kupfer bindet als in der dimeren Form. Denkbar wäre, dass das native Volllängenenzym über Kupfer monomerisiert wird. Somit läge der Kupferbindung durch die Einflussnahme auf die Dimerisierung ein Regulationsmechanismus zugrunde mit dessen Hilfe die Prozessierung der Substrate gesteuert werden kann (siehe unten).

Lösliche, C-terminal verkürzte BACE Konstrukte weisen sehr niedrige Umsatzraten gegenüber den Substraten APP und APP<sub>swe</sub> auf (Bruinzeel W, et al., 2002).

Einhergehend mit dieser Beobachtung zeigen solche BACE Formen kaum Ähnlichkeit zur Substratspezifität *in vivo* (Benjannet S, et al., 2001, Gruninger-Leitch F, et al., 2002, Hong L, et al., 2000, Shi XP, et al., 2001).

Unseren Beobachtungen zufolge lässt sich dieser Widerspruch gemäß unserer Hypothese, dass BACE als Dimer aktiv ist aufklären. Anscheinend wird bei BACE *in vivo* nicht das C-terminal gelegene -DSGT- Motiv zur Komplettierung des N-terminal gelegenen -DTGS- Motivs unter Bildung des aktiven Zentrums und der typischen zweilappigen Struktur einer Aspartatprotease verwendet. (Abbildung 5.1). Somit wäre BACE nicht in seiner monomeren Form aktiv, wie die meisten typischen Vertreter der Aspartatproteasenfamilie, wie z.B. Pepsin. Vielmehr werden zwei BACE Moleküle benötigt, die zusammen durch die beiden N-terminal im -DSGT- Motiv gelegenen Aspartate ein aktives Enzym generieren. Diese Konstellation ist vergleichbar mit der HIV-Protease I, bei der sich zwei Monomere antiparallel zum aktiven Dimer zusammenlagern (Wlodawer A and Gustchina A, 2000). Das BACE-Monomer dagegen scheint zwar Aktivität aufzuweisen, jedoch ohne die Spezifität einer  $\beta$ -Spaltung, wie die verkürzten monomeren Formen anhand der niedrigen Umsatzrate und Substratspezifität belegen. Diese Annahme wird unterstützt durch die mit der BACE D289A Mutante gemachten Beobachtungen, welche APP unter Generierung von sAPP $\beta$  und  $\beta$ CTFs in  $\beta$ -spezifischer Weise prozessiert.

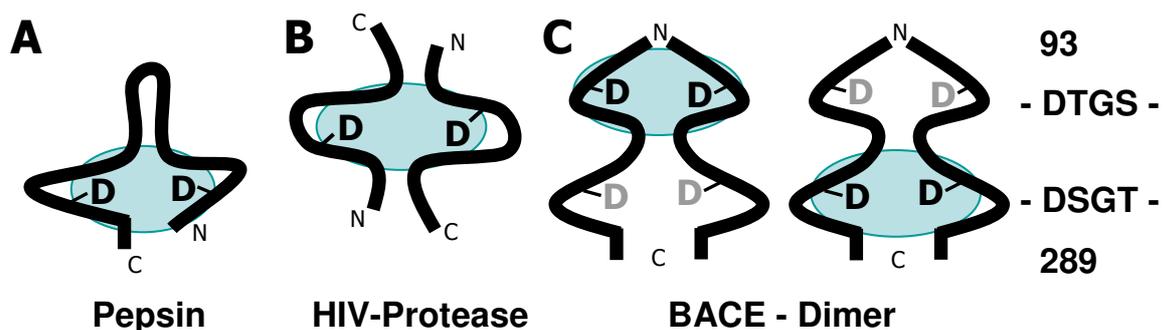


Abbildung 5.1

**Aktivitätsmodelle für Aspartatproteasen.** Pepsin als typischer Vertreter der Aspartatproteasenfamilie bildet das aktive Zentrum (grau unterlegt) aus einem Monomer (A). Die HIV-Protease I ist als Dimer aktiv (B). Für BACE ergeben sich zwei Möglichkeiten ein aktives Zentrum zu bilden (C). Aktive Aspartate sind in schwarzer, inaktive in grauer Schrift dargestellt.

Tatsächlich zeigen sowohl die D93A als auch die D93/289A Mutanten keinerlei Aktivität. Dies widerspricht der bisher verbreiteten Meinung, dass BACE für seine Aktivität die Aspartate an Position 93 und 289 benötigt. Stattdessen bleibt im Fall von BACE D289A die Aktivität erhalten, wenngleich die produzierte sAPP $\beta$  Menge kleiner ist als bei BACEwt. Dies könnte allerdings auch auf eine schwächere Substratbindung, verursacht durch den Austausch von D nach A, zurückzuführen sein. Demnach wäre dieser Bereich für die Wechselwirkung zwischen Enzym und Substrat erforderlich.

Für die Hypothese, dass BACE als Dimer aktiv ist, spricht auch das unterschiedliche Bindungsverhalten von Vollängen-BACE und BACE-NT an Pepstatin-A. Hierbei wird eine sehr viel geringere Affinität der monomeren Ektodomäne zu dem Inhibitor beobachtet. Dieser Umstand macht abermals deutlich, welche bedeutungsvolle Funktion die Transmembran-domäne und der C-Terminus im Rahmen der Dimerisierung haben, da nur das dimere Vollängen-BACE das Substrat, bzw. den Inhibitor korrekt erkennen und binden kann. Ganz offensichtlich modulieren diese Bereiche des Enzyms die Sekretaseaktivität über Substratfindung und -bindung, da sie BACE in die aktive Dimerform versetzen. Auch die Beteiligung höherer Oligomere an der Substratspaltung erscheint möglich. Ähnlich wie die natürlich auftretenden hochmolekularen BACE Komplexe (Marlow L, et al., 2003) zeigt auch die BACE-NT QC Mutante oligomere Formen, wobei hier den Cysteinen über die Disulfidbrücken die Rolle des stabilisierenden Elementes zukommt. In Analogie zeigen auch die Typ I Matrixmetalloproteinasen eine Multimerisierung über den C-Terminus (Lehti K, et al., 2000), so dass die Möglichkeit eines aktiven BACE-Oligomers in Betracht gezogen werden muss. Die Wichtigkeit des C-Terminus bei der Dimerisierung und Oligomerisierung wird weiter verdeutlicht, wenn man bedenkt, dass diese Funktion durch die posttranslationalen Modifikationen beeinflusst werden könnte. Hieraus wird deutlich, dass durch die Regulation der Verhältnisse von monomeren und dimeren sowie oligomeren Formen die  $\beta$ -sekretorische Aktivität gesteuert werden kann und sich nicht nur auf die Stabilität der mRNA, bzw. des Proteins beschränkt.

Ein weiterer untersuchter Aspekt war die Autoproteolyse von BACE im Rahmen einer regulatorischen Funktion. Mittels einer in BACE eingeführten swe-Mutation sollte eine verstärkte Autoproteolyse in zwei ähnliche, etwa 35kDa große Fragmente nachgewiesen werden. Trotz deutlicher Hinweise auf diese Fragmente, welche aus der Analyse von Expressionsmustern entsprechender Hirnhomogenate und Zell-

Lysate hervorgehen, konnte dieses Ergebnis nicht zuverlässig reproduziert werden. Überdies zeigten die Mutanten BACE NL und BACE KV in der Zellkultur keinen Effekt auf die Generierung dieser BACE Fragmente.

Die bei den IMAC-Studien gemachten Beobachten lassen vermuten, dass BACE-NT im Besonderen zu Kupfer eine starke Bindung aufweist. Die Stabilität dieser Bindung wird durch die Unempfindlichkeit gegenüber hohen Salzkonzentrationen deutlich. Da die Kupferbindung für die Ektodomäne nachgewiesen wurde, kann die Bindung über die zytoplasmatisch Domäne ausgeschlossen werden, obwohl die Analyse der Primärstruktur dort mehrere Cysteine zeigt, denen metallbindende Eigenschaften zugewiesen werden könnten. Bei dem Sequenzvergleich zwischen BACE und der APP Kupferbindungsdomäne fallen einige Gemeinsamkeiten auf, die in Abbildung 5.2 dargestellt sind und als Grundlage für die Vorhersage einer Kupferbindungsstelle auf der BACE-Ektodomäne dienen. Bei dem Vergleich der Sequenzen fällt die Lage der Histidine zueinander auf, die wie beispielsweise bei SOD1 und APP in einem typischen HXHXH Motiv vorliegen, wobei der Einfluss des zweiten Cysteins eine untergeordnete Rolle spielt (Hesse L, et al., 1994, Koch KA, et al., 1997, Tainer JA, et al., 1983). Bei BACE ist das dritte Cystein in dieser Abfolge durch ein Glutamat vertreten, welches ebenfalls durch ein freies Elektronenpaar eine Metallbindung eingehen könnte.

	421
BACE1	ACH <u>V</u> <u>H</u> <u>D</u> <u>E</u> FR <sup>TAA</sup> VEGPFVTLDMEDCGYN
APPwt	ETH <u>L</u> <u>H</u> <u>W</u> <u>H</u> TVAKETCSEKSTNLHD <u>Y</u> <u>G</u> <u>M</u> <u>L</u> <u>L</u>
	145

### Abbildung 5.2

**Kupferbindung von APP und eine mögliche Kupferbindungsstelle von BACE. Die bei APP an der Kupferbindung beteiligten AS und die entsprechenden AS in BACE sind fett und unterstrichen. AS welche in BACE ebenfalls an der Bindung beteiligt sein könnten sind unterstrichen. (abgewandelte Darstellung der kupferbindenden Domäne nach (Barnham KJ, et al., 2003)**

Weiter C-terminal gelegen findet sich bei APP in einem Abstand von 16 bzw. 18 AS ein Thyrosin bzw. Methionin, welche ebenfalls an der Kupferbindung beteiligt sind. Für BACE findet sich an einer ähnlichen Position ebenfalls eine Abfolge von Aminosäuren mit freien Elektronenpaaren, welche die Koordinationsstellen von Kupfer (II) Ionen besetzen könnten (Abbildung 5.2). Für die genaue Determinierung sind weiterführende Experimente erforderlich. Zum einen könnten durch synthetische Peptide in der „Real Time Surface Plasmon Resonance“ (RT-SPR) Bindungsstudien an einem NTA Sensor Chips mit immobilisierten Kupfer (II) Ionen durchgeführt werden. Eine andere Möglichkeit bestünde darin die aufgereinigte Ektodomäne mit Endoprotease LysC zu verdauen, wobei das potentiell kupferbindende Fragment erhalten bliebe und sich über IMAC von den anderen Spaltprodukten abtrennen ließe. Nach Elution mit EDTA und Reinigung über HPLC könnte mittels Endoprotease GluC Verdau ein Massen-„fingerprint“ erzeugt werden, mit dem sich die kupferbindene Region näher eingrenzen ließe. Schließlich könnten Mutationen zur Identifizierung der beteiligten AS eingeführt werden. Wie bereits erwähnt könnte die Funktion der Kupferbindung regulatorischer Art sein. Anhand der durchgeführten Studien wird deutlich, dass das Monomer eine höhere Affinität zu Kupfer hat, als das Dimer. Durch die kupferabhängige Monomerisierung würde die BACE-Aktivität reduziert werden, so dass die Modulation des Kupferspiegels im Gehirn also direkt Einfluss auf die  $\beta$ -Sekretase Aktivität nehmen könnte. Dieser Schluss deckt sich mit dem Befund, dass Kupfer in protektiver Weise den Verlauf der Alzheimer Krankheit beeinflusst und die APP-Prozessierung in den nicht amyloidogenen Weg leitet (Bayer TA, et al., 2003, Borchardt T, et al., 1999).

Neben der hier gemachten Beobachtung, dass die Ektodomäne metallbindende Eigenschaften hat, ist dies auch für Vollängen-BACE gezeigt. Neben der Kupferbindung, die über die C-terminal gelegenen Cysteine vermittelt wird, interagiert BACE außerdem mit dem Kupferchaperon CCS. Über die Bedeutung dieser intrazellulären Kupferbindung kann nur spekuliert werden, jedoch wird eine Dimerisierung über intrazellulär gebundenes Kupfer angenommen (Angeletti A, et al., 2004).

Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen, die auf Experimenten mit Kupfer (II) beruhen, wird für die intrazelluläre Bindungsstelle Kupfer (I) als Interaktionspartner beschrieben. Anhand der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse scheint die Kupferbindung an die Ektodomäne keine Dimerisierung zu bewirken, so dass hier möglicherweise zwei entgegenwirkende Mechanismen zum Tragen kommen. Zum einen würde dann ein intrazellulär hoher Kupferspiegel zu vermehrter BACE Aktivität führen und andererseits im extrazellulären Bereich die BACE Aktivität reduzieren. Dieser vermeintliche Widerspruch könnte Teil eines Regelkreises sein, der die BACE-Aktivität überaus spezifisch steuert und somit entscheidenden Einfluss auf die APP-Prozessierung nimmt.