

6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass dimeres BACE in Gehirnarealen exprimiert wird, welche für die Alzheimer Krankheit relevant sind. Die beobachteten Dimere aus humanen Hirnproben zeigen eine außerordentliche Resistenz gegenüber Detergenzien, Harnstoff und hohen Salzkonzentrationen. BACE-Dimere lassen sich auch in Säugerzellkulturen beobachten, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich um eine physiologische Form des Proteins handelt.

Auffällig ist hierbei, dass das Monomer und Dimer stets in etwa gleichen Verhältnissen zueinander vorliegen, so dass eine strikte Regulierung angenommen werden muss. Welche Mechanismen hier zum tragen kommen sollte Thema einer weiterführenden Arbeit sein.

Die β -Sekretase Aktivität kann in Einklang mit dem Dimermodell gebracht werden. Dies wird in erster Linie durch die BACE D289A Mutante gezeigt, welche Aktivität aufweist, obwohl für den Proteolysemechanismus der Aspartatproteasen zwangsläufig zwei Aspartate erforderlich sind. Die verbleibende Aktivität lässt den Schluss zu, dass BACE sich in dimerer Form zweier Aspartate an Position 93 bedient um die Spaltung des Substrates durchzuführen.

Die BACE-Dimere, welche rekombinant im Säugerzellsystem entstehen zeigen anders als BACE-Dimere aus humanem Hirngewebe, zumindest nach Reduktion der Disulfidbrücken, eine höhere Sensitivität gegenüber SDS. Da die vollständige Glykosylierung des rekombinanten Proteins fragwürdig ist, scheint hier der Grund für den Stabilitätsverlust zu sein. Dies geschieht entweder indirekt durch die Beeinflussung der Faltung des Proteins oder durch direkte Interaktion der Kohlenhydrate.

Die wichtigste Rolle bei der Dimerisierung kommt der zytoplasmatischen Domäne sowie der Transmembrandomäne zu, wie die Expression von BACE-NT zeigt, welches ausschließlich als Monomer vorliegt. Eine Stabilisierung der Dimerisierung kann durch das Einführen von Disulfidbrücken am C-Terminus der verkürzten Form erzielt werden, was weitere Kontaktstellen auf der Ektodomäne vermuten lässt. Eine erhöhte Aktivität der dimeren Ektodomäne gegenüber der monomeren Ektodomäne lässt sich unter den gewählten Versuchsparametern nicht beobachten. Als Gründe hierfür sind mangelnde Wechselwirkung, bzw. falsche Orientierung des Enzyms zum Substrat infolge der Verkürzung des Proteins anzunehmen.

Eine Autoproteolyse von BACE konnte weder belegt noch bewiesen werden, da der Nachweis der gesuchten Fragmente nicht reproduzierbar war, und die untersuchten Mutanten NL und KV keinen Effekt zeigten.

Die beobachtete Kupferbindung von BACE scheint physiologischer Natur zu sein, ist stabil gegenüber hohen Salzkonzentrationen und dient möglicherweise der Regulation der Dimerisierung und somit der Aktivität. RT-SPR Studien mit synthetischen Peptiden oder Proteaseverdau und anschließenden MALDI-MS-Messungen könnten die metallbindende Domäne näher eingrenzen und gerichtete Mutationen einzelne beteiligte Aminosäuren identifizieren.

Teile dieser Arbeit wurden im Journal of Biological Chemistry (JBC) in der Ausgabe 279, Nr. 38, 17. September 2004 unter dem Titel „Human BACE Forms Dimers and Colocalizes with APP“ veröffentlicht (Schmechel A, et al., 2004).

Summary

In this thesis we were able to show that dimeric BACE is expressed in brain regions relevant for alzheimers disease. Human brain samples showed the presence of a dimer which is exceptionally resistant against detergents, urea and high salt concentrations. BACE dimers also showed up in mammalian cell culture leading to the conclusion that it represents the physiological form of the human β -secretase. Remarkably monomer and dimer are always present in the same ratio so as we assume that there is a strict regulation for the dimerization process. Which mechanisms are involved should be examined by further study.

The β -secretase activity is consistent with the proposed dimeric model. This is most convincingly shown by the activity of the BACE D289A mutant which is supposed to be inactive because the presence of 2 aspartate residues is necessary. The observed activity gives rise to the assumption that BACE utilizes two aspartate residues in position 93 as a dimer to fulfil the requirement of the known mechanism of aspartic proteases. Accordingly the substrate is proteolysed by the concerted action of a single aspartate per each monomer.

The recombinant BACE dimers expressed in a mammalian cell system show an enhanced susceptibility against SDS at least after reduction of the disulfide bonds. Since the native protein is much more stable under these conditions and the recombinant form seems to be not fully glycosylated we presume that this is the reason for the loss of stability. This either occurs because of the influence on folding or a direct interaction of the carbohydrate structures. The cytoplasmic tail and the transmembrane region play the main role in dimerization which is consistent with the observation that truncated BACE-NT exclusively occurs as a monomer. Those monomers can be stabilized by introducing cysteine residues at the c-terminus of the truncated form supposing that there are more contact sites on the ectodomain. Unfortunately there was no elevated activity of the dimeric ectodomain over the monomeric form under the given experimental parameters. A reason might be an insufficient interaction or a wrong orientation of the enzyme to the substrate as a consequence of the truncated c-terminus.

In another part of this thesis a possible autoproteolysis of BACE was to be examined. Unfortunately no convincing evidence was found to support this hypothesis especially since there was no effect of the NL and KV mutations.

The observed strong copper binding seems to be physiological and is possibly involved in regulation of dimerization and thus activity as well. RT-SPR studies with synthetic peptides or a proteolytic cleavage with subsequent MALDI-MS measurements could further narrow the possible metal binding region and site directed mutations could identify the involved aminoacids.