

Oligomerisierung, Metallbindungseigenschaften und Funktion der β -Sekretase BACE1

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

am Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie
der Freien Universität Berlin



vorgelegt von
Tobias Bethge
aus Hamburg

Berlin im Juli 2010

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gerd Multhaup am Institut für Chemie und Biochemie des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Gerd Multhaup

2. Gutachter: Prof. Dr. Ferdinand Hucho

Disputation am 06.09.2010

Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig: Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft, etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat, wieder wegzuwerfen.

Albert Einstein (1879-1955)

Science is very simple - if it works.

Modifiziert nach Oleg Georgiev (Zürich 2008)

INHALTSVERZEICHNIS

1	Zusammenfassung	VII
1.1	SUMMARY	IX
2	Einleitung	1
2.1	Die Alzheimer-Krankheit	1
2.2	APP, A β , die amyloiden Plaques und die γ -Sekretase	3
2.3	<i>β-Site APP-Cleaving Enzyme 1 (BACE1)</i>	6
2.3.1	Die Familie der Aspartat-Proteasen	6
2.3.2	Strukturelle Aspekte von BACE1 und posttranslationale Modifikationen	7
2.3.3	BACE1-Spaltstellen im APP, A β (A β clearance) und weitere Substrate	9
2.3.4	Homodimerisierung von BACE1	11
2.4	Metalle und die Alzheimer-Krankheit	12
2.4.1	Allgemeines zur Metallchelatierung durch Proteine	12
2.4.2	Kupferbindende Proteine und Kupferhomöostase	13
2.4.3	Alzheimer und Kupfer	16
2.4.4	Die Kupferbindungseigenschaften von BACE1	18
2.5	Zielsetzung der Arbeit	20
3	Ergebnisse	21
3.1	Metallvermittelte Kreuzvernetzung von BACE1-Dimeren und -Tetrameren	21
3.1.1	Kreuzvernetzung durch Kupfer(II)behandlung	21
3.1.2	Inhibition durch den Kupfer(I)-Chelator BCS	23
3.1.3	Mutation der Kupfer(II)bindungsstellen der Ektodomäne	24
3.1.4	Mutation der zytosolischen Kupfer(I)bindungsstelle	25
3.2	Mutationsanalyse der BACE1-Transmembransequenz	26
3.2.1	Sequenzvergleich der BACE1-Transmembransequenz	26
3.2.2	Mutation ausgewählter Aminosäuren der TMS	27
3.3	BACE1-Dimerisierung in lebenden Zellen	28
3.4	Wirkung verschiedener Metalle auf die metallvermittelte Kreuzvernetzung von Cys466	33
3.4.1	Wirkung von Quecksilber(II)	33
3.4.2	pH-Abhängigkeit der Kupfer(II)- und Quecksilber(II)-vermittelten Kreuzvernetzung	34
3.4.3	Wirkung von Nebengruppenmetallen mittlerer Härte	35
3.4.3.1	Zink(II)	35
3.4.3.2	Nickel(II)	36
3.4.3.3	Kobalt(II) und Mangan(II)	36
3.4.4	Wirkung von Palladium(II)	37
3.4.5	Wirkung von Silber(I)	38
3.4.6	Kreuzvernetzung durch Pd(II) und Ag(I) ist abhängig von Cys466	39
3.4.7	Wirkung von Kupfer und Ascorbinsäure	39
3.4.8	Wirkung des Oxidationsmittels KMnO ₄	40
3.5	Mutationsanalyse der BACE1-TMS bezüglich Interaktion	41

3.5.1	Analyse der BACE1-TMS-Interaktion durch Cystein-Austausch (<i>Cys-Scan</i>).....	41
3.5.2	Insertion zusätzlicher Cystein-Reste	43
3.6	Enzymatische Aktivität der BACE1-Oligomere.....	44
3.6.1	<i>In vitro</i> BACE1-Aktivitätstest	44
3.6.2	Zellbasierter Aktivitätstest mittels sAPP β -Freisetzung.....	45
3.7	Der Abbau von BACE1-Monomer und -Dimer	46
3.8	BACE1 im Kupferstoffwechsel von <i>Drosophila melanogaster</i>	48
3.9	BACE1 und der Abbau von A β (A β clearance)	51
4	Diskussion	54
4.1	BACE1-Dimerisierung	54
4.1.1	Die Wirkung von Kupfer und anderen Metallen auf die BACE1-TMS	55
4.1.2	Untersuchung der Transmembraninteraktion von BACE1 mittels <i>Cys-Scan</i>	59
4.1.3	Das AxxxAxxxA-Motiv und ein Strukturmodell	61
4.1.4	Die Homodimerisierung von BACE1 in lebenden Zellen	62
4.1.5	Der Einfluss der BACE1-Dimerisierung auf die BACE1-Aktivität und die APP-Spaltung.....	64
4.2	BACE1 und der Kupferstoffwechsel	65
4.3	BACE1 und der Abbau von A β	66
4.4	Konklusion und Ausblick	67
5	Material und Methoden	70
5.1	Geräte	70
5.1.1	Elektrophorese und Elektrobrot	70
5.1.2	Zellkultur	70
5.1.3	Zentrifugen	70
5.1.4	Chromatographie	70
5.1.5	Sonstige Geräte.....	70
5.2	Software	71
5.3	Verbrauchsmaterial	71
5.4	Chemikalien.....	72
5.5	Verwendete DNA-Konstrukte, Klonierungen und Mutagenese	74
5.5.1	Verwendete Bakterienmedien und -stämmen.....	74
5.5.2	Verwendete DNA-Vektoren	74
5.5.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR), Mutagenese und Mutagenese-Kit	74
5.5.4	Für Klonierungen und Mutagenesen verwendete Primer	74
5.5.5	Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten	75
5.5.6	Verwendete DNA-Konstrukte und Mutanten	75
5.6	SDS-PAGE und Western Blot	76
5.6.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	76
5.6.2	Western Blot.....	77
5.6.2.1	Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen	77
5.6.2.2	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen	77
5.6.2.3	Primärantikörper	78

5.6.2.4	Sekundärantikörper.....	78
5.6.2.5	Fluoreszentes Substrat für Röntgenfilmbelichtung.....	78
5.7	Zellbiologische Methoden.....	79
5.7.1	Zellkulturmaterial.....	79
5.7.2	Verwendete Zelllinie.....	79
5.7.3	Kultivierung der HEK293T-Zellen	79
5.7.4	Transfektion der HEK293T-Zellen.....	80
5.7.5	Zellyse.....	80
5.7.6	Metallvermittelte Kreuzvernetzung von BACE1	81
5.7.7	Zelloberflächenbiotinylierung und Isolierung der markierten Proteine.....	82
5.8	BACE1-Aktivitätstests	84
5.8.1	<i>In vitro</i> BACE1-Aktivitätstest	84
5.8.2	Zellbasierter Aktivitätstest mittels sAPP β -Freisetzung.....	85
5.9	ELISA zur Quantifizierung von A β	86
5.10	Massenspektrometrie und Probenvorbereitung	86
5.11	FLIM-FRET-Messungen	87
5.12	Erzeugung und Kultivierung der transgenen Fliegen.....	89
5.12.1	Das Expressionssystem	89
5.12.2	Kultivierung und Ernährung der Fliegen	90
5.12.3	Überlebenstest	90
5.13	Computer-basierte Methoden.....	91
5.13.1	Sequenzvergleich (<i>Alignment</i>).....	91
5.13.2	Modellierung der BACE1-TMS.....	91
6	Literatur	92
7	Anhang	103
7.1	Abkürzungsverzeichnis	103
7.2	Kodierung von Nukleinsäuren und Aminosäuren.....	105
7.2.1	Ein-Buchstabencode für die vier Basen der Desoxyribonukleinsäure	105
7.2.2	Ein- und Drei-Buchstabencode der proteinogenen Aminosäuren	106
7.3	Verwendete Primer für Klonierungen und Mutagenesereaktionen	107
7.4	Veröffentlichungen.....	108
7.4.1	Artikel	108
7.4.2	Konferenzbeiträge	108
7.5	Erklärung.....	109
8	Danksagung	110

1 ZUSAMMENFASSUNG

Das „ β -Site APP-Cleaving Enzyme 1“ (BACE1) ist eine membranständige Aspartat-Protease mit einer proteolytisch aktiven Ektodomäne, einer Transmembransequenz und einem kurzen zytosolischen Teil. Unter den bekannten BACE1-Substraten befindet sich das *Amyloid Precursor Protein* (APP). Die APP-Spaltung durch BACE1 ist der erste Schritt einer sequenziellen Prozessierung, welche letztlich zur Freisetzung des A β -Peptids führt. Da das neurotoxische A β 42-Peptid der Hauptverursacher der Alzheimer-Krankheit ist, stellt die Inhibition der β -Sekretase BACE1 eine der vielversprechendsten therapeutischen Strategien zur Prävention oder Bekämpfung der Alzheimer-Krankheit dar.

Der Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war die Tatsache, dass zwar der grundlegende β -sekretorische Spaltungsmechanismus von APP durch BACE1 bekannt war, jedoch nicht dessen Feinregulation auf Proteinebene. Insbesondere sollte die mögliche Bedeutung der gelelektrophoretisch bereits gezeigten Homodimerisierung für die Aktivität, Lokalisation, Stabilität oder Substraterkennung aufgeklärt werden. Darüber hinaus war das Ziel, die Rolle der bereits bekannten Kupferbindungsstellen in der Ektodomäne und im zytosolischen Teil für die β -Sekretase-Aktivität und einen potenziellen Zusammenhang zwischen Metallbindung und Oligomerisierung zu untersuchen.

Mit Hilfe von FLIM-FRET, einer mikroskopbasierten Technik zur Messung von Protein-Protein-Interaktion, konnte erstmalig die Homodimerisierung von BACE1 in lebenden Zellen gemessen werden, was darauf hindeutete, dass BACE1-Dimer eine Relevanz *in vivo* haben könnten.

Nach Behandlung von BACE1-transfizierten Zellen mit Cu(II) konnte per Western Blot die konzentrationsabhängige Stabilisierung von SDS- und reduktions-stabilen BACE1-Dimeren sowie, unter nicht-reduzierenden Bedingungen, BACE1-Tetrameren beobachtet werden. Mittels Mutationsanalyse wurde die kupfervermittelte Kreuzvernetzung von BACE1-Oligomeren auf den Cys466-Rest in der Transmembransequenz (TMS) von BACE1 zurückgeführt, welcher sich in dem metallbindungsstellenähnlichen M₄₆₂XXXC₄₆₆XXXM₄₇₀XXXC₄₇₄-Motiv befindet. Die metallvermittelte Kreuzvernetzung von SDS-stabilen Dimeren ließ sich ebenfalls mit dem Cu(II)-Analogon Pd(II) und dem Thiophil Hg(II) durchführen. Der Effekt der Kupferbehandlung konnte allerdings am besten mit dem redox-inerten Cu(I)-Analogon Ag(I) nachgestellt werden, wobei hier keine reduktions-stabilen Dimer, sondern nur SDS-stabile Dimere und Tetramere erhalten werden konnten. Es ergeben sich folgende Schlussfolgerungen: (1) Der kupfervermittelten Kreuzvernetzung geht eine Reduktion von Cu(II) zu Cu(I) voraus. (2) Die BACE1-Transmembransequenzen im Dimer/Tetramer bilden eine Metallbindungsstelle aus, deren wichtigster Bestandteil Cys466 darstellt, und die ihre höchste Affinität bei Bindung von Cu(I) entfaltet. (3) Die Stabilisierung von Tetrameren durch Cu(I) und Ag(I) findet wahrscheinlich unter Beteiligung von d¹⁰-d¹⁰-Wechselwirkungen (*Closed-Shell Complex*) der Metalle statt.

Die kupfervermittelte Kreuzvernetzung konnte in der Folge eingesetzt werden, um den Einfluss der BACE1-Dimerisierung auf die APP-Spaltung zu untersuchen. Ein zellbasierter Aktivitätstest offenbarte, dass die kupfervermittelte Kreuzvernetzung von BACE1 die β -sekretorische APP-Spaltung erhöht, was auf eine Erhöhung der Spaltungseffizienz von dimerem APP durch dimeres BACE1 zurückzuführen sein könnte. Mit diesem Ansatz konnte erstmalig ein Aktivitätsvergleich zwischen freiem BACE1, welches vermutlich in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen monomerem und oligomerem Zustand steht, und fest verbundenen Oligomeren, angestellt werden. Dabei zeigte sich ein direkter Zusammenhang zwischen der BACE1-Oligomerstabilisierung und der APP-Spaltung, was die Störung der Dimerisierung/Oligomerisierung zu einem neuen therapeutischen Ziel macht.

Neben der Metallbindung der TMS wurde nach weiteren Interaktionsmotiven gesucht, was zur Identifizierung des $A_{459}XXXA_{463}XXXA_{467}$ -Motivs führte. Dieses Motiv, welches mit dem $M_{462}XXXC_{466}XXXM_{470}$ -Motiv interkaliert vorliegt, ist typisch für Helix-Helix-Interaktionen innerhalb der Membran und diente als Basis zur Berechnung eines möglichen Strukturmodells des BACE1-TMS-Dimers.

Die Tatsache, dass BACE1 sowohl mit der Ektodomäne als auch innerhalb der TMS und im Zytosol Kupferionen binden kann, führte zu der Hypothese, dass BACE1 eine Funktion in der zellulären Kupferhomöostase übernimmt oder durch Kupfer reguliert wird. Ein Indiz für eine mögliche Rolle im Kupferstoffwechsel lieferte das *in vivo*-Modell *D.melanogaster*. Es konnte gezeigt werden, dass unter Kupfermangelbedingungen Fliegen mit einem *Ctrl1B* $-/-$ Hintergrund nur überlebten, wenn sie als Transgen humanes BACE1 exprimierten. Dies war ein deutliches Indiz dafür, dass BACE1 direkt oder indirekt die Kupferaufnahme der Fliegen stimulieren konnte.

Des Weiteren wurde einer möglichen Funktion von BACE1 beim Abbau von A β nachgegangen. Durch einen *in vitro*-Verdau mit BACE1 und MALDI-MS konnte eine neue Spaltstelle im A β C-terminal von Q₁₅ identifiziert werden. Außerdem zeigte sich im Zellkultursystem, dass der Abbau von A β durch BACE1 offenbar nur stattfindet, solange das A β -Peptid sich nach der Freisetzung durch die γ -Sekretase noch in Membrannähe befindet bzw. membranassoziiert vorliegt.

Zusammengefasst eröffnen die gezeigten Befunde eine neue Sichtweise auf die Struktur und Funktion der β -Sekretase BACE1, die offenbar mehr ist als ein Typ I-Membranprotein mit einer proteolytisch aktiven Ektodomäne. Stattdessen kann BACE1 als oligomerer, dynamischer Komplex mit einer funktionellen und interagierenden Transmembransequenz verstanden werden, der neben der APP-Spaltung (A β -Produktion) auch am Abbau von A β beteiligt sein könnte. Zusätzlich zur proteolytischen Aktivität bindet der Komplex Metallionen und könnte eine Rolle im Kupferstoffwechsel einnehmen.

1.1 SUMMARY

The “ β -site APP-cleaving enzyme 1” (BACE1) is an aspartic acid protease with its catalytic activity in the ectodomain, a single transmembrane helix, and a short cytosolic part. Among the known BACE1 substrates is the Amyloid Precursor Protein (APP). The cleavage of APP by BACE1 is the first step of a sequential processing eventually leading to the release of the A β peptide, of which the neurotoxic A β 42 is the major cause of Alzheimer’s disease (AD). Hence, the inhibition of the β -secretase BACE1 is one of the most promising therapeutic strategies to prevent or treat AD.

The starting point of this work was to examine the regulation of β -secretory activity of BACE1 on the protein level, since the principal mechanism of APP cleavage was known, but not the fine tuning. This especially included the putative influence of BACE1 homodimerization on activity, localization, stability, or substrate recognition. Furthermore, the objective was to define a role for the known copper-binding sites in the ectodomain and the cytosolic part and to elucidate a potential interrelation between metal binding and oligomerization.

By applying FLIM-FRET, a microscope-based technique used to measure protein–protein interactions, BACE1 homodimerization could be demonstrated in living cells for the first time. This finding is a strong indicator that the BACE1 dimer, which previously only has been shown by gel-electrophoretic methods, has relevance *in vivo*.

The treatment of BACE1-transfected cells with Cu(II) led to the concentration-dependent stabilization of SDS- and reduction-stable dimers as demonstrated by Western blotting. Under non-reducing conditions these dimers were accompanied by BACE1 tetramer bands. This copper-mediated crosslink could be assigned to Cys466, which is part of the M₄₆₂XXXC₄₆₆XXXM₄₇₀XXXC₄₇₄-motif within the transmembrane sequence (TMS) of BACE1, by using mutational analysis. The metal-mediated crosslink of SDS-stable dimers also worked with the Cu(II)-analog Pd(II) and the thiophile Hg(II). However, the effect of copper could be mimicked best by treating the cells with Ag(I), with the limitation that only SDS-stable dimers and tetramers and no reduction-stable dimers could be observed. The following conclusions can be drawn: (1) The copper-mediated crosslink is preceded by a reduction of Cu(II) to Cu(I). (2) The BACE1 transmembrane-sequences of a dimer/tetramer build a metal-binding site with Cys466 as its most important part and with the highest affinity towards Cu(I). (3) The stabilization of tetramers by Cu(I) and Ag(I) most probably involves d¹⁰-d¹⁰ interactions (*closed-shell complex*) of the metals.

The copper-mediated crosslink was then used to evaluate the influence of BACE1 dimerization on APP cleavage. By establishing a cell-based activity assay, it could be revealed that crosslinked BACE1 oligomers exhibited an elevated APP processing. The reason could be a higher cleavage efficiency due to dimeric APP being confronted with dimeric BACE1, with the latter not able to shift freely between monomeric and

oligomeric state anymore. This finding correlates BACE1-oligomer stabilization with APP cleavage and therefore suggests interference with dimerization/oligomerization as a novel therapeutic strategy.

Besides the metal-binding properties of the BACE1-TMS, the A₄₅₉xxxA₄₆₃xxxA₄₆₇-motif, which is typical for helix–helix interactions, could be identified. It is intercalated with the M₄₆₂xxxC₄₆₆xxxM₄₇₀-motif and served as the basis to calculate a structural model of the BACE1-TMS dimer.

Due to the fact that BACE1 possesses copper-binding site in the ectodomain, in its TMS, and in its cytosolic part, a potential involvement of BACE1 in the cellular copper homeostasis was examined by creating transgenic *D.melanogaster* which expressed human BACE1. Under copper-starvation conditions flies with an Ctr1B *-/-* background could only survive if they expressed BACE1. This was a clear indication that BACE1 directly or indirectly stimulated copper uptake in these flies.

Furthermore, the potential role of BACE1 for A β clearance was addressed by performing an *in vitro*-proteolysis and establishing a cell-culture system. MALDI MS measurements after *in vitro*-proteolysis revealed an additional cleavage site of BACE1 within the A β sequence C-terminally of Q₁₅. The results from the cell-culture system suggested that A β degradation by BACE1 will only take place as long as A β is still membrane-associated after release by γ -secretase cleavage.

Taken together, this work offers a new perspective on the structure and function of the β -secretase BACE1, since it demonstrates BACE1 to be more than just a type I-transmembrane protein with a proteolytically active ectodomain. Instead, BACE1 can be perceived as an oligomeric, dynamic complex with a functional and interactive TMS which could, in addition to its role in APP processing (A β production), be involved in A β clearance. Moreover, the complex binds metal ions and could take part in the copper homeostasis.

2 EINLEITUNG

2.1 Die Alzheimer-Krankheit

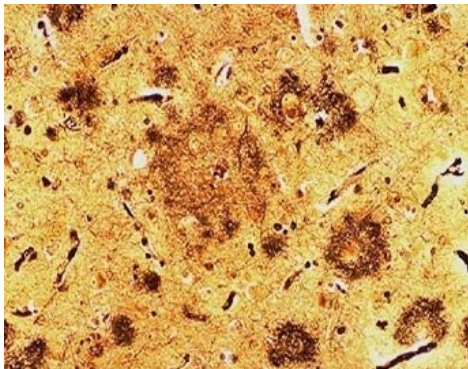


Abb. 1: Amyloid-Plaques im Gehirn eines Alzheimer-Patienten

Post mortem wurden die Amyloid-Plaques im hippocampalen Hirnschnitt eines Alzheimer-Patienten angefärbt.

Quelle: <http://www.case.edu/artsci/chem/faculty/zagorski/group/mission.html>

„Ich habe mich selbst verloren“, gab die Patientin Auguste Deter zu Protokoll, nachdem sie 1901 in der „Städtischen Anstalt für Irre und Epileptische“ in Frankfurt am Main eingeliefert worden war. Ihr behandelnder Arzt Alois Alzheimer registrierte bei ihr kognitive Störungen, begleitet von aggressiven und paranoiden Zuständen, Sprachstörungen, auditiven Halluzinationen und Erinnerungsverlust (Maurer 1997). Nach ihrem Tod 1906 nahm er eine detaillierte Untersuchung der Hirnveränderungen vor, deren Ergebnisse in den Arbeiten „Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“ (Alzheimer 1907) und „Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters“ (Alzheimer 1911) veröffentlicht wurden. Die Beschreibungen dieser neuartigen Demenz (von lat.

dementia = „ohne Geist“) beinhaltete auffällige Veränderungen wie amyloide („stärkeähnliche“) Ablagerungen (Abb. 1), Atrophie der Hirnwindungen und eine Verbreiterung der zwischen diesen Windungen gelegenen Hirnfurchen (Abb. 2). Alois Alzheimer, nach dem die Krankheit schließlich benannt wurde, legte mit seiner Forschung einen Grundstein für die modernen Neurowissenschaften, indem er einen Zusammenhang zwischen Verhalten und Psyche eines Patienten mit dessen Hirnphysiologie und Pathologie herstellte.

Vor allem aufgrund der geringen Lebenserwartung trat die Krankheit Anfang des 20. Jahrhunderts noch relativ selten auf. Heute hingegen sind schätzungsweise 7-10% der über 65-Jährigen und bis zu 40% der über 80-Jährigen betroffen (Sisodia 1999). 2006 gab es weltweit 26,6 Millionen Alzheimer-Patienten und nach einer aktuellen Hochrechnung werden es im Jahr 2050 rund 100 Millionen sein, falls es nicht gelingen sollte, die Prävalenz mit Hilfe von medizinischen Präventivmaßnahmen zu senken (Brookmeyer 2007). In Deutschland gibt es zurzeit etwa



Abb. 2: Hirnatrophie im fortgeschrittenen Alzheimer-Stadium

Im Vergleich zum gesunden Gehirn (linke Seite) nimmt Volumen und Masse des Gehirns eines Alzheimer-Patienten (rechte Seite) im fortgeschrittenen Stadium deutlich ab (Atrophie) und die Hirnfurchen vertiefen sich.

Quelle: <http://www.alz.org>

1,1 Millionen Demenzkranke, wobei die Alzheimer-Krankheit mit einem Anteil von etwa zwei Drittel die häufigste Form der Demenz darstellt (Deutsche Alzheimer Gesellschaft, Stand 2008).

Zum einen gibt es die früh (im Alter von 40-50 Jahren) einsetzende familiäre Alzheimer-Krankheit (*Early Onset Familial Alzheimer's Disease*, EOFAD), die allerdings weniger als 2% der Krankheitsfälle ausmacht und direkt auf einzelne Mutationen in bestimmten Genen wie dem Presenilin 1 und 2 (PS1 und 2) und dem *Amyloid Precursor Protein* (APP) (siehe Abschnitt 2.2) zurückgeführt werden können (Sorbi 2001). Zum anderen gibt es die sporadische, später einsetzende Form der Alzheimer-Krankheit (auch *Late Onset Alzheimer's Disease*, LOAD), die mit 98% den weitaus größten Teil der gesamten Krankheitsfälle ausmacht. Für letztere gibt es Risikofaktoren wie Kopfverletzungen, das Allel $\epsilon 4$ des Apolipoproteins E (Sorbi 2001) oder einen hohen Cholesterin-Spiegel (Michikawa 2004), vor allem aber das Altern an sich.

Aufgrund der Weiterentwicklung der Sequenzieretechniken und der *Chip*-basierten Analysemethoden von Genmutationen (*Single Nucleotide Polymorphisms*, SNPs) war es in jüngster Vergangenheit möglich, größere Probenmengen aus der Bevölkerung auf genetische Unterschiede zu untersuchen und mit der Auftrittswahrscheinlichkeit der Alzheimer-Krankheit zu korrelieren. Mit Hilfe dieser genomweiten Assoziationsstudien (*Genome-Wide Association Studies*, GWAS) gelang es, weitere, weniger dominante Risikogene wie *CLU* (*Clusterin*, Apo J), *PICALM* und *CR1* (Harold 2009; Lambert 2009) zu charakterisieren. Weitere Aufschlüsse über den Einfluss von genetischen Unterschieden auf das Erkrankungsrisiko sind in naher Zukunft mittels *Next-Generation Sequencing* zu erwarten, mit dessen Hilfe komplette Genome von Individuen sequenziert und verglichen werden können (Cirulli 2010).

Obwohl die Ursachen der FAD besser verstanden sind als die der sporadischen AD, bei der neben genetischen Faktoren noch Umweltfaktoren inklusive Ernährung und Verhaltensweise (geistige und körperliche Aktivität) eine Rolle spielen (Wilson 2002), gibt es für beide Formen trotz langjähriger Forschung weder eine zuverlässige Frühdiagnose noch eine Heilung. Die Patienten sterben in der Regel nicht an der Alzheimer-Krankheit selbst, sind jedoch im späten Stadium zu eigenständigen Handlungen nahezu unfähigen und erliegen opportunistischen Infektionskrankheiten.

2.2 APP, A β , die amyloiden Plaques und die γ -Sekretase

Eine der wichtigsten Fragen zur Aufklärung der Alzheimer-Krankheit war es, die Bestandteile der amyloiden Plaques zu identifizieren. Erst Mitte der 1980er Jahre gelang durch Proteinsequenzierung der Befund, dass es sich beim Hauptbestandteil nicht etwa, wie ursprünglich angenommen, um „stärkeähnliche“ Ablagerungen, sondern um ein aggregiertes Peptid handelte. Die gefundene Sequenz stimmte zwar mit keinem bis dahin bekannten Protein überein, jedoch konnten Glenner und Wong eine Übereinstimmung der vaskulären, amyloiden Ablagerung bei der Alzheimer-Krankheit und derjenigen beim Down-Syndrom (Trisomie 21) feststellen, was eine Lokalisation des unbekanntes Gens auf dem Chromosom 21 nahe legte (Glenner 1984). In der Folge wurde von Masters et al. gezeigt, dass die amyloiden Plaques als Hauptbestandteil ebenfalls aus dem A β -Peptid bestehen (Masters 1985).

Das wegen seiner ausgeprägten β -Faltblatt-Strukturen zunächst beta-Protein getaufte und dann in A β umbenannte Proteinfragment stammt aus dem ubiquitär exprimierten Typ I-Transmembranprotein (N-Terminus extrazellulär, C-Terminus intrazellulär) APP und wird durch mehrere proteolytische Spaltungsschritte freigesetzt. Sowohl APP als auch die beiden zur gleichen Gen-Familie gehörenden *Amyloid Precursor Like Proteins* (APLP1 und APLP2) besitzen einen kurzen intrazellulären Abschnitt und eine lange extrazelluläre Ektodomäne, werden ubiquitär im menschlichen Organismus und anderen Säugern exprimiert und sind Substrate für verschiedene Proteasen. Die Tatsache, dass eine ganze Reihe von Spleißvarianten des APP existiert, erschwert das Verständnis der Funktion und Prozessierung (Tanzi 1988; Panegyres 2000). Im Folgenden ist die in Neuronen dominierende Variante APP695 gemeint, wenn von APP die Rede ist.

Ein wichtiger Regulationspunkt für den Transport und die Prozessierung von APP stellt vermutlich die Homodimerisierung und die Heterodimerisierung mit den homologen APLPs dar (Scheuermann 2001; Soba 2005; Kaden 2008; Kaden 2009). Laut Scheuermann et al. gibt es mindestens zwei Dimerisierungsstellen in der Ektodomäne von APP; eine davon ist eine Kollagen-Bindungsstelle, die andere liegt weiter N-terminal im Bereich der Kupferbindungsstelle. Eine dritte Dimerisierungsstelle, die innerhalb der Transmembransequenz (TMS) liegt und konsekutive GxxxG-Motive als zentralen Bestandteil beinhaltet, wurde von Münter et al. beschrieben (Munter 2007).

Eine Übersicht über die APP-Prozessierung liefert Abb. 3. Der überwiegende Teil des APP wird nicht-amyloidogen von den α -Sekretasen ADAM10, 9, 17 (TACE, *Tumor Necrosis Factor α -Converting Enzyme*) oder 19 (*A Disintegrin and Metalloproteinase*) an Position 612 geschnitten (Lammich 1999; De Strooper 2000; Postina 2004), was zur Freisetzung der neurotroph und neuroprotektiv wirkenden Ektodomäne sAPP α führt (Small 1994; Furukawa 1996). Es verbleibt das C-terminale Transmembranfragment C83 (α -CTF, α -Stub) als Substrat für die γ -Sekretase (siehe unten).

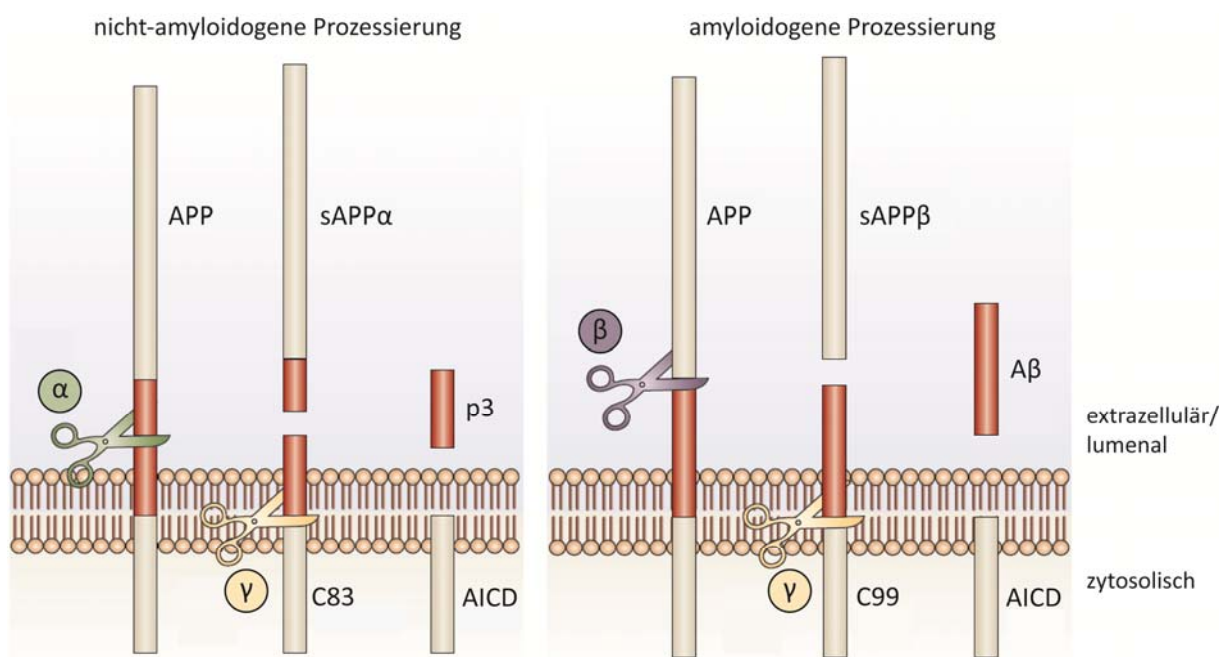


Abb. 3: Die amyloidogene und nicht-amyloidogene Prozessierung von APP

Linke Seite: Nicht-amyloidogene Prozessierung von APP. Eine Protease der ADAM-Familie führt den initialen Schnitt aus und setzt das neurotrophe sAPP α (lösliche Ektodomäne von APP nach α -Schnitt) frei. Das zurückgebliebene C83 (α -Stub) wird durch die γ -Sekretase zu AICD und nicht-amyloidogenem p3-Peptid gespalten.

Rechte Seite: Amyloidogene Prozessierung von APP. Die β -Sekretase führt den initialen Schnitt aus und setzt sAPP β frei. Das C99 (β -Stub) wird durch die γ -Sekretase zu AICD und dem toxischen, amyloidogenen A β -Peptid gespalten.

Abbildung modifiziert nach (De Strooper 2010)

Schneidet hingegen die β -Sekretase BACE1 an Position 596, wird sAPP β freigesetzt und das längere C99 (β -CTF, β -Stub) verbleibt als Substrat für die γ -Sekretase in der Membran. Im Falle der nicht-amyloidogenen Prozessierung setzt der nachfolgende Schnitt durch die γ -Sekretase das Peptid p3 und das intrazelluläre Fragment von APP (AICD) frei; im Falle der amyloidogenen Prozessierung entsteht A β und AICD, wobei die Freisetzung jeweils nicht in einem Schritt entsteht, sondern durch mehrere aufeinanderfolgende, intramembranäre Schnitte eine schrittweise Verkürzung (*epsilon*-, *zeta*- und *gamma*-Schnitt) des C83 bzw. C99 stattfindet (Weidemann 2002; Zhao 2004; Qi-Takahara 2005; Munter 2007). Nach Qi-Takahara et al. und Münster et al. gibt es dabei zwei Produktlinien: Die erste startet bei A β 49 und führt durch schrittweise Abspaltung von Tripeptiden über A β 46 und A β 43 zu dem Hauptprodukt A β 40. Die andere Produktlinie startet bei A β 48 und führt über A β 45 zu dem toxischeren Hauptprodukt A β 42. Da inzwischen der Nachweis der entstehenden Tripeptide mit Hilfe von Massenspektrometrie gelang, wurde dieses Modell bestätigt (Takami 2009).

Was die Zytotoxizität der verschiedenen A β -Spezies angeht, muss nicht nur die Länge, sondern auch der Aggregationszustand der Peptide differenziert betrachtet werden. So scheinen es weniger die abgelagerten Plaques zu sein, die eine toxische Wirkung entfalten, als vielmehr die löslichen A β 42-Oligomere, die zu einem viel früheren Zeitpunkt des Krankheitsverlaufs sowohl intra- als auch extrazellulär vorkommen und die kognitiven Fähigkeiten der Betroffenen beeinträchtigen (Dahlgren 2002; Walsh 2002; Cleary 2005; Shankar 2007; Selkoe 2008; Harmeier 2009).

Auf die γ -Sekretase soll an dieser Stelle nur kurz eingegangen werden. Es handelt sich dabei um einen multimeren Proteinkomplex mit bis zu 72 Transmembranhelices, der aus Presenilin 1 oder 2 (PS1/2) mit 7 bis 8 Transmembranhelices (TMHs), APH1 mit 7 TMHs, PEN2 mit 2 TMHs und dem Typ I-Transmembranprotein Nicastrin (Nct) (Brunkan 2005) besteht. Das Substrat für den γ -Sekretase-Komplex ist nicht das Vollängen-APP, sondern die bereits proteolytisch verkürzte Form. Allgemein kann die γ -Sekretase ihre Substrate nur schneiden, wenn zuvor eine Verkürzung durch eine andere Protease wie BACE1 oder eine der ADAMs stattgefunden hat. Dies könnte einen wichtigen Regulationsschritt der proteolytischen Aktivität darstellen, da die γ -Sekretase auch als eine Art Proteasom der Membran angesehen wird, welches ohne Regulation sämtliche Membranproteine unselektiv abbauen würde (Kopan 2004). Die Hemmung der γ -Sekretase ist als therapeutischer Ansatz wegen starker Nebenwirkungen ungeeignet, da es neben APP noch eine Vielzahl anderer Substrate gibt (Beel 2008), deren Spaltung essentiell für das Funktionieren der Zelle ist. So gibt es beispielsweise zahlreiche Krankheiten, die mit einem Defekt der Notch-Signalwege einhergehen (Joutel 1998).

2.3 β -Site APP-Cleaving Enzyme 1 (BACE1)

2.3.1 Die Familie der Aspartat-Proteasen

Die β -Sekretase wurde von vier Arbeitsgruppen unabhängig voneinander und mit verschiedenen Methoden identifiziert (Hussain 1999; Sinha 1999; Vassar 1999; Yan 1999). Als Name für die auf Chromosom 11 entdeckte Aspart-Protease hat sich schließlich BACE1 (*β -Site APP-Cleaving Enzyme 1*) etabliert, wobei noch die Synonyme Memapsin2 (*Membrane-Associated Aspartate Protease 2*) und Asp2 existieren. Das auf Chromosom 21 lokalisierte Homolog BACE2 wird auch Memapsin1 oder Asp1 genannt (Acquati 2000).

Die Aspartat-Proteasen BACE1 und BACE2 stimmen untereinander inklusive konservativem Austausch zu 62% überein. Im Vergleich zu den Aspartat-Proteasen der Pepsin-Familie gibt es eine Ähnlichkeit von 40-44%, und selbst virale Enzyme, wie die HIV-Protease (HIV asp), sind noch eng verwandt, was für eine starke Konservierung des proteolytischen Mechanismus spricht (Abb. 4). Die Besonderheit von BACE1 und BACE2 gegenüber den anderen Asp-Proteasen sind die Transmembransequenzen, so dass sie zu Typ I-Membranproteinen zu zählen sind. Alle Familienmitglieder besitzen die für die proteolytische Spaltung benötigten Aspartat-Reste, die in der Regel in das Motiv D(S/T)G(T/S) eingebunden sind. Zwei Aspartat-Reste wirken im aktiven Zentrum zusammen, um ein Wassermolekül zu aktivieren und dessen nukleophilen Angriff auf den Carbonyl-Kohlenstoff der zu hydrolysierenden Peptidbindung zu ermöglichen (Northrop 2001).

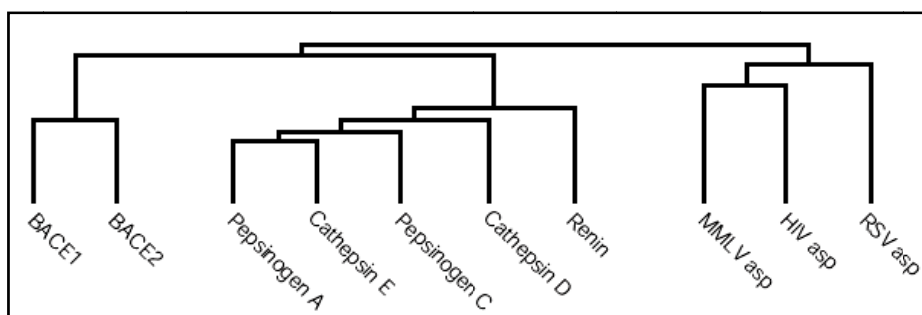


Abb. 4: Evolutionärer Stammbaum einiger Aspartat-Proteasen

Vor allem die Ektodomänen von BACE1 und 2 weisen einige Sequenzübereinstimmungen mit den nicht-membranständigen Aspartat-Proteasen der Cathepsin- und Pepsin-Familie, aber auch mit viralen Proteasen wie der HIV-Protease (*HIV asp*) auf.

Quelle: (Citron 2004)

BACE1 trägt pro Polypeptidkette zwei katalytische Aspartat-Reste (D93 und D289, siehe auch 2.3.2), die zusammen ein aktives Zentrum bilden, kann also im Prinzip als Monomer aktiv werden, während beispielsweise die HIV-Protease nur einen Asp-Rest und somit ein halbes aktives Zentrum besitzt. Zur Aktivierung muss sie ein Homodimer bilden. Der Frage, inwiefern die Dimerisierung von BACE1 eine

Relevanz für die Aktivität oder Substraterkennung besitzt, wird in Abschnitt 2.3.4 und im Verlaufe des Ergebnisteils nachgegangen.

Im Gegensatz zu Presenilin wurden im BACE1-Gen, welches aus 9 Exons auf Chromosom 11 besteht und ein Hauptprodukt aus 501 Aminosäuren kodiert, bisher keine Punktmutationen gefunden, die den Ausbruch oder Verlauf der Alzheimer-Krankheit entscheidend beeinflussen (Murphy 2001). Allerdings gibt es neben dem Hauptprodukt drei weitere Spleißvarianten, bei denen Teile von Exon 3 und/oder 4 fehlen (Tanahashi 2001). Obwohl die aktiven Zentren von der Verkürzung nicht betroffen sind, zeigen diese BACE1-Varianten eine starke Verringerung bei der A β -Produktion, was für eine Veränderung der Substratspezifität, enzymatischen Aktivität oder Lokalisation spricht. Eehalt et al. berichteten über eine differentielle Expression der Spleißvarianten in Abhängigkeit vom Gewebe und über Unterschiede bei der zellulären Lokalisation (Eehalt 2002). Während BACE1C vor allem im Pankreas vorkommt und BACE1B und C zum größten Teil im ER verbleiben, findet man BACE1A im Golgi, in Endosomen und an der Plasmamembran. Die Struktur-Berechnung der vier Spleißvarianten im Computer ergab deutliche Unterschiede in den Tertiärstrukturen, nicht zuletzt, weil bei den BACE1-Varianten B, C und D bis zu zwei der vier N-Glykosylierungsstellen fehlen (Furnham 2004).

2.3.2 Strukturelle Aspekte von BACE1 und posttranslationale Modifikationen

Wie die meisten Proteasen wird BACE1 mit einer Prodomäne als Zymogen synthetisiert, wobei das Propeptid (AS 21-46), welches auf das Signalpeptid (AS 1-21) folgt, in diesem Fall kaum eine inhibitorische Wirkung auf die Aktivität zu haben scheint, sondern lediglich die Faltung der aktiven Domäne begünstigt (Shi 2001). Außerdem beeinflusst die durch Furin und andere Prokonvertasen an der Erkennungssequenz RXXR abgespaltene Prodomäne die zelluläre Lokalisation: Ohne diese wird BACE1 kaum aus dem ER in den Golgi-Apparat weitertransportiert und kann so nicht vollständig reifen (Benjannet 2001).

Die drei intramolekularen Disulfid-Brücken haben eine für die Asp-Proteasen der Pepsin-Familie ungewöhnliche Anordnung (Haniu 2000) und sorgen zusammen mit einem hohen Anteil von β -Faltblatt-Domänen für eine relativ kompakte Struktur mit einer Art Spalte für die Substratbindung. Es gibt mit Asn153, Asn172, Asn223 und Asn354 vier Asparagin-Reste, die in der Konsensussequenz NX(S/T) auftreten und somit potenzielle N-Glykosylierungsstellen darstellen. Wird in Betracht gezogen, dass bei den Spleißvarianten B und D (siehe 2.3.1) zwei der vier Glykosylierungsstellen fehlen und diese eine deutlich geringere enzymatische Aktivität haben, lässt sich folgern, dass die Glykosylierungen eine wichtige Funktion bei der Faltung des aktiven Zentrums oder bei der Substratbindung übernehmen. Ein weiteres Indiz hierfür ist, dass rekombinant in Insektenzellen exprimiertes BACE1 ohne vollständige Glykosylierung eine sehr geringe Affinität und Umsatzrate gegenüber APP zeigt (Gruninger-Leitch 2002). Interessanterweise reift die rekombinant exprimierte Ektodomäne von BACE1 zur aktiven Protease, während membrangebundenes BACE1 ohne den

zytosolischen Teil nicht oder nur zu einem geringen Anteil reift und nicht durch den Golgi-Apparat transportiert wird (Capell 2000). Einmal gereift und in der Plasmamembran angekommen, sorgt ein C-terminales Di-Leucin-Motiv für den zielgerichteten Transport in die Endosomen, so dass BACE1 vermutlich zwischen Plasmamembran und Endosomen zirkuliert, tendenziell allerdings in den Endosomen akkumuliert (Huse 2000). Ein weiterer Regulationspunkt für den intrazellulären Transport von BACE1 ist die Phosphorylierungsstelle Ser498 (Walter 2001; von Arnim 2004), gezeigt durch die Akkumulation der phosphorylierungsdefizienten BACE1-Mutante S498A in peripheren Endosomen. Darüber hinaus spielen die GGA-Adapterproteine (*Golgi-Localized γ -Ear-Containing ARF-Binding Proteins*), die an den zytosolischen Teil von BACE1 binden können, für den Transport und die Regulation des BACE1-Abbaus eine wichtige Rolle (He 2002; Shiba 2004; von Arnim 2004; He 2005; Wahle 2005; Tesco 2007; Kang 2010).

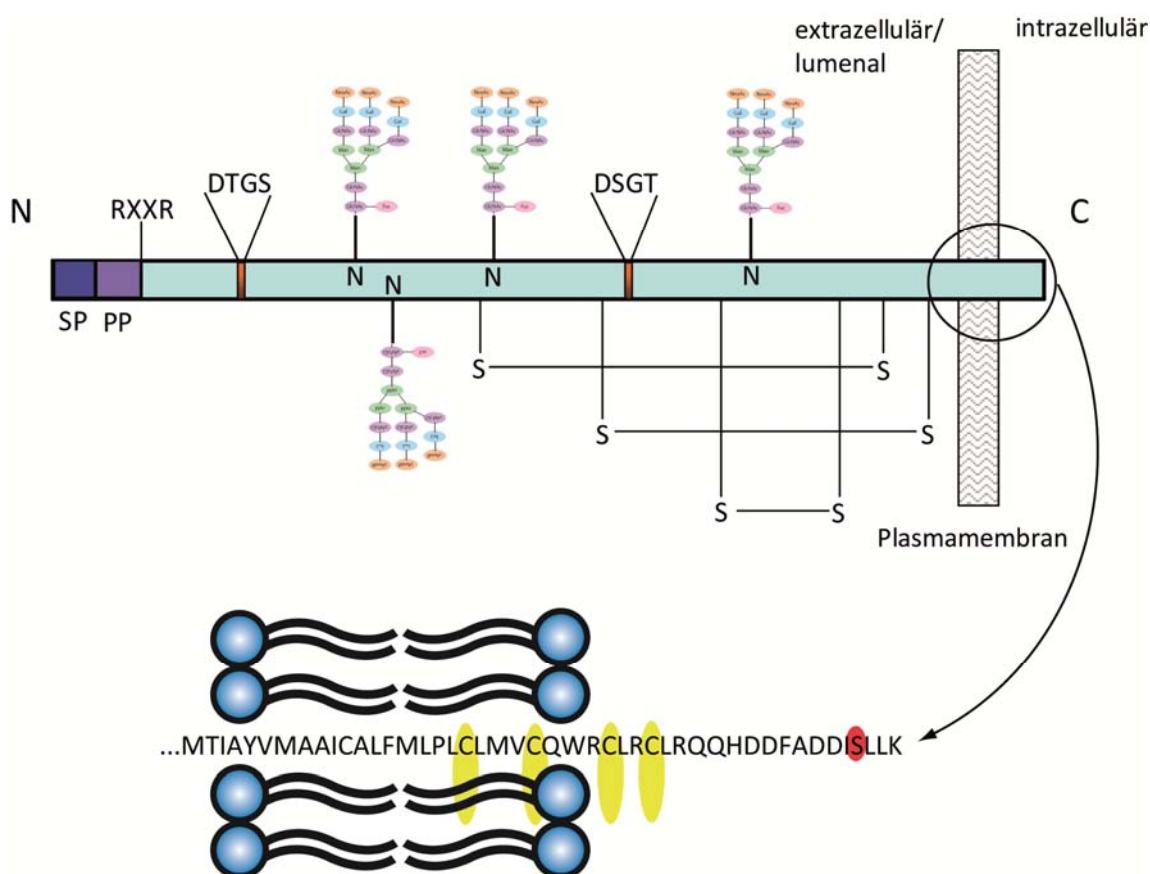


Abb. 5: Schematische Darstellung von BACE1 mit Sequenzeigenschaften und posttranslationalen Modifikationen

Obere Bildhälfte: Schematische Darstellung von BACE1 in voller Länge; N, N-Terminus; C, C-Terminus; SP, Signalpeptid AS 1–21; PP, Propeptid AS 21–46; N mit Oligosaccharid, potenziellen N-Glykosylierungsstellen Asn153, Asn172, Asn223 und Asn354, S, Cystein-Reste in intramolekulare Disulfidbrücken: Cys216–Cys420, Cys278–Cys443, Cys330–Cys380; D(S/T)G(T/S), Konsensussequenzen der Aspartat-Reste im aktiven Zentrum; RXXR, Spaltstelle für Furin

Untere Bildhälfte: Vergrößerung der Transmembransequenz und des zytosolischen Teils; gelbe Ellipsen, potentiell palmitoylierte Cys-Reste Cys474, Cys478, Cys482 und Cys485; rote Ellipse, Phosphorylierungsstelle Ser498

Die potenzielle Palmitoylierung der C-terminalen Cys-Reste Cys478, Cys482 und Cys485 beeinflusst die Lokalisation der BACE1-Moleküle innerhalb der Plasmamembran, da Acyl-Ketten eine Lokalisation in den cholesterinreichen *Lipid Rafts* begünstigen (Simons 1997; Benjannet 2001; Riddell 2001; Tun 2002; Vetrivel 2009). Durch die künstliche Verknüpfung der β -Sekretase mit einem GPI-Anker, der eine verstärkte Lokalisation der Protease in den Triton X-100-resistenten *Lipid Rafts* nach sich zog, konnte eine erhöhte A β -Produktion nachgewiesen werden (Cordy 2003).

2.3.3 BACE1-Spaltstellen im APP, A β (A β clearance) und weitere Substrate

Die Substratspezifität von BACE1 ist nicht eindeutig durch die zu spaltende Primär-Sequenz bestimmt, denn obwohl APP und dessen Homologe APLP1 und APLP2 an der gleichen Position oberhalb der Transmembransequenz von BACE1 geschnitten werden, weisen die Sequenzen der drei Proteine in diesem Bereich so gut wie keine Übereinstimmung auf (Li 2004). Andererseits kann man durch Einfügen einer APP-Sequenz von sieben Aminosäuren (vier vor und drei hinter der β -Spaltstelle) in gleichem Abstand zur Membran in andere Typ I-Transmembranproteine BACE1-Spaltstellen einführen. Die bekannteste Mutation im APP, die zu einer stark erhöhten Spaltungseffizienz durch BACE1 führt, ist die Schweden-Mutation. Sie wurde bei der Untersuchung von FAD-Fällen in Schweden entdeckt und zeichnet sich durch die doppelte Punktmutation K670N/M671L (bezogen auf APP770) direkt vor der β -Schnittstelle aus (Mullan 1992). Demnach scheint sich die mehr oder weniger spezifische Spaltstelle aus einer Mischung aus Sequenz, Struktur und Abstand von der Membran zu definieren.

Zusätzlich oder alternativ zur β -Schnittstelle, die das C99 in der Membran zurücklässt, kann BACE1 das APP um zehn Aminosäuren C-terminal verschoben schneiden und erzeugt so das C89 (β' -Schnitt), was nach dem γ -Schnitt zur Freisetzung der ebenfalls amyloidogenen Peptide A β 11-40/42 führt (Abb. 6) (Lee 2003).

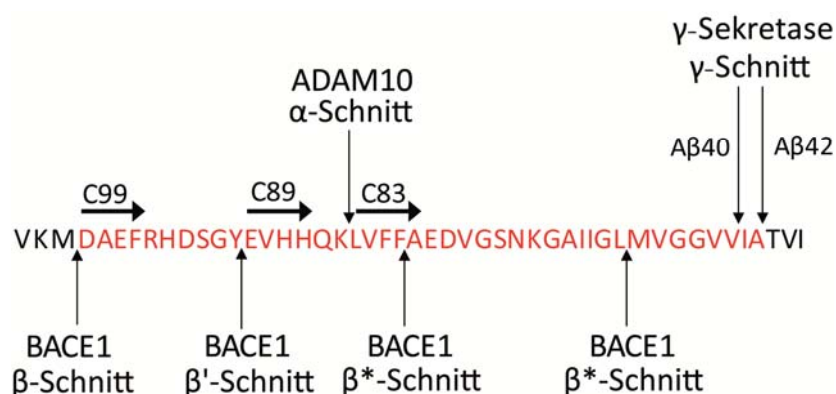


Abb. 6: Übersicht der α -, β - und γ -Schnittstellen im APP/A β

In rot ist die A β -Region der APP-Sequenz dargestellt. Die vertikalen schwarzen Pfeile geben jeweils die Schnittstellen der verschiedenen Proteasen an, die horizontalen schwarzen Pfeile zeigen das C-terminale Fragment nach entsprechendem Schnitt. Mit β^* sind die Schnittstellen gekennzeichnet, an denen A β durch BACE1 *in vitro* gespalten werden kann (Position 20 und 34).

Weitere bekannte BACE1-Substrate sind neben den APLPs die Sialyltransferase ST6Gal-I (Kitazume 2003), das Zelladhäsionsprotein P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1) (Lichtenthaler 2003) und die β -Untereinheit eines spannungsgesteuerten Natrium-Kanals (VGSC β , *Voltage-Gated Sodium Channel*) (Kim 2005; Wong 2005). Die Funktionen dieser Substrate sind weitgehend unklar, da BACE1 *Knockout*-Mäuse nach einer Studie von Dominguez et al. abgesehen von einer leicht erhöhten neonatalen Sterblichkeit und leichter Hyperaktivität relativ gesund waren (Dominguez 2005). Die leichten neurologischen Auffälligkeiten und vor allem die neonatale Sterblichkeit der BACE1 *Knockout*-Mäuse wurden durch den Befund erklärt, dass die BACE1-Expression bei neu geborenen Wildtyp-Mäusen normalerweise besonders hoch ist. Offenbar hat die β -Sekretase-Aktivität eine wichtige physiologische Funktion bei der Entwicklung der Mäuse. Tatsächlich konnte in zwei Arbeiten gezeigt werden, dass das neuronale Signalmolekül Neuregulin (Nrg1, TyplII, β 1) ein Substrat von BACE1 ist, und die Freisetzung eines Nrg1-Fragments durch den β -Sekretase-Schnitt für die Bildung von voll funktionsfähigen Myelin-Scheiden notwendig ist (Hu 2006; Willem 2006). Außerdem zeigte sich bei einer eingehenderen Untersuchung von BACE1 *Knockout*-Mäusen und deren Neuronen eine Übererregbarkeit und Neigung zu epileptischen Anfällen (Hu 2010).

Die Interaktion zwischen BACE1 und APP gewinnt durch die Tatsache an Komplexität, dass BACE1 zusätzlich nach dem Schnitt der γ -Sekretase, also nach Freisetzung von A β , zwei weitere Schnitte an Position 20 und 34 der A β -Sequenz ausführen kann (β^* -Schnitt, Abb. 6). Dies wurde bisher allerdings nur *in vitro* nachgewiesen. In diesem Fall wäre die Wirkung anti-amyloidogen, da das C-terminal verkürzte A β 1-34 nicht mehr aggregiert (Fluhrer 2003; Shi 2003) und folglich keine toxische Wirkung mehr entfaltet. Zwar ist mittlerweile eine Vielzahl von Proteasen wie Insulysin (*Insulin Degrading Enzyme*, IDE) oder Neprilysin bekannt (Abb. 7), die A β *in vivo* und/oder *in vitro* spalten können und die in verschiedenen Zellkompartimenten aktiv werden (Mukherjee 2002; Leissring 2008), BACE1 wird im Zusammenhang mit dem Abbau von A β allerdings bisher nicht in Betracht gezogen. Inwiefern der Abbau von A β durch BACE1 *in vivo* eine Bedeutung haben könnte, ist ungeklärt. Im Rahmen dieser Arbeit soll auf diese Frage eingegangen werden.

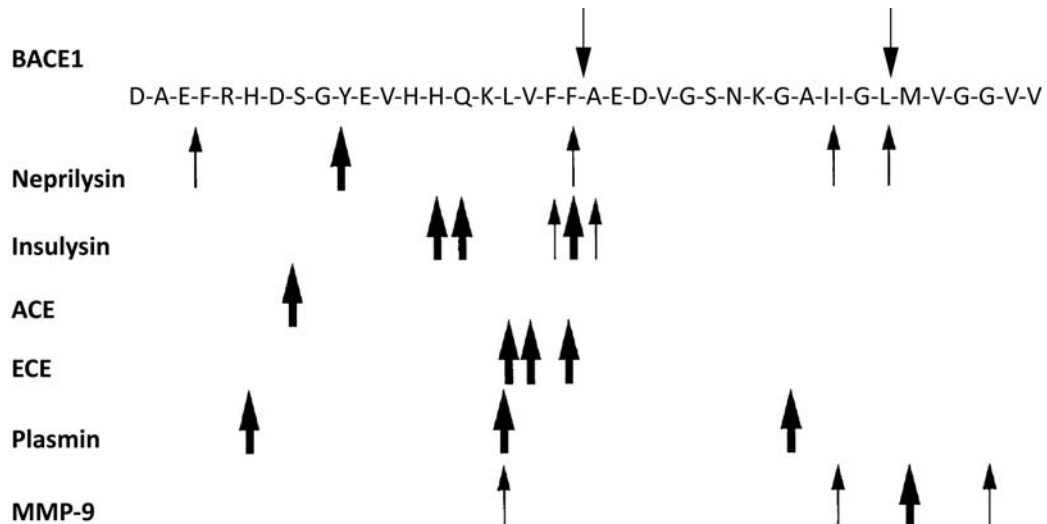


Abb. 7: Aβ-spaltende Proteasen mit bekannten Schnittstellen

Anhand von Aβ40 ist dargestellt, welche zellulären Proteasen Aβ spalten und abbauen können; schwarze Pfeile markieren bekannte Schnittstellen, die Dicke der Pfeile symbolisiert die Präferenz für eine Schnittstelle; ACE, *Angiotensin Converting Enzyme*; ECE, *Endothelin Converting Enzyme*; MMP-9, *Matrix Metalloproteinase-9*. BACE1 kann *in vitro* nach AS 20 und 34 spalten.

Modifiziert nach (Mukherjee 2002)

2.3.4 Homodimerisierung von BACE1

Wie zuvor erwähnt, muss die virale Protease *HIV asp* Homodimere bilden, um aktiv zu werden, während die monomere Polypeptid-Kette von BACE1 bereits beide Aspartat-Reste für ein vollständiges aktives Zentrum beinhaltet. Es wurde allerdings mit Hilfe verschiedener gelelektrophoretischer Methoden und Immunpräzipitation gezeigt, dass BACE1 als Homodimer aus Zellkultur und Hirngewebe isoliert werden kann (Sidera 2002; Marlow 2003; Schmechel 2004; Westmeyer 2004). Ein weiteres Indiz dafür, dass BACE1-Homodimere *in vivo* eine Rolle spielen könnten, lieferten Jin et al. (Jin 2010). BACE1-Mutanten, denen eines der beiden Aspartate D93 oder D289 fehlte, zeigten im Zellkultursystem keine proteolytische Aktivität. Wenn allerdings die beiden Mutanten co-transfiziert wurden, konnte die Aktivität wieder hergestellt werden, was die Interpretation zulässt, dass BACE1-D93A- und BACE1-D289A-„Heterodimere“ aus den beiden Mutanten gebildet wurden, bei denen die fehlenden Asp-Reste jeweils vom Bindungspartner ersetzt werden konnten. BACE1 kann also offenbar als Dimer aktiv sein, was indes nicht die Frage beantwortet, welche Konsequenz die Dimerisierung von Wildtyp-BACE1 für die Aktivität und Substraterkennung in Bezug auf APP hat, und welche Teile des Proteins die Dimerisierung vermitteln.

2.4 Metalle und die Alzheimer-Krankheit

2.4.1 Allgemeines zur Metallchelatierung durch Proteine

Metallionen spielen in biologischen Systemen höchst vielfältige und essentielle Rollen. Abgesehen von den Salzen der Alkali- und Erdalkalimetalle Natrium, Kalium, Magnesium oder Kalzium, die im menschlichen Körper in hohen Konzentrationen vorkommen, liegen die Metallionen allerdings selten „frei“, also in wässriger Lösung, sondern über biologische Makromoleküle koordiniert, vor. Dies gilt vor allem für so genannte Spurenelemente, deren Konzentrationen gering sind und die durch gerichteten Transport an einen bestimmten Zielort gebracht werden müssen. Oft handelt es sich dabei um Schwermetalle wie Kupfer oder Kobalt, die in größerer Menge und unkomplexiert eine toxische Wirkung entfalten würden.

Oberflächlich betrachtet gibt es eine ganze Reihe von funktionellen Gruppen in Proteinen, die zur Koordination von Metallionen dienen können. Sowohl der N- und C-Terminus der Polypeptid-Kette (Amino- bzw. Carboxyl-Gruppe) als auch die vielen Peptidbindungen (Amid-Bindungen) des Peptidrückgrats können über ihre freien Elektronenpaare an einer Chelatierung teilnehmen. Spezifischere Wechselwirkungen gehen allerdings in der Regel von den Seitenketten der Aminosäuren aus, die zur Ausbildung von Metallbindungsstellen in einer bestimmten Geometrie angeordnet vorliegen können. Immerhin 12 der 20 proteinogenen Aminosäuren können theoretisch über Carboxyl- (Asp, Glu), Amid- (Asn, Gln), Amin- (Lys), Thiol- (Cys), Thioether- (Met), Hydroxyl- (Ser, Thr, Tyr), Imidazol- (His) oder Indol-Gruppen (Trp) als Komplexligand fungieren. Bei der Betrachtung der Metallbindungsstellen von verschiedenen Metalloproteinen kann allerdings die Feststellung gemacht werden, dass bestimmte Metallionen bestimmte Liganden bevorzugen und keineswegs von allen Aminosäure-Seitenketten gebunden werden. Eine Erklärung liefert das so genannte „*Hard/Soft-Acid/Base*“-Prinzip (HSAB) nach Pearson (Pearson 1963). Hiernach gibt es zum einen eher „harte“ Säuren und Basen mit geringer Polarisierbarkeit und hoher Elektronegativität, zum anderen gibt es eher „weiche“ Säuren und Basen mit einer hohen Polarisierbarkeit und geringer Elektronegativität. Der Theorie nach binden harte Basen bevorzugt an harte Säuren, wohingegen die Bindung zwischen weichen Basen und weichen Säuren energetisch günstiger ist. Metallionen sind in diesem Modell die Säuren, die je nach Ionenradius, Polarisierbarkeit der Elektronenhülle und Ionisierungsenergie als weich oder hart betrachtet werden können. Daher wird ein relativ hartes Kation wie Ca^{2+} auch harte Liganden wie die Carboxyl-Gruppen von Glutamat und Aspartat bevorzugen, während die recht weichen Cu(I)- und Cu(II)-Ionen in erster Linie weiche Liganden wie die Seitenketten von Histidin, Methionin und Cystein über die freien Elektronenpaare an Stickstoff bzw. Schwefel binden (Williams 1990). In Tabelle 1 sind einige Metalle und ihre bevorzugte Koordinierung durch typische Liganden aufgelistet. Häufig ist die tetraedrische, quadratisch planare oder oktaedrische Struktur verzerrt und die Metallzentren sind koordinativ ungesättigt, was die zusätzliche Bindung von kleinen Liganden wie

H_2O , HCO_3^- oder HPO_4^{2-} ermöglicht. Dies wird häufig für den eigentlichen katalytischen Mechanismus oder das Herauslösen des Metalls aus dem Komplex genutzt.

Tabelle 1: Einige Metalle mit typischen Liganden und Koordinationsgeometrie

Modifiziert nach (Williams 1983a)

Metallion	Bindungs- beständigkeit	typische Zahl und Art der Liganden	typische Koordinationsgeometrie
Zn(II)	hoch	3: His, Cys, (Glu)	verzerrt tetraedrisch
Cu(I), Ag(I)	hoch	3, 4: Cys, His, Met	verzerrt tetraedrisch
Cu(II), Pd(II)	hoch	3, 4: His, Met, (Cys)	verzerrt quadratisch planar
Fe(II), Ni(II), Co(II), Mg(II)	niedrig	4-6: His, Glu, Asp	oktaedrisch (wenig verzerrt)
Fe(III)	hoch	4-6: Glu, Asp, Tyr, Cys	oktaedrisch (wenig verzerrt)

Eine in der bisherigen bioanorganischen Forschung kaum berücksichtigte Möglichkeit der Metallkoordination sind aromatische Liganden, wie die Seitenketten von Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan, die mit Metallionen über π -Elektronen in Wechselwirkung treten können. Am Beispiel des bakteriellen Proteins CusF wurde in jüngerer Vergangenheit allerdings mit Hilfe verschiedener biophysikalischer Methoden gezeigt, dass dies prinzipiell möglich ist (Loftin 2007; Xue 2008; Loftin 2009). In diesem Beispiel wird Cu(I) oder Ag(I) zusätzlich zu den klassischen Liganden Methionin und Histidin über eine Tryptophan-Seitenkette koordiniert. Inwiefern diese Art der Koordination auch bei der Metallbindung durch andere Proteine eine Rolle spielt, werden zukünftige Studien zeigen.

2.4.2 Kupferbindende Proteine und Kupferhomöostase

Ohne Zweifel ist Kupfer in fast allen Organismen eines der wichtigsten Spurenelemente und essentiell für Wachstum, Entwicklung und Funktion. Kupferionen werden aus der Nahrung im Darm aufgenommen und zunächst vor allem in die Leber transportiert. Nach Linder (Linder 1991) hat ein durchschnittlicher Erwachsener mit einem Gewicht von 70 kg einen Kupfergehalt von 6 mg im Blut (65-165 $\mu\text{g}/\text{dl}$, (Kessler 2005)), wovon der größte Teil an die Plasmaproteine Ceruloplasmin (CP) und Serumalbumin (HSA) gebunden vorliegt. Die Kupfergesamtmenge liegt im menschlichen Körper bei 70-150 mg, was es zum dritthäufigsten Spurenelement nach Eisen und Zink macht. CP wird in der Leber produziert und kann über verschiedene Domänen sechs Cu(II)-Ionen binden, die über Histidin- und Cystein-Reste koordiniert werden (Lindley 2001). Neben der allgemeinen Aufgabe als Antioxidant im Plasma transportiert CP die Kupferionen in die extrahepatischen Gewebe, wo sie in

die Zellen aufgenommen und in diverse Enzyme eingebaut werden können. Gespeichert wird Kupfer vermutlich in den Mitochondrien, um für die Biosynthese von Kupferproteinen verfügbar zu sein (Cobine 2004). Überschüssiges Kupfer wird zurück zur Leber transportiert und über die Galle ausgeschieden (Linder 1998).

Mehr als 30 Enzyme sind bekannt, in denen Kupfer als Kofaktor eine entscheidende Rolle spielt. Darunter befinden sich die Cytochrom C-Oxidase der Atmungskette, die Tyrosinase, die Dopamin- β -Hydroxylase, die Lysyl-Oxidase und nicht zuletzt die Cu/Zn-Superoxid-Dismutase 1 (SOD1) (Arredondo 2005). An den Namen der Enzyme lässt sich bereits ablesen, bei welchen Reaktionen Kupfer als Kofaktor auftritt. Aufgrund seiner besonderen Eigenschaft, ähnlich wie Eisen relativ leicht zwischen zwei Oxidationsstufen wechseln zu können ($\text{Cu}^{2+} + \text{e}^- \leftrightarrow \text{Cu}^{1+}$), ist Kupfer häufig an Redox-Reaktionen beteiligt. Was allerdings bei der „Entschärfung“ von Superoxid-Anionen O_2^- durch die SOD1 ausgenutzt wird, kann für den Organismus bei zu hoher Kupfermenge zur Gefahr durch oxidativen Stress werden (Valko 2005). Ein Ausfall der SOD1 durch Mutationen führt ebenfalls zu oxidativem Stress, da die vor allem in der Atmungskette entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies (*Reactive Oxygen Species*, ROS) nicht mehr beseitigt werden können und unspezifische, radikalische Reaktionen mit allen in der Nähe befindlichen Biomolekülen eingehen. Eine Folge hiervon ist die Degeneration von Motorneuronen im zentralen Nervensystem, die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) (Robberecht 2000; Shibata 2000). Weitere Beispiele für Krankheiten, die im Zusammenhang mit dem Kupferstoffwechsel stehen, sind die Menkes- und die Wilson-Krankheit (Wilson 1912; Menkes 1962). Aufgrund von Mutationen in den Kupfertransportern ATP7A (Menkes) oder ATP7B (Wilson) kommt es zu einer Fehlverteilung des wichtigen Spurenelements (La Fontaine 2007; Lutsenko 2007). So akkumuliert Kupfer bei der Menkes-Krankheit in Darmzellen, Herz, Bauchspeicheldrüse und Nieren, während in Hirn und Leber Kupfermangel herrscht. Bei der Wilson-Krankheit ist die Ausscheidung von überschüssigem Kupfer über die Leber bzw. Galle beeinträchtigt, so dass es überall im Körper, vor allem aber in der Leber, zu einer Akkumulation von Kupfer kommt. Die damit einhergehende Bildung von ROS führt zur Schädigung der Leber, aber auch des zentralen Nervensystems.

Was die Aufnahme von Kupfer in die Zellen angeht, ist zumindest beim Menschen noch unklar, wie und wo das extrazellulär stets in der Oxidationsstufe +2 vorliegende Kupfer reduziert wird, um durch die kupferspezifischen Transporter der Plasmamembran (Ctr) als Cu(I) in die Zelle transportiert werden zu können. Bei der Hefe wird diese Funktion durch die Reduktasen der Fre-Familie erfüllt (Georgatsou 1997), beim Menschen sind Vertreter der Steap-Familie (*Six-Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate*) für diese Funktion im Gespräch (Ohgami 2006). In der Zelle angekommen, können die Kupferionen auf verschiedenen Wegen weiter transportiert werden. Aufgrund der potenziellen Toxizität dieses Schwermetalls gibt es hier praktisch keine „freien“ Kupferionen, obwohl die Gesamtkonzentration in der Zelle im μM -Bereich liegt. Stets sind sie an Partnerproteine, die so genannten Kupferchaperone, gebunden (O'Halloran 2000). Die in Abb. 8 dargestellten

Transportwege von Cu(I) in Hefe sind analog zu denen in Mammalia. Zusätzlich zu den Kupferchaperonen machen Metallothionine (MT) Kupfer und andere Metalleionen unschädlich, indem sie diese binden. Dieses protektive System wird besonders effektiv durch die Tatsache, dass die Expression der MTs durch die in der Zelle befindliche Metallmenge reguliert wird (Bertinato 2004; Balamurugan 2006). Wie essentiell die strenge Regulation des Kupferstoffwechsels für die Zelle und den Organismus als Ganzes ist, lässt sich am hohen Grad der Konservierung im Laufe der Evolution ablesen. Tabelle 2 zeigt einen Vergleich einiger der am Kupferstoffwechsel beteiligten Orthologen zwischen Mensch (*Homo sapiens*), Taufliege (*Drosophila melanogaster*) und Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*).

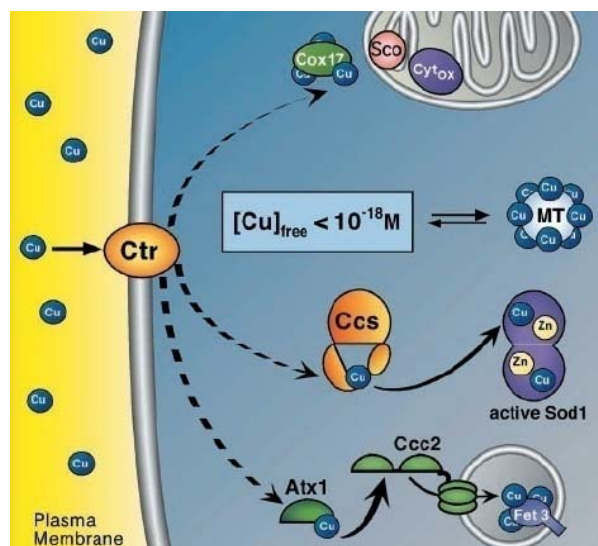


Abb. 8: Kupfertransportwege in Hefezellen

In die Zelle aufgenommen wird Kupfer aufgrund des Konzentrationsgradienten durch den passiven Kupfertransporter Ctr, wobei extrazelluläres Cu(II) zuvor zu Cu(I) reduziert werden muss. Im Zytosol wird das Kupfer von Chaperonen wie Cox17, CCS oder Atx1 aufgenommen und an verschiedene Zielorte wie die Mitochondrien, zur SOD1 oder dem ATP-getriebenen Kupfertransporter Ccc2 gebracht.

Modifiziert nach (O'Halloran 2000)

Tabelle 2: Vergleich von Orthologen aus dem Kupferstoffwechsel von Mensch, Taufliege und Hefe

Modifiziert nach (Balamurugan 2006)

Biologische Funktion im Kupferstoffwechsel	Proteine in <i>Homo sapiens</i>	Orthologe in <i>Drosophila melanogaster</i>	Orthologe in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Kupferaufnahme in die Zelle	hCtr1, hCtr2	Ctr1A, Ctr1B, Ctr1C	yCtr1, yCtr2, yCtr3
Kupferchaperone/ Kupfertransport im Zytosol	hCCS hCox17	CCS CG9065	yCCS yCox17
Aktiver Kupfertransport über Membranen/ Ausscheidung	ATP7A (Menkes), ATP7B (Wilson)	DmATP7	Ccc2
Kupferbindung/Entgiftung durch Metallothionine	Mt-I, Mt-II	Mtn A	Cup1
Metallregulierte Transkriptionsfaktoren	MTF-1	dMTF-1	Ace1, Mac1

Fast alle untersuchten Kupferchaperone und ATP-getriebenen Kupfertransporter (z.B. die Kupfer-ATPasen ATP7A (Menkes) und B (Wilson)) tragen eine oder mehrere konservierte Kupferbindungsstellen des Motivs MxCxxC (O'Halloran 2000). Selbst bei prokaryotischen kupferbindenden Proteinen findet sich dieses oder ein ähnliches Motiv (GMDCxxC) (Finney 2003). Oft sind bei dieser Art der Bindungsstellen nur drei der potenziellen vier Koordinationsstellen am Cu(I) durch Liganden besetzt. Dies liegt darin begründet, dass die Kupferchaperone zwar einerseits relativ fest an ihre Fracht binden müssen, um diese gegen umliegende Moleküle abzuschirmen, andererseits aber nicht so fest binden dürfen, als dass eine Übergabe an Zielmoleküle, wie die SOD1 oder der Transport über eine Membran, verhindert werden würde. Weitere Beispiele für Kupferbindungsstellen liefern die Ctr-Homologen, die in ihrer Ektodomäne so genannte *Mets Motifs* der Form MxM oder MxxM und histidinreiche Abschnitte zur Bindung von Kupfer aus dem extrazellulären Raum tragen (Dancis 1994; Puig 2002). Darüber hinaus befindet sich in deren zweiter Transmembransequenz jeweils ein konserviertes und für den Kupfertransport wichtiges MxxxM-Motiv.

2.4.3 Alzheimer und Kupfer

Betrachtet man die bereits erforschten Zusammenhänge zwischen der Alzheimer-Krankheit und der Kupferhomöostase, ergibt sich ein komplexes und teilweise widersprüchliches Bild (Hung 2010). Einerseits akkumulieren Kupfer und andere Metalle in den amyloiden Plaques und das A β -Peptid wirkt in Kombination mit Kupfer aufgrund beschleunigter Aggregation und der Entwicklung reaktiver Sauerstoff-Spezies neurotoxisch (Atwood 1998; Lovell 1998; Huang 1999). Andererseits zeigen sich sowohl bei Alzheimer-Patienten als auch bei transgenen „Alzheimer-Mäusen“ verringerte Kupferspiegel im Gehirn (Deibel 1996; Maynard 2002; Bayer 2003).

Eine potentielle, direkte Verbindung zwischen der Alzheimer-Krankheit und der Kupferhomöostase wurde durch die Beschreibung einer Kupferbindungsstelle in der Ektodomäne des APP aufgezeigt (Hesse 1994). Über die Bindung hinaus zeigte APP eine Redox-Aktivität, durch die gebundenes Cu(II) zu Cu(I) reduziert werden konnte (Multhaup 1996). Die identifizierte Histidin-reiche Bindungsstelle HLHWH in der Cystein-reichen Domäne des APP war konsistent mit zuvor beschriebenen Bindungsstellen für Cu(II) der Gestalt HxxxH (Arnold 1991).

Um eine mögliche Wirkung von Kupfer auf die APP-Prozessierung zu untersuchen, wurden APP-transfizierte CHO-Zellen (*Chinese Hamster Ovary*) *in vitro* mit Kupfer behandelt. Dies führte einerseits zu einer Stimulation der α -sekretorischen, anti-amyloiden APP-Prozessierung gegenüber der Spaltung durch BACE1, was anhand einer Zunahme von sAPP α und p3-Peptid gemessen wurde, und andererseits zu einer erhöhten Menge von unprozessiertem Vollängen-APP in den Zellen (Borchardt 1999). Weitere Indizien für die präventive Wirkung von Kupfer auf die Alzheimer-Pathologie lieferten Studien an Mausmodellen. Eine Linie von „Alzheimer-Mäusen“, die humanes APP751 mit Schweden-

Mutation überexprimieren und analog zum Menschen amyloide Plaques bilden und Inflammation und Neurodegeneration im Gehirn aufweisen, sind die APP23-Mäuse (Sturchler-Pierrat 1997). Bereits nach sechs Monaten werden deutliche amyloide Ablagerungen in den Gehirnen dieser Mäuse in Neocortex und Hippocampus sichtbar. Die vermutete Korrelation zwischen dem Kupferhaushalt und Alzheimer wurde erforscht, indem einem Teil der APP23-Mäuse Zuckerwasser und einem anderen Teil Zuckerwasser mit einem Kupfer(II)-Salz zu trinken gegeben wurde (Bayer 2003). Tatsächlich ließ sich im Vergleich zu den unbehandelten APP23-Tieren eine deutliche Verringerung der Zahl der amyloiden Plaques und der Menge des freigesetzten, löslichen A β 40 und 42 beobachten. Von den unbehandelten APP23-Mäusen waren nach 21 Monaten bereits 70% gestorben, während die Kupfer-behandelten Tiere weiterlebten und keinen signifikanten Unterschied in der Lebensdauer gegenüber Wildtyp-Tieren zeigten. Zur Bestätigung des Einflusses der APP-Überexpression auf den Kupferstoffwechsel wurde in der gleichen Studie die Aktivität der zytosolisch lokalisierten SOD1 gemessen. Die APP23-Mäuse hatten gegenüber den Wildtyp-Tieren eine um rund die Hälfte verringerte SOD-Aktivität, was auf einen intrazellulären Kupfermangel zurückzuführen ist. Durch die Behandlung mit Kupfer konnte die SOD-Aktivität in den Neuronen der APP23-Mäuse wieder auf das normale Niveau der WT-Mäuse angehoben werden.

Um die Ergebnisse aus dem Tiermodell auf den Menschen zu übertragen, wurde eine randomisierte, plazebokontrollierte Doppelblindstudie (klinische Phase II) durchgeführt, in deren Verlauf Patienten mit milder Alzheimer-Krankheit (frühes Stadium) über einen Zeitraum von 12 Monaten entweder Kupfer(II)-Orotat oder ein Plazebopräparat erhielten (Kessler 2008a; Kessler 2008b). Zur Beurteilung der kognitiven Leistungen wurden mit beiden Gruppen vierteljährlich die Standardtests ADAS-cog (*Alzheimer's Disease Assessment Scale, cognitive subscale*) und MMSE (*Mini Mental Status Examination*) durchgeführt (Folstein 1975; Rosen 1984; Burch 1987). Außerdem wurden, neben der Kupferkonzentrationen in Plasma und CSF (*Cerebrospinal Fluid, Liquor*) und der Ceruloplasmin-Konzentration im Plasma, die Alzheimer-Biomarker A β 42, Tau und Phospho-Tau quantifiziert. Die Studie ergab, dass sich die kognitiven Testergebnisse der kupferbehandelten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe im beobachteten Zeitraum nicht signifikant verbesserten und auch die Werte für Tau und Phospho-Tau unbeeinflusst blieben. Ein interessanter Effekt zeigte sich allerdings bei der gemessenen A β 42-Menge im CSF: Während der A β 42-Spiegel, der einen diagnostischen Marker für die Alzheimer-Krankheit darstellt (Andreasen 2003), in der Plazebogruppe im Untersuchungszeitraum um 30% sank, ging der Spiegel in der kupferbehandelten Gruppe lediglich um 10% zurück. Dies könnte, trotz mangelnden Effektes auf die kognitiven Leistungen, auf einen positiven Effekt der Kupferbehandlung hindeuten.

Zu der klinischen Patientenstudie müssen mehrere Anmerkungen gemacht werden. So war die Zahl der untersuchten Patienten relativ klein (35 kupferbehandelte Patienten gegenüber 33 Plazebokontrollen, von denen nach 12 Monaten nur 29 bzw. 28 auswertbar waren), und die Studie

war auf einen recht kurzen Behandlungszeitraum ausgelegt. Außerdem haben aus ethischen Gründen alle Patienten während der Studie weiterhin die Standardmedikation mit dem Acetylcholinesterase-Hemmer Donepezil erhalten (Rogers 1996), was einen positiven Effekt der Kupferbehandlung auf die kognitive Leistungsfähigkeit möglicherweise überdeckt hat. Unklar blieb auch, inwiefern das verabreichte Kupfer bioverfügbar war und die Blut-Hirn-Schranke passieren konnte, da die CSF-Cu-Werte der Placebo- und der Verum-Gruppe sich nicht signifikant unterschieden. Da alle Studienteilnehmer bereits an einer milden Form von Alzheimer erkrankt waren, konnte darüber hinaus ein möglicher präventiver Effekt durch eine erhöhte Kupferaufnahme nicht untersucht werden. Aus dieser Studie kann also keinesfalls abschließend gefolgert werden, dass sich die positive Wirkung von Kupfer aus dem Maus-Modell nicht auf den Menschen übertragen ließe. Hierzu sind weitere Untersuchungen notwendig.

2.4.4 Die Kupferbindungseigenschaften von BACE1

Obwohl noch keine Rolle für BACE1 in der Kupferhomöostase definiert ist, gibt es eine Reihe von Indizien, die auf eine Interaktion mit dem Kupferstoffwechsel hindeuten. So beschreiben Angeletti et al., dass der zytosolische Teil von BACE1 über Cys-Reste Cu(I) binden kann (Abb. 9) und dass eine

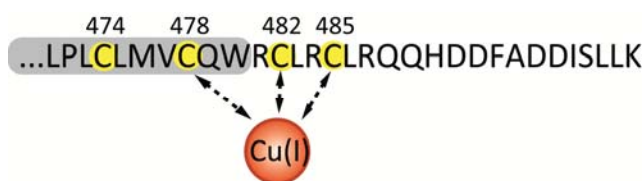


Abb. 9: Zytosolische Bindungsstelle für Cu(I)

Nach Angeletti et al. können die Cys-Reste 478, 482 und 485 im zytosolischen Teil von BACE1 Cu(I) binden (Angeletti 2005), wobei der Hauptanteil der Bindung von Cys482 erbracht wird. Gelbe Kreise markieren die Cys-Reste, die palmitoyliert vorliegen können (Vetrivel 2009); der graue Balken ist der Bereich, der sich voraussichtlich in der Membran befindet.

Interaktion mit dem Kupferchaperon der Superoxid-Dismutase CCS (*Copper Chaperone of SOD1*) stattfindet (Angeletti 2005). Dabei scheint BACE1 mit der SOD1 um den zellulären CCS-Pool zu konkurrieren, da bei BACE1-Überexpression die SOD1-Aktivität sinkt. Dies kann dadurch erklärt werden, dass weniger CCS zur Verfügung steht, um die SOD1 mit dem für die katalytische Aktivität essentiellen Kupfer zu beladen. CCS besteht aus drei Domänen (Schmidt 1999), von denen Domäne I und III Kupfer jeweils unabhängig oder gemeinsam binden können. Domäne II ist homolog zur SOD1 und bildet zur Kupferübergabe ein Heterodimer mit dem Zielprotein. Die Interaktion mit dem C-terminalen Teil von BACE1 findet über die Domäne I statt, welche das konservierte Kupferbindungsmotiv MxCxxC beinhaltet. Die Bindung scheint allerdings unabhängig vom Kupferion selbst zu sein. Wie die Cu(I)-Bindung und die potenzielle, reversible Palmitoylierung der zytosolischen Cys-Reste (siehe 2.3.2, Abb. 5) in Beziehung zueinander stehen, ist noch nicht geklärt.

Ein weiteres Indiz für die Interaktion zwischen Kupferstoffwechsel und BACE1 ist die Bindung von Cu(II) an dessen Ektodomäne. Im Rahmen meiner Diplomarbeit „Identifizierung und funktionelle Charakterisierung der Metallbindungsstellen in der Ektodomäne des β -Site APP-Cleaving Enzyme 1 (BACE1)“ konnte ich zwei Fragmente der BACE1-Ektodomäne identifizieren, die Histidin-reiche Motive enthielten und über Cu-IMAC (Cu *Immobilized Metal Affinity Chromatography*) isoliert werden konnten (Bethge 2005). Beide Motive liegen nach der von Hong et al. (Hong 2000) kristallographisch bestimmten Struktur auf der Oberfläche des Proteins und haben die Sequenz HxxxH bzw. HxH (Abb. 10).

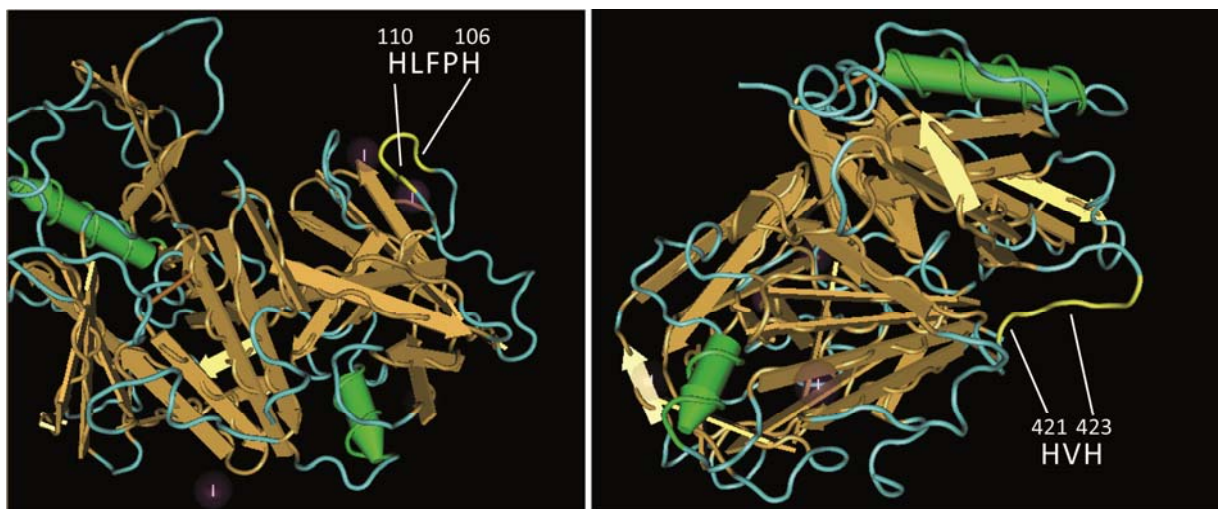


Abb. 10: Tertiärstruktur der BACE1-Ektodomäne mit kupferbindenden His-Motiven

Die Tertiärstruktur der BACE1-Ektodomäne wurde durch Röntgenstrukturanalyse des rekombinant in *E.coli* exprimierten, gereinigten und kristallisierten Proteins erhalten. Die kupferbindenden His-Motive $H_{106}xxxH_{110}$ und $H_{421}xH_{423}$ liegen an der Oberfläche der BACE1-Ektodomäne. Die Struktur weist einen hohen β -Faltblatt-Anteil (goldene Pfeile) und relativ wenige α -helikale Abschnitte (grüne Stäbe) auf.

Modifiziert nach (Hong 2000)

2.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Inhibierung der β -Sekretase BACE1 gilt als einer der vielversprechendsten Therapieansätze, um den Ausbruch der Alzheimer-Krankheit zu verhindern oder zumindest dessen Fortschreiten zu verlangsamen. Zwar ist der grundlegende Mechanismus, die amyloidogene APP-Prozessierung durch den β -Sekretase-Schnitt, bekannt, allerdings ist die Feinregulation dieser proteolytischen Spaltung noch größtenteils unverstanden.

Der Zielsetzung dieser Arbeit war es, diese Feinregulation auf Proteinebene zu untersuchen, was sowohl die Funktion der möglichen Homodimerisierung (2.3.4) als auch die Interaktion mit dem Kupferstoffwechsel (2.4.4) beinhaltete.

Zwar war zu Beginn der Arbeit bereits bekannt, dass BACE1 mit Hilfe verschiedener Methoden als Homodimer isoliert werden kann. Unbekannt war allerdings, ob diese Dimerisierung auch in lebenden Zellen stattfindet und somit auf eine Bedeutung für die Aktivität, Lokalisation, Substratbindung oder Stabilität *in vivo* hindeuten könnte. Daher sollte zunächst mit Hilfe von FLIM-FRET, einer mikroskopbasierten Methode zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen, ein Beleg für die Dimerisierung von BACE1 in lebenden Zellen erbracht werden. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob die Behandlung mit Kupfer einen Einfluss auf die Dimerisierung und Aktivität von BACE1 hat, da es sowohl in der Ektodomäne als auch im zytosolischen Teil Bindungsstellen für Kupferionen unbekannter Funktion gibt. Zieht man in Betracht, dass der Mechanismus noch unbekannt ist, der für die positive Wirkung von Kupfer auf die Alzheimer-Pathologie im Mausmodell verantwortlich ist, so könnte BACE1 ein wichtiges Bindeglied zwischen dem Kupferstoffwechsel, oxidativem Stress, dem ebenfalls kupferbindenden APP und der Alzheimer-Krankheit sein. Um eine mögliche Beteiligung von BACE1 im Kupferstoffwechsel zu testen, sollte zudem das gut etablierte Tiermodell *Drosophila melanogaster* genutzt werden, in dem transgene Fliegen mit humanem BACE1 erzeugt wurden.

Weiterhin sollte *in vitro* und im Zellkultursystem einer möglichen Funktion von BACE1 beim Abbau von A β nachgegangen werden, da die proteolytische Spaltung von A β durch BACE1 *in vitro* zwar bekannt ist, aber deren mögliche Bedeutung für die A β -Degradation *in vivo*, und somit für das Fortschreiten der Alzheimer-Pathologie, weitgehend unerforscht ist.

3 ERGEBNISSE

3.1 Metallvermittelte Kreuzvernetzung von BACE1-Dimeren und -Tetrameren

3.1.1 Kreuzvernetzung durch Kupfer(II)behandlung

Im Rahmen meiner Diplomarbeit (Bethge 2005) konnte ich zeigen, dass BACE1 Bindungsstellen für Kupfer(II) aufweist (2.4.4), welche bei der beschriebenen Homodimerisierung von BACE1 eine Rolle spielen könnten. Daher sollte durch Zugabe von Kupfer(II)chlorid ins Zellkulturmedium von mit BACE1 transfizierten HEK293T-Zellen zunächst untersucht werden, ob sich der Dimerisierungszustand von BACE1 durch die Metallionen beeinflussen läßt. Tatsächlich ließ sich in Abhängigkeit von der Cu-Konzentration ein steigender Dimer-Anteil gegenüber dem Monomer im Western Blot nachweisen (Abb. 11). Interessanterweise war dieses Dimer nicht nur SDS-stabil, wie es bei Disulfid-verbrückten Dimeren in nicht-reduzierendem Probenpuffer zu beobachten ist, sondern ebenfalls stabil nach Erhitzen in Gegenwart von Reduktionsmitteln wie β -Mercaptoethanol (β MCE) oder Dithiothreitol (DTT). Dies macht es unwahrscheinlich, dass die Verknüpfung des Dimers über eine einfache Disulfidbrücke erfolgt.

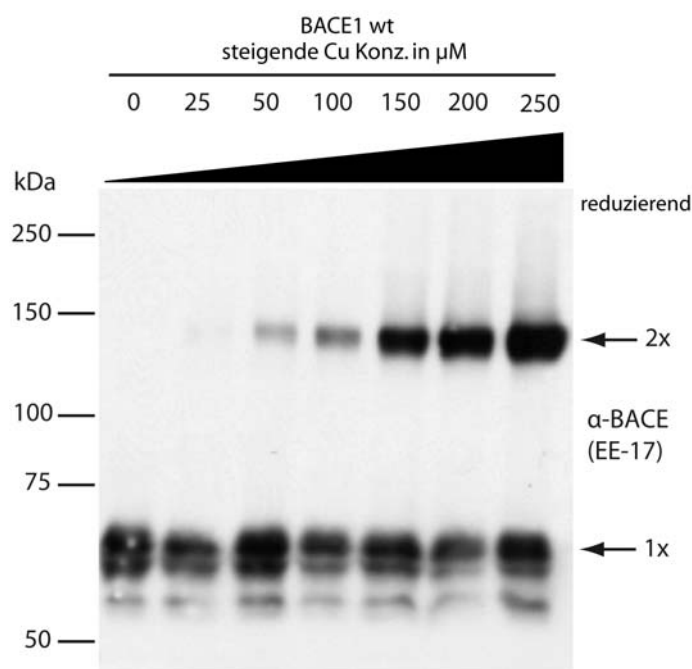


Abb. 11: Kupferabhängige Dimer-Stabilisierung von BACE1

Durch Behandlung von BACE1-transfizierten HEK293T-Zellen mit Kupfer (0 bis 250 μ M im Medium) lassen sich trotz reduzierender Bedingungen in der SDS-PAGE stabile BACE1-Dimere im Western Blot nachweisen. Die Menge der SDS- und reduktions-stabilen Dimere korreliert mit der zugesetzten Kupfermenge.

Werden die gleichen Proben mit Hilfe einer nicht-reduzierenden SDS-PAGE aufgetrennt, erhält man zusätzlich zu der bereits beschriebenen Dimer-Bande eine höhere Bande im Bereich von 250 kDa, die der molekularen Masse eines Tetramers entspricht (Abb. 12). Die Stärke der Tetramer-Bande steigt parallel zur Dimer-Bande mit zunehmender Kupferkonzentration an. Da das Auftreten der Tetramer-Bande reduktionssensitiv ist, sind für die Stabilität des Tetramers offenbar Bindungen oder Interaktionen wichtig, die durch schwefelhaltige Reduktionsmittel aufgespalten oder gestört werden.

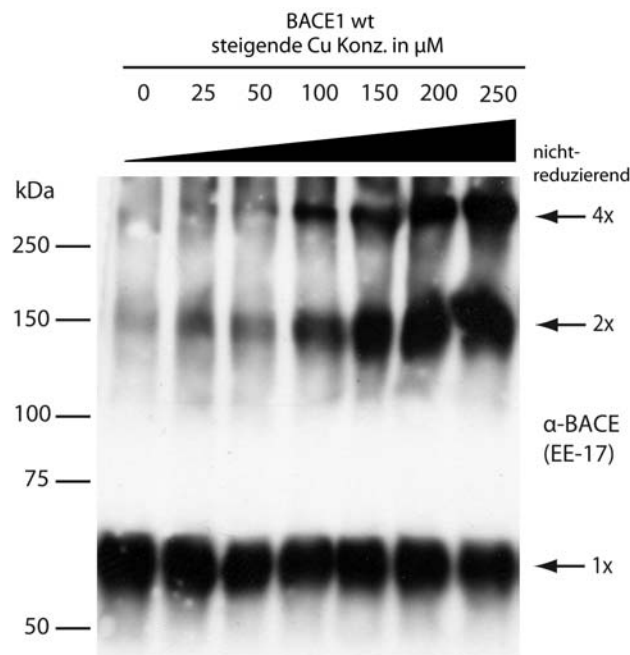


Abb. 12: Kupferabhängige Dimer- und Tetramer-Stabilisierung von BACE1 nach nicht-reduzierender SDS-PAGE

Mit steigender Kupferkonzentration von 0 bis 250 μM im Medium lassen sich durch nicht-reduzierende SDS-PAGE und Western Blot steigende Mengen SDS-stabiles BACE1-Dimer und -Tetramer nachweisen.

Die hier beschriebene Reaktion mit Kupfer(II) kann nicht nur im Zellkulturmedium durchgeführt werden, sondern funktioniert auch durch Zugabe von kupferhaltigem Puffer oder direkt während der Zellyse in kupferhaltigem Lysepuffer. Ist die Kreuzvernetzung erst einmal abgeschlossen, kann weder das Dimer noch das Tetramer durch EDTA im Lysepuffer wieder dissoziiert werden.

Anzumerken ist, dass die hier verwendeten Kupferkonzentrationen weit über dem liegen, was physiologisch vorliegt. Diese kann zwar je nach Gewebe und Zellkompartiment höchst unterschiedlich sein ($c(\text{Cu}_{\text{Serum}}) = 15 \mu\text{M}$ (Shah-Reddy 1980), $c(\text{Cu}_{\text{CSF}}) = 0,35 \mu\text{M}$ (Kodama 1988), $c(\text{Cu}_{\text{synaptischer Spalt}}) = 15 \mu\text{M}$ (Hartter 1988; Hopt 2003)), liegt jedoch rund eine Zehnerpotenz unter den hier verwendeten 50-250 μM , bei denen ein deutlicher Effekt auf die Oligomer-Stabilisierung beobachtet werden kann.

3.1.2 Inhibition durch den Kupfer(I)-Chelator BCS

Einen Hinweis auf die mögliche Beteiligung einer Redox-Reaktion lieferte die Behandlung der Zellen mit dem Kupfer(I)-Chelator Bathocuproindisulfonsäure (BCS) (Zak 1958). Bei konstanter Cu(II)-Konzentration und gleichzeitiger Zugabe von BCS ins Zellkulturmedium konnte beobachtet werden, dass die kupfervermittelte Dimerisierung sich auf diese Weise konzentrationsabhängig inhibieren lässt (Abb. 13). Dabei konnte eine nahezu vollständige Unterbindung der Dimer-Vernetzung mit einem dreifachen Überschuss an BCS (750µM BCS auf 250µM CuCl₂) erreicht werden. Dies legt den Schluss nahe, dass Cu(II) vor der eigentlichen Vernetzungsreaktion durch einen unbekanntem Mechanismus zunächst zu Cu(I) reduziert werden muss. Wird das entstandene Cu(I) allerdings, wie in diesem Ansatz, vom Cu(I)-Chelator BCS gebunden, steht es nicht mehr für die kupfervermittelte Stabilisierung von BACE1-Dimeren zur Verfügung.

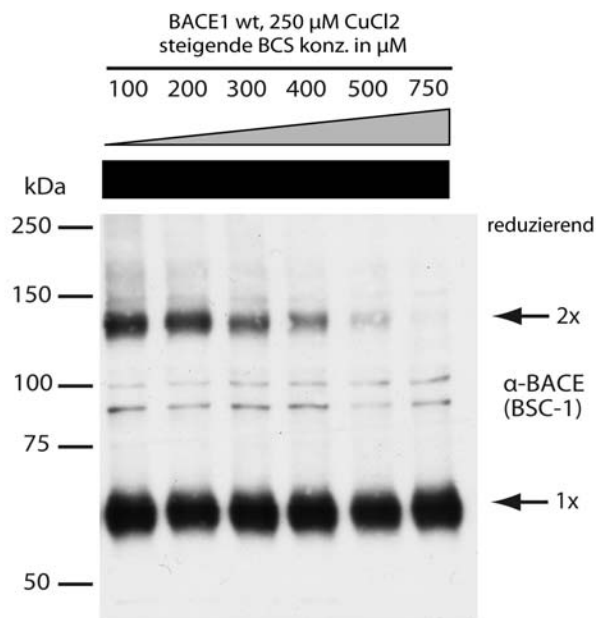


Abb. 13: Inhibition der Dimer-Stabilisierung durch Cu(I)-Chelator BCS

Die kupferabhängige Dimer-Stabilisierung kann durch steigende Konzentration des Cu(I)-Chelators Bathocuproindisulfonsäure (BCS) von 100 bis 750 µM, hier dargestellt nach reduzierender SDS-PAGE, inhibiert werden.

3.1.3 Mutation der Kupfer(II)bindungsstellen der Ektodomäne

Um die kupfervermittelte Kreuzvernetzung näher zu charakterisieren, wurden die potenziell beteiligten Aminosäurereste durch Mutationsanalyse eingegrenzt. Dabei kamen vor allem Sequenzabschnitte in Betracht, die kupferbindende Motive enthalten. Im Zuge meiner Diplomarbeit konnte ich in der BACE1-Ektodomäne das H₁₀₆XXXH₁₁₀-Motiv und das H₄₂₁XH₄₂₃-Motiv identifizieren (2.4.4), die *in vitro* Kupfer binden. Mit Hilfe der Vierfach-Mutante H106/110/421/423A konnte gezeigt werden, dass diese vermeintlichen Kupferbindestellen der Ektodomäne keine Rolle bei der kupfervermittelten Kreuzvernetzung spielen. Diese ließ sich unverändert gut durch Kupferzugabe provozieren und zeigte im reduzierenden Gel ein stabiles Dimer (Abb. 14), zu der im nicht-reduzierenden Gel noch eine Tetramer-Bande hinzukam.

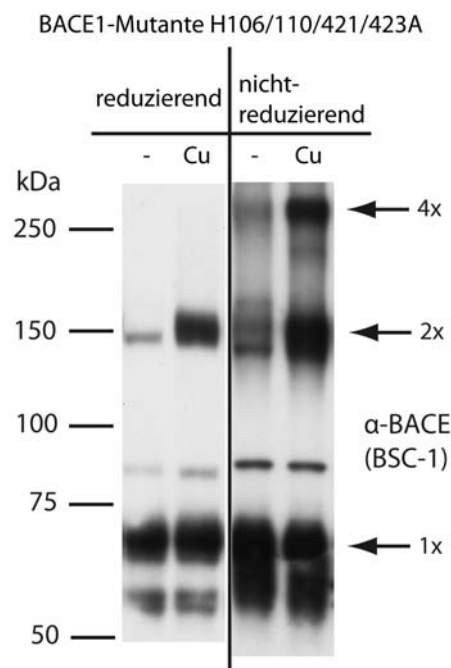


Abb. 14: Einfluss der His-Reste der Ektodomäne auf die Dimer-Stabilisierung

Die kupferabhängige Dimer- und Tetramer-Stabilisierung der BACE1-Mutante H106/110/421/423A nach Behandlung mit 100 μM CuCl₂ und reduzierender bzw. nicht-reduzierender SDS-PAGE zeigt, dass die His-Reste der Ektodomäne keinen Einfluss auf die Reaktion haben.

3.1.4 Mutation der zytosolischen Kupfer(I)bindungsstelle

Dem möglichen Zusammenhang zwischen der kupfervermittelten Kreuzvernetzung und der zytosolischen Kupfer(I)bindungsstelle (2.4.4) wurde mit Hilfe einer weiteren Mutante untersucht. Da im Zytosol reduzierendes Milieu herrscht, liegt Kupfer als Cu(I) vor, bevorzugt aber mit Cystein, Methionin und Histidin die gleichen Liganden wie Cu(II), wenn auch in einer etwas anderen Koordinationsgeometrie (siehe Tabelle 1). Der kurze zytosolische Teil von BACE1 besitzt ein cysteinereiches Segment im Grenzbereich zwischen Zytosol und Membran, in dem die Cysteine 474, 478, 482 und 485 zur Steuerung der *Lipid Raft*-Lokalisation palmitoyliert vorliegen können (Benjannet 2001; Vetrivel 2009). Das Zusammenspiel zwischen der Palmitoylierung und der von Angeletti et al. beschriebenen Cu(I)-Bindung ist noch ungeklärt, aber letzteres wird über die unpalmitoylierten Cystein-Reste 478, 485 und vor allem 482 vermittelt. Durch kupfervermittelte Kreuzvernetzung der BACE1-Mutante C478/482/485A konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Reste für die beobachtete Dimer-Stabilisierung nicht nötig waren (Abb. 15).

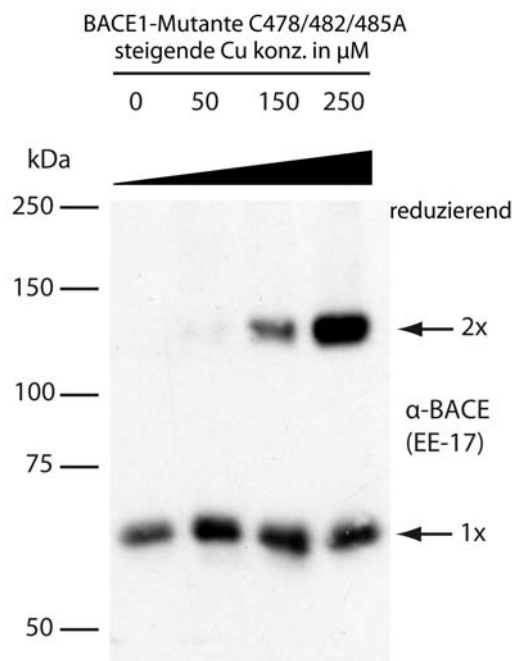


Abb. 15: Einfluss der zytosolischen Cys-Reste auf Dimer-Stabilisierung

Die kupferabhängige Dimer-Stabilisierung der BACE1-Mutante C478/482/485A nach reduzierender SDS-PAGE zeigt, dass die zytosolischen Cys-Reste keinen Einfluss auf die Reaktion haben.

3.2 Mutationsanalyse der BACE1-Transmembransequenz

3.2.1 Sequenzvergleich der BACE1-Transmembransequenz

Nachdem die Beteiligung der Kupfer(II)bindungsstellen der Ektodomäne und der zytosolischen Kupfer(I)bindungsstelle für die kupfervermittelte Dimer-Stabilisierung ausgeschlossen werden konnten, wurde das Interesse auf die Transmembransequenz (TMS) von BACE1 gerichtet. Besonders auffällig ist ein Methionin- und Cystein-reiches Motiv der Abfolge MxxxCxxxMxxxCxMxC, das sich in der Membran von Met462 bis Cys478 erstreckt. Statistisch sind lediglich 4,6% der Aminosäuren in einer TMS Met- und 1,2% Cys-Reste (Hildebrand 2004); hier ist der Gehalt mit jeweils 13% allerdings deutlich höher, so dass die schwefelhaltigen Aminosäuren zusammengenommen mehr als ein Viertel der Transmembransequenz ausmachen. Interessant ist auch der Grad der Konservierung dieses Motivs, der durch einen Sequenzvergleich verschiedener Orthologe sichtbar wird (Abb. 16). Während beispielsweise die Ähnlichkeit des humanen BACE1 und des Orthologs aus dem grünen Kugelfisch (*Tetraodon nigroviridis*) insgesamt eine Wertung von 64 bekommt (ClustalW2 Algorithmus, EMBL-EBI), erhält die Übereinstimmung der Transmembransequenzen eine Wertung von 88. Die TMS blieb also im Laufe der Evolution deutlich stärker konserviert als das Gesamtprotein, was einen klaren Hinweis auf eine wichtige Funktion darstellt. Betrachtet man die näheren Verwandten des Menschen wie Maus (*Mus musculus*), Ratte (*Rattus norvegicus*), Rind (*Bos taurus*) oder Meerschweinchen (*Cavia porcellus*), zeigt sich eine Übereinstimmung von 100% innerhalb der TMS.



Abb. 16: Sequenzvergleich (Alignment) verschiedener BACE1-Orthologe

Das ClustalW2 Alignment zeigt die Transmembransequenzen verschiedener BACE1-Orthologe im Vergleich. Die Referenznummer der UniProtKB Datenbank ist in Klammern angegeben, die Aminosäure-Nummerierung bezieht sich auf das humane BACE1. Die schwarzen Linien markieren die vermutlichen Grenzen der TMS (Berechnung erfolgte mit Mplot anhand des im Strukturmodells in Abschnitt 4.1.3) zum extrazellulären/luminalen Abschnitt und zytosolischem Teil. Offene Boxen dienen zum Hervorheben des MxxxCxxxMxxxC-Motivs. Auf das grau unterlegte AxxxAxxxA-Motiv wird in Abschnitt 4.1.3 der Diskussion eingegangen. Durch Sternchen sind Cys-Reste gekennzeichnet, die palmitoyliert vorliegen können (Vetrivel 2009).

3.2.2 Mutation ausgewählter Aminosäuren der TMS

Um die Beteiligung des transmembranären MxxxCxxxMxxxC-Motivs an der kupfervermittelten Kreuzvernetzung von Dimeren zu untersuchen, wurde eine Mutationsanalyse dieses Motivs durchgeführt. Neben den BACE1-Mutanten M462A, C466A, M470A und C474A wurde noch die Mutante Y460A einbezogen, um die potenzielle Bildung einer Dityrosin-Verknüpfung zu berücksichtigen (Atwood 2004; Smith 2007). Die mit den jeweiligen BACE1-Mutanten transient transfizierten Zellen wurden wie zuvor mit steigenden Kupferkonzentrationen behandelt, um die Kreuzvernetzung zu provozieren, und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert (Abb. 17).

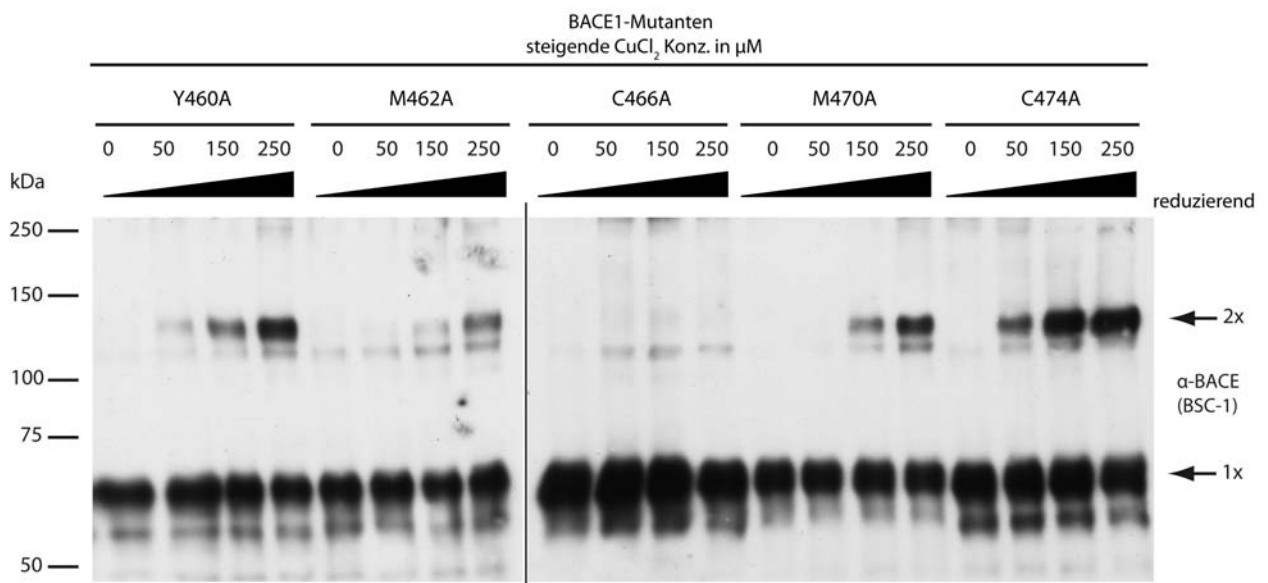


Abb. 17: Mutationsanalyse des MxxxCxxxMxxxC-Motivs

BACE1-Mutanten Y460A, M462A, C466A, M470A und C474A wurden jeweils mit 0, 50, 150 und 250 μM CuCl_2 behandelt und über reduzierende SDS-PAGE aufgetrennt. Lediglich die Mutante C466A konnte durch Kupferbehandlung nicht mehr als reifes Dimer kreuzvernetzt werden, während der andere Cys-Rest Cys474 keinen Einfluss darauf hatte.

Es zeigte sich, dass die zentrale Aminosäure für die kupfervermittelte Kreuzvernetzung das Cys466 ist. Weder das Fehlen des anderen betrachteten Cys-Restes (Cys474) noch das Fehlen von Tyr460 oder der Met-Reste Met462 und Met470 konnten die Dimer-Stabilisierung durch Kupfer verhindern. Spekulativ ist, ob die Kreuzvernetzung der Met-Mutanten möglicherweise mit einer geringeren Effizienz verlief, da die SDS- und reduktionsstabilen Dimer-Banden hier schwächer ausfielen, wobei die Expression dieser Mutanten insgesamt schwächer ausfiel, als die Expression der C466A- oder der C474A-Mutante.

3.3 BACE1-Dimerisierung in lebenden Zellen

Eine Methode, um die BACE1-Dimerisierung in lebenden Zellen nachzuweisen, ist der Förster (*Fluorescence*) *Resonance Energy Transfer* (FRET), bei dem in Abhängigkeit von der Distanz Energie strahlungslos von einem Chromophor auf einen anderen übertragen wird (siehe 5.8). Für die Messung der Homodimerisierung wurde die cDNA von BACE1 mit der cDNA für das *Cyan Fluorescent Protein* (CFP) bzw. *Yellow Fluorescent Protein* (YFP) gekoppelt, so dass sich durch Expression ein Fusionsprotein mit C-terminalem Chromophor ergab. Da das zugrunde liegende Wildtyp-GFP (*Green Fluorescent Protein*) von sich aus Homodimere bilden kann, wurde stets die A206K-Mutanten der Chromophore verwendet, was deren Neigung zur eigenen Interaktion unterbindet (Zacharias 2002). Kommen ein BACE1-CFP und ein BACE1-YFP nun in der Plasmamembran der Zelle in engen Kontakt zueinander, lässt sich durch verschiedene mikroskopbasierte Techniken der FRET beobachten. Im hier verwendeten Verfahren, welches in Kooperation mit Dr. Silvia Scolari aus der Arbeitsgruppe von Prof. Andreas Herrmann (Humboldt Universität Berlin) eingesetzt werden konnte, wird nach Anregung die Lebenszeit der CFP-Fluoreszenz gemessen (FLIM, *Fluorescence Life-Time Microscopy*). Der potenzielle FRET zeigt sich dann indirekt, indem zunächst die Lebensdauer der CFP-Fluoreszenz alleine gemessen und dann mit der CFP-Lebensdauer in Gegenwart von YFP verglichen wurde. Im letzteren Fall lässt sich eine Verkürzung der CFP-Fluoreszenz registrieren, wenn die Distanz zwischen

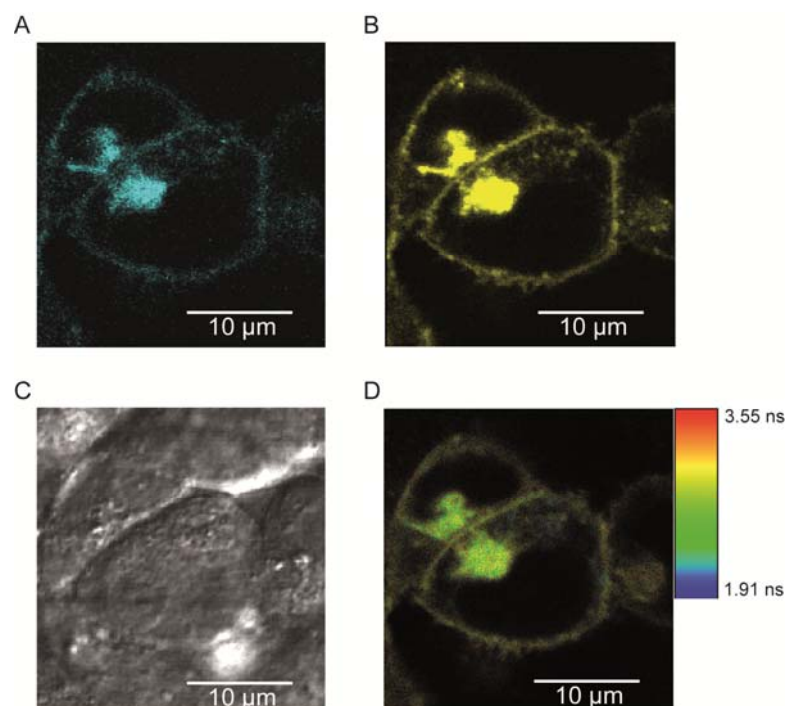


Abb. 18: BACE1-wt-CFP und -YFP transfizierte Zellen zur Messung von FLIM-FRET

Exemplarische Zellen, die mit BACE1-CFP und -YFP transfiziert und zur FLIM-FRET-Messung ausgewählt wurden. (A) CFP-Kanal, (B) YFP-Kanal, (C) Differential-Interferenzkontrast (DIC) und (D) Fluoreszenz-Lebensdauer. Die Farben stehen für die Dauer von 3,55 ns (rot) bis 1,91 ns (blau).

den beiden Chromophoren klein genug für einen FRET ist. Dabei hängt der gemessene FRET von Distanz und Orientierung der Chromophore, aber auch vom CFP/YFP-Verhältnis ab, da BACE1-CFP/BACE1-CFP-Homodimere den apparenten FRET verringern und YFP/YFP-Dimere nicht FRET-aktiv sind. Abb. 18 zeigt exemplarisch transfizierte Zellen mit BACE1-CFP und -YFP und das farbkodierte Ergebnis der FLIM-Messung. Um den Beitrag von unspezifischen Wechselwirkungen in ER/Golgi zu minimieren, wurde jeweils nur die Plasmamembran ohne das Zellinnere berücksichtigt. Für die Auswertung wurden die detektierten Photonen (*Counts*) über der Zeit aufgetragen. Daraus ergab sich die Fluoreszenzlebensdauer-Kurve, aus der über eine mathematische Annäherung (*Fitting*) für jede Zelle die mittlere Fluoreszenzlebensdauer berechnet werden konnte (Abb. 19).

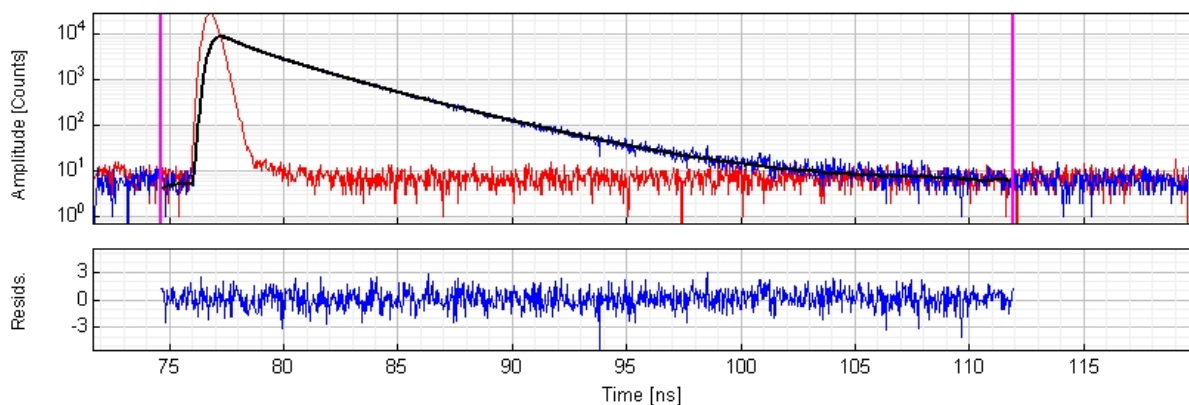


Abb. 19: Fluoreszenzlebensdauer-Kurve einer exemplarischen Zelle

Dargestellt ist die mit SymphoTime erstellte Fluoreszenzlebensdauer-Kurve. Aufgetragen sind die Photonen als *Counts* im dekadischen Logarithmus über der Zeit in ns. Rote Linie, *Instrument Response Function* (IRF); blaue Linie, Lebensdauerkurve; schwarze Linie, biexponentieller *Fit*; rosa Linien, gesetzte Grenzen für die Berechnung. Blaue Kurve (unterer Kasten), Darstellung der Qualität des *Fitting*. Große Schwankungen zeigen ein schlechtes *Fitting* mit einem schlechten χ^2 -Wert (Abweichung von 1) an.

Pro Experiment und Transfektionsansatz wurden jeweils 10-15 einzelne Zellen ausgewählt, vermessen und ausgewertet. In Abb. 20 ist das Ergebnis eines typischen Experiments dargestellt, in dem BACE1-wt-CFP alleine, BACE1-wt-CFP mit -YFP, BACE1-C466I-CFP alleine und BACE1-C466I-CFP mit -YFP untersucht wurden. Trotz der Streuung ist deutlich zu erkennen, dass CFP alleine im Durchschnitt jeweils eine Fluoreszenzlebensdauer von etwa 2,4 ns hat, während diese in Gegenwart von BACE1-YFP auf 2,2 ns sinkt. Anzumerken ist hier, dass es sich bei der durchschnittlichen Fluoreszenzlebensdauer τ_{av} um das gewichtete Mittel aus einer langen und einer kurzen

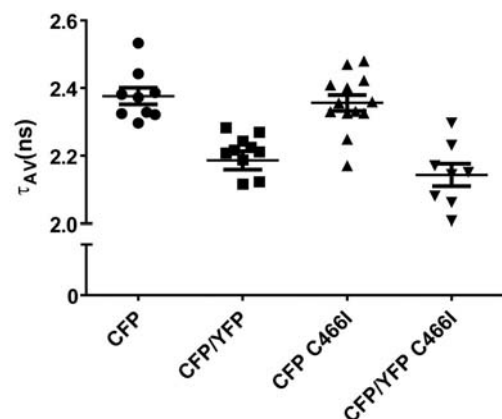


Abb. 20: Verteilung von Messwerten innerhalb eines Experiments

Jedes Symbol steht für die mittlere Fluoreszenzlebensdauer τ_{av} einer Zelle in ns. Dargestellt sind BACE1-wt-CFP alleine (CFP, Kreise), Co-Transfektion von BACE1-wt-CFP und -YFP (CFP/YFP, Quadrate), BACE1-C466I-CFP alleine (CFP C466I, Dreiecke) und BACE1-C466I-CFP und -YFP (CFP/YFP C466I, umgedrehte Dreiecke).

Fluoreszenzlebensdauer handelt, welche sich aus dem biexponentiellen *Fitting* ergeben. Die lange Lebensdauer liegt dabei im Bereich von 3-3,5 ns, die kurze im Bereich von 1-1,5 ns. Um statistische Sicherheit zu erhalten, wurde in mehreren unabhängigen Experimenten eine große Zahl von Zellen vermessen. Außerdem wurden verschiedene Kontrollen (siehe unten) eingesetzt, um die Spezifität der Homointeraktion nachzuweisen.

Das Balkendiagramm (Abb. 21) und Tabelle 3 fassen die Ergebnisse zusammen. Für BACE1-wt-CFP ergab sich eine gemittelte Fluoreszenzlebensdauer von $2,45 \pm 0,09$ ns (\pm SEM, *Standard Error of the Mean*), die in Gegenwart des Akzeptors BACE1-wt-YFP auf $2,26 \pm 0,01$ ns reduziert wurde. Durch Berechnung mit Hilfe der Formel $E = 1 - \frac{\tau_{av}(CFP+YFP)}{\tau_{av}(CFP)}$ erhält man eine FRET-Effizienz *E* von rund 8%.

Es konnte also durch den Einsatz von FLIM-FRET-Messungen demonstriert werden, dass die Homodimerisierung von BACE1 auch in lebenden Zellen stattfindet, denn FRET wird nur messbar, wenn der Abstand zwischen Donor- und Akzeptorchromophor nicht größer als 10 nm ist. Um auszuschließen, dass Donor und Akzeptor sich lediglich zufällig oder unspezifisch nahe kommen, wurden als Kontrolle Co-Transfektionen mit BACE1-wt-CFP und Hemagglutinin(HA)-AAA-YFP (eine HA-Mutante (Engel 2010)) durchgeführt. Da keine Interaktion zwischen dem Influenza-Fusions-Protein HA-AAA-YFP und BACE1 bekannt ist, sollte in diesem Ansatz kein messbarer FRET stattfinden, obwohl beide Proteine in der Plasmamembran vorliegen. Tatsächlich konnte keine signifikante

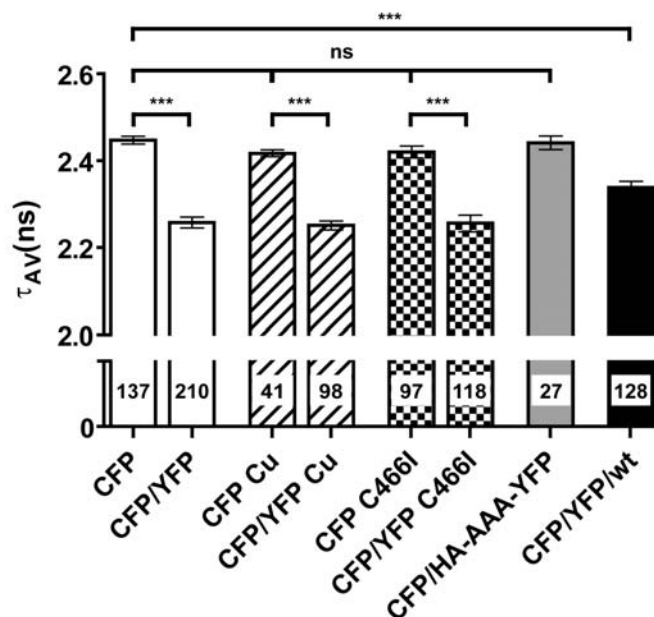


Abb. 21: Zusammenfassung der FLIM-FRET Messungen

Das gemittelte τ_{av} zu jedem Ansatz ist als Balken in ns dargestellt. Die Zahl im Balken gibt jeweils die Anzahl an ausgewerteten Zellen an. Weiße Balken, BACE1-wt-CFP mit und ohne -YFP; gestreifte Balken, BACE1-wt-CFP mit und ohne -YFP nach Cu-Behandlung; karierte Balken, BACE1-C466I-CFP mit und ohne -YFP; grauer Balken, BACE1-wt-CFP mit HA-AAA-YFP; schwarzer Balken, BACE1-wt-CFP, BACE1-wt-YFP und BACE1 wt (ohne Chromophor). ns, Unterschied nicht signifikant; ***, Unterschied nach *Student's t-Test* signifikant mit $p < 0,0001$

Verkürzung der Fluoreszenzlebensdauer des BACE1-wt-CFP gemessen werden ($\tau_{av} = 2,44 \pm 0,02$ ns). Eine weitere Kontrolle für die Spezifität der Homodimerisierung stellt die co-Transfektion von BACE1-wt-CFP, BACE1-wt-YFP und BACE1 wt (ohne Chromophor) dar. Letzteres konkurriert mit BACE1-wt-YFP um die Bindung an BACE1-wt-CFP und verringert somit die Bildung von FRET-aktiven BACE1-wt-CFP/YFP-„Heterodimeren“. Zwar findet in diesem Ansatz immer noch eine signifikante Verkürzung von τ_{av} statt, die Fluoreszenzlebensdauer fällt allerdings mit $2,34 \pm 0,01$ ns deutlich länger aus als im reinen CFP/YFP-Ansatz. Durch die Expression von BACE1 wt ohne Chromophor verringert sich die FRET-Effizienz auf rund die Hälfte (4,5%).

Tabelle 3: Zusammenfassung der FLIM-FRET Messungen

Transfektion	n Zellen	Mittelwert τ_{av} in ns	\pm SEM in ns	FRET-Effizienz E
BACE1-wt-CFP	137	2,45	0,09	
BACE1-wt-CFP / -YFP	210	2,26	0,01	7,8%
BACE1-wt-CFP (+Cu)	41	2,42	0,01	
BACE1-wt-CFP / -YFP (+Cu)	98	2,25	0,01	8,2%*
BACE1-C466I-CFP	97	2,42	0,01	
BACE1-C466I-CFP / -YFP	118	2,26	0,01	7,8%*
BACE1-wt-CFP / HA-AAA-YFP	27	2,44	0,02	
BACE1-wt-CFP / -YFP / wt	128	2,34	0,01	4,5%*

τ_{av} , gewichtetes Mittel der Fluoreszenzlebenszeit; SEM, *standard error of the mean*; *, bezogen auf BACE1-wt-CFP

Da BACE1-Dimere, wie in den Abschnitten 3.1 und 3.2 beschrieben, durch Kupferbehandlung über Cys466 kreuzvernetzt werden können, wurde des Weiteren untersucht, ob diese Kreuzvernetzung einen Einfluss auf den FRET hat. Hierzu ist es wichtig anzumerken, dass weder die Behandlung der Zellen mit Kupfer noch die Mutation C466I die grundlegende Fluoreszenzlebensdauer des Donors CFP alleine signifikant beeinflusst haben (τ_{av} für BACE1-wt-CFP (+Cu) = $2,42 \pm 0,01$ ns, τ_{av} für BACE1-C466I-CFP = $2,42 \pm 0,01$ ns). Obwohl die Behandlung der BACE1-transfizierten Zellen mit Kupfer dazu führt, dass mittels SDS-PAGE mehr Dimer nachgewiesen werden kann, resultiert aus der Kupferbehandlung der BACE1-wt-CFP/-YFP exprimierenden Zellen keine signifikante Verringerung der Fluoreszenzlebensdauer (τ_{av} für BACE1-wt-CFP/-YFP (+Cu) = $2,25 \pm 0,01$ ns) bzw. Erhöhung des FRET gegenüber den unbehandelten Zellen. Dieser Befund ist wichtig im Hinblick auf sämtliche Western Blot-Analysen des Dimers, da er den Schluss nahelegt, dass durch die kupfervermittelte Kreuzvernetzung lediglich Dimere verknüpft werden, die in der Plasmamembran natürlicherweise vorhanden sind. Es findet folglich keine künstliche Induzierung der Dimerisierung durch Kupfer statt. Die Analyse der Lysate dieser vermessenen Zellen im Western Blot ergab einen Anteil fest verknüpfter Dimere an der gesamten BACE1-Menge von etwa 20-30% (Abb. 22). Dennoch lässt sich

keine Aussage darüber treffen, wie hoch der tatsächliche Dimergehalt in der lebenden Zelle ist, da nicht bekannt ist, mit welcher Effizienz die kupfervermittelte Kreuzvernetzung abläuft.

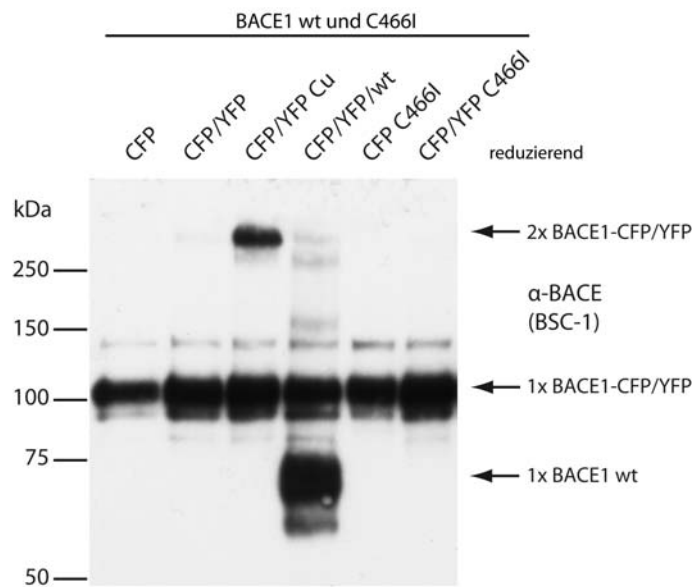


Abb. 22: Expressionskontrolle FLIM-FRET

Im Abschluss an die FLIM-FRET-Messungen wurden die transfizierten HEK293T-Zellen lysiert und per SDS-PAGE/Western Blot analysiert, um die Expressionslevel von BACE1-wt-CFP (CFP), BACE1-wt-CFP/-YFP (CFP/YFP), BACE1-wt-CFP/-YFP nach Kupferbehandlung (CFP/YFP Cu), BACE1-wt-CFP/-YFP/BACE1 wt (CFP/YFP/wt), BACE1-C466I-CFP (CFP C466I) und BACE1-C466I-CFP/-YFP (CFP/YFP C466I) zu analysieren.

Mit Hilfe der Mutante BACE1-C466I wurde untersucht, ob der Cys-Rest aus der TMS für die natürliche Dimerisierung von BACE1 essentiell ist. Da die gemessene Fluoreszenzlebensdauer bei der Co-Transfektion von BACE1-C466I-CFP und -YFP mit $\tau_{av} = 2,26 \pm 0,01$ ns identisch zu derjenigen von BACE1-wt-CFP /-YFP war, kann die Aussage getroffen werden, dass der vernetzbare Cys-Rest 466 für die natürliche Dimerisierung von BACE1 weder notwendig ist, noch diese stört. Auch eine veränderte Konformation der TMS und des zytosolischen Teils könnten eine Veränderung des gemessenen FRET nach sich ziehen, was hier nicht der Fall zu sein scheint.

3.4 Wirkung verschiedener Metalle auf die metallvermittelte Kreuzvernetzung von Cys466

Wie in Abschnitt 3.2.2 erörtert, ist für die kupfervermittelte Kreuzvernetzung von BACE1-Dimeren der Cys466-Rest innerhalb der TMS essentiell. Die Tatsache, dass die gebildete Bindung mit Reduktionsmitteln wie β MCE und DTT nicht wieder gespalten werden kann, spricht gegen die Formation einer einfachen Disulfid-Brücke. Durch den Einsatz verschiedener alternativer Metalle können Rückschlüsse auf die Art der Reaktion und der entstandenen Bindung getroffen werden. Zum Beispiel folgt daraus, falls es sich um eine koordinative Bindung handeln sollte, welche Liganden neben der Thiol-Gruppe des Cys466 noch zu vermuten sind und in welcher Koordinationsgeometrie diese vorliegen könnten. Darüber hinaus kann eine Aussage darüber getroffen werden, ob eine Redox-Reaktion zwingend beteiligt ist.

3.4.1 Wirkung von Quecksilber(II)

Die thiophilen Eigenschaften von Quecksilberionen (Hg(II)Cl_2) wurden bereits in früheren Studien genutzt, um freie Thiolgruppen zu vernetzen (Soskine 2002). Auch im Falle von BACE1 konnte Hg(II) eingesetzt werden, um Cys466 zu vernetzen und SDS-stabile Dimere mit Hilfe von Western Blot-Analyse nachzuweisen (Abb. 23). Allerdings zeigten sich durch die Behandlung mit den im Vergleich zu Kupfer deutlich größeren Quecksilber-Ionen lediglich Dimere und keine Tetramere im nicht-reduzierenden Gel. Während die kupfervermittelten Dimere stabil gegen Reduktionsmittel waren,

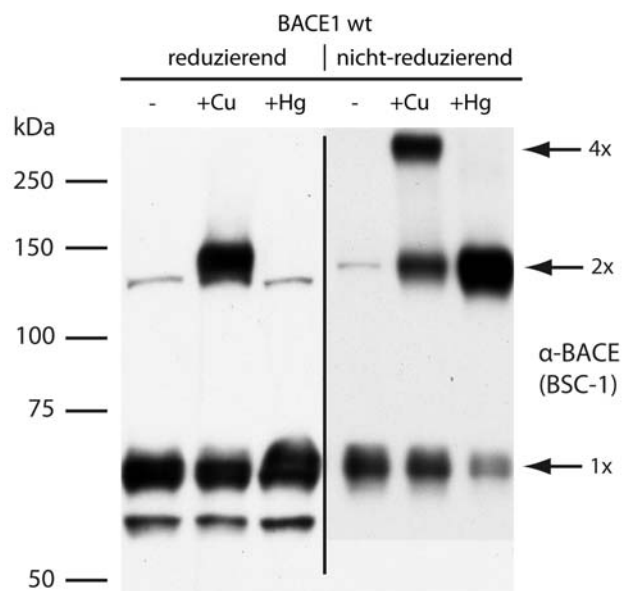


Abb. 23: Vergleich der Kreuzvernetzung durch Cu(II) und Hg(II)

Die kreuzvernetzende Wirkung von Cu(II) (100 μM) und Hg(II) (50 μM) unterscheidet sich in wesentlichen Punkten. Cu(II) führt zu reduktionsstabilen Dimeren und zu Tetrameren unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Hg(II)-Dimere sind nur in der nicht-reduzierenden SDS-PAGE sichtbar und verschwinden in Gegenwart von Reduktionsmitteln. Tetramere werden durch Hg nicht kreuzvernetzt.

ließen sich die Hg-verlinkten Dimere vollständig reduzieren. Die höchst-wahrscheinlich lineare Verknüpfung zweier Cys466-Reste durch Quecksilber (Koordinationszahl 2) zu einem BACE1-Dimer ist also offenbar eine deutlich schwächere Bindung im Vergleich zur noch unbekanntem Reaktion mit Kupfer. Die Wirkung der im Überschuss vorliegenden Reduktionsmittel β MCE oder DTT besteht hier vermutlich nicht in der Reduktion einer Bindung, sondern ist eher eine Verdrängungs- oder Konkurrenzreaktion mit dem Quecksilber, da Reduktionsmittel mit freien Thiolgruppen gleichzeitig gute Chelatoren für thiophile Metalle sind.

3.4.2 pH-Abhängigkeit der Kupfer(II)- und Quecksilber(II)-vermittelten Kreuzvernetzung

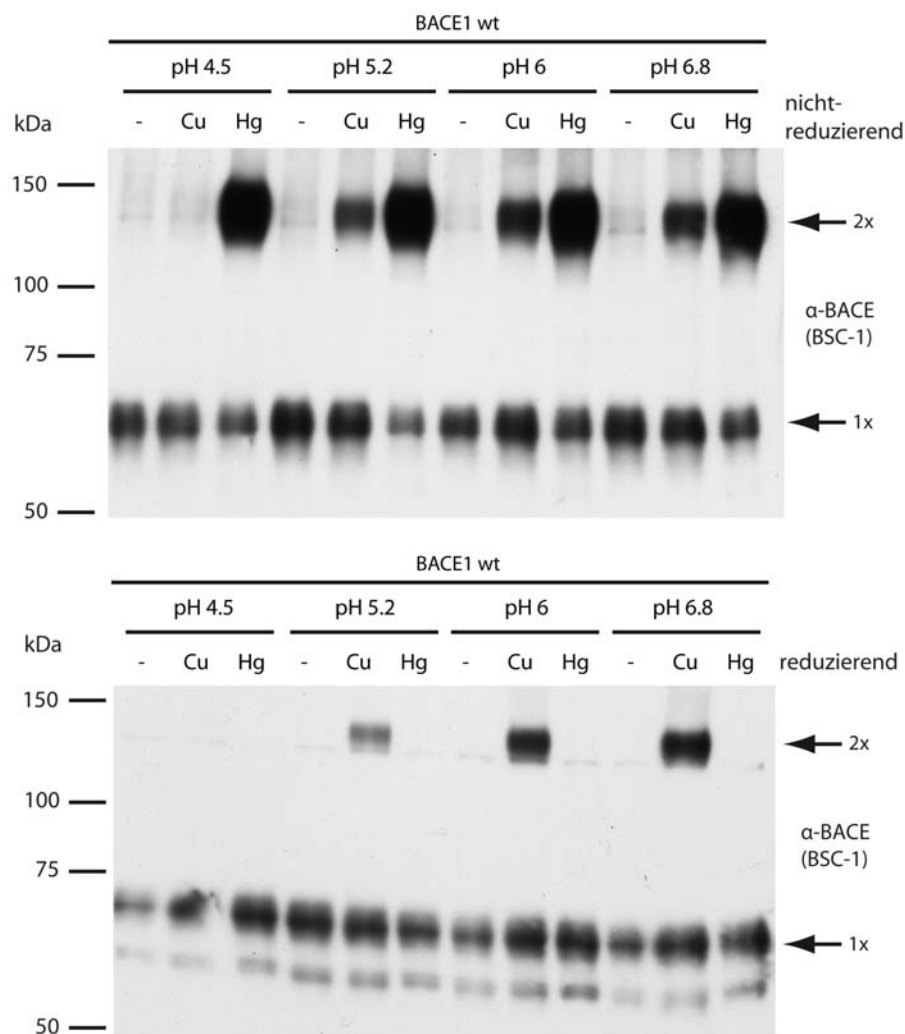


Abb. 24: pH-Abhängigkeit von Cu(II)- und Hg(II)-vermittelter Kreuzvernetzung

Die pH-Abhängigkeit der metallvermittelten Kreuzvernetzung wurde bei pH 6.8, pH 6, pH 5.2 und pH 4.5 getestet, indem 100 μ M CuCl_2 bzw. 50 μ M HgCl_2 in entsprechendem Puffer (Bis-Tris für pH 6.8 und pH 6, NaAcetat für pH 5.2 und pH 4.5) vorgemischt und dann auf die Zellen gegeben wurden. Während die Hg-vermittelte Kreuzvernetzung pH-unabhängig war, nahm die Cu-vermittelte Dimerstabilisierung mit sinkendem pH ab.

Ein weiteres Indiz dafür, dass die Kreuzvernetzungen von BACE1-Dimeren durch Cu(II) und durch Hg(II) von chemisch unterschiedlicher Natur sind, liefert der Vergleich der pH-Abhängigkeit der jeweiligen Reaktion (Abb. 24). Während die Verbrückung durch Hg(II) weitgehend pH-unabhängig ist, funktioniert die kupfervermittelte Kreuzvernetzung mit sinkendem pH-Wert schlechter und ist bei pH 4,5 kaum noch sichtbar. Dies spricht für die Beteiligung weiterer Liganden, die durch Protonierung in ihrer Bindungsfähigkeit behindert werden. Kandidaten hierfür sind die Stickstoffe des Peptidrückgrats oder der Schwefel einer Methionin-Seitenkette. Die Beteiligung von His-Resten ist in diesem Fall unwahrscheinlich, da sich keine in der Membran oder direkten Nachbarschaft befinden.

3.4.3 Wirkung von Nebengruppenmetallen mittlerer Härte

Nach der HSAB-Theorie (siehe 2.4.1) lassen sich Metalle und Liganden grob in „hart“, „mittelhart“ und „weich“ einteilen, wobei sich das Adjektiv auf die Polarisierbarkeit der Elektronenhülle bezieht (Pearson 1963). Die im Folgenden bezüglich ihrer Wirkung auf die Dimerstabilisierung untersuchten Nebengruppenmetalle weisen ähnlich wie Cu(II) eine mittlere Härte auf, während Cu(I) und das zuvor untersuchte Hg(II) zu den weichen „Säuren“ zu zählen sind.

3.4.3.1 Zink(II)

Zink(II) wird nach der HSAB-Theorie, ähnlich wie Kupfer(II), in den Bereich mittlerer Härte eingeordnet, bevorzugt also mit His, Met und Cys ähnliche Aminosäure-Liganden für die Koordination und hat einen sehr ähnlichen Ionenradius (Cu(II)=73 pm, Zn(II)=74 pm; (Shannon 1976)). Zn(II) nimmt allerdings wegen der hohen Stabilität der Oxidationsstufe(II) nicht an Redox-Reaktionen teil und bevorzugt im Gegensatz zur quadratisch-planaren Koordination von Cu(II) eine tetraedrisch-verzerrte Geometrie (Williams 1983b). Durch Behandlung von BACE1-exprimierenden Zellen konnte gezeigt werden, dass Zn(II) anders als Cu(II) die metallvermittelte Kreuzvernetzung von BACE1-Dimeren nicht

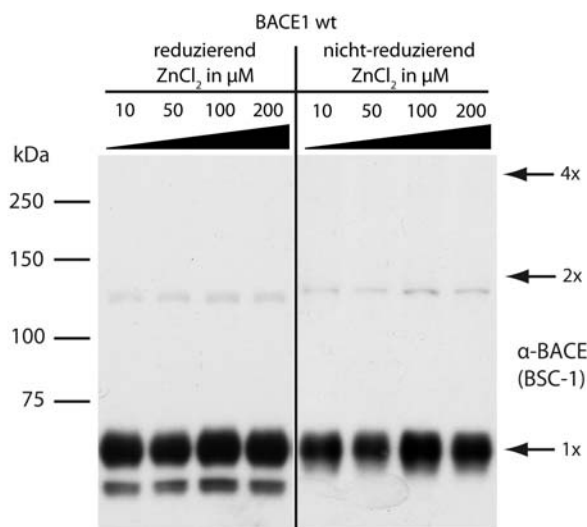


Abb. 25: Behandlung von BACE1 wt mit Zn(II)

Nach Behandlung mit 10, 50, 100 und 200 µM Zn(II) ließen sich weder durch reduzierende noch durch nicht-reduzierende SDS-PAGE stabile Dimere oder Tetramere nachweisen.

provozieren kann (Abb. 25). Dies könnte an der unpassenden Koordinationsgeometrie oder an der Unfähigkeit zur Beteiligung an einer Redox-Reaktion liegen.

3.4.3.2 Nickel(II)

Ähnlich wie Zn(II) ist auch Ni(II) mittelhart und sehr stabil in seinem Oxidationszustand. Ein bevorzugter Ligand von Ni(II) ist ebenfalls Histidin über freie Stickstoff-Elektronenpaare am Imidazol-Ring. Nickelkomplexe zeichnen sich zwar durch eine Vielfalt an Koordinationsmöglichkeiten aus, die miteinander im Gleichgewicht existieren können, energetisch bevorzugt ist jedoch aufgrund der $3d^8$ -Elektronenkonfiguration von Ni(II) die quadratisch-planare (vier Liganden) Koordination. Aber auch Ni(II) zeigte bei dem Versuch der metallvermittelten Kreuzvernetzung nicht den durch Cu(II) erzielten Effekt (Abb. 26).

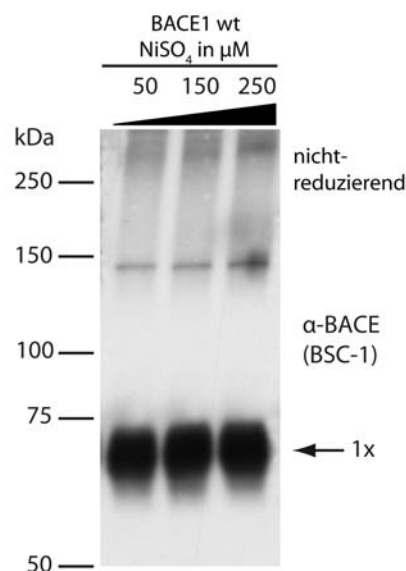


Abb. 26: Behandlung von BACE1 wt mit Ni(II)

Nach Behandlung mit 50, 150 oder 250 μM NiSO_4 ließ sich durch nicht-reduzierende SDS-PAGE kein stabiles Dimer nachweisen.

3.4.3.3 Kobalt(II) und Mangan(II)

Weitere getestete Metalle mit ähnlichen Eigenschaften wie Zn(II) und Ni(II), aber mit kleinerem bzw. größerem Ionenradius als Cu(II), waren Co(II) und Mn(II) (Co(II) = 65 pm, Mn(II) = 83 pm). Dabei bevorzugen Co(II) und Mn(II), ähnlich wie Cu(II), oktaedrische (sechs Liganden) bzw. quadratisch-planare (vier Liganden) Koordination. Genau wie nach der Behandlung der BACE1-transfizierten Zellen mit Zn(II) und Ni(II) ließ sich auch hier keine metallvermittelte Kreuzvernetzung von Dimeren durch reduzierende oder nicht-reduzierende SDS-PAGE nachweisen (Daten nicht gezeigt).

3.4.4 Wirkung von Palladium(II)

Anders als die zuvor beschriebenen Metalle Zink, Nickel, Cobalt und Mangan besitzt Palladium aus der Platin-Gruppe des Periodensystems eine weiche, leicht polarisierbare Elektronenhülle. Somit hat Pd(II) eine gesteigerte Affinität zu schweren Halogeniden (I^- , Br^-), aber auch zu den in Proteinen bedeutsamen schwefelhaltigen Liganden Cys und Met. Analog zu Cu(II) ist die bevorzugte Koordinationsgeometrie von Pd(II) quadratisch-planar. Pd(II) könnte also als ein ähnlich starker thiophiler Kreuzvernetzer wie Hg(II) (3.4.1) fungieren, während gleichzeitig die Koordinationsgeometrie von Cu(II) simuliert wird. Tatsächlich ließ sich in Abhängigkeit von der Pd(II)-Konzentration mittels nicht-reduzierender SDS-PAGE eine Zunahme an SDS-stabilem Dimer nachweisen (Abb. 27). Im Unterschied zur Reaktion mit Kupfer ergab sich allerdings nur eine sehr schwache, wenn auch konzentrationsabhängige Tetramer-Bande, und das palladiumvernetzte Dimer war nicht resistent gegen reduzierenden Probenpuffer. Es kann also konstatiert werden, dass die palladiumvermittelte Kreuzvernetzung derjenigen mit Cu(II) ähnlicher ist als die lineare Verknüpfung durch Hg(II), es aber dennoch chemische Unterschiede in der Bindung geben muss.

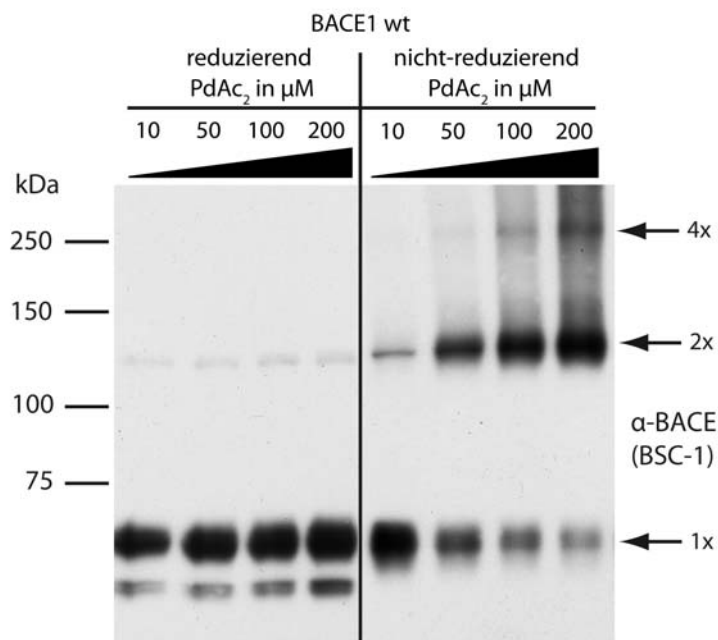


Abb. 27: Palladium(II)vermittelte Kreuzvernetzung von BACE1 wt

Mit steigender Pd(II)-Konzentration von 10, 50, 100 und 200 μM PdAc₂ läßt sich im nicht-reduzierenden Gel zunehmend mehr Dimer, aber nur wenig Tetramer nachweisen. Die gebildete Bindung ist nicht stabil gegen Reduktionsmittel; nach reduzierender SDS-PAGE migriert BACE1 vollständig als Monomer.

3.4.5 Wirkung von Silber(I)

Da Cu(I) in wässriger Lösung bzw. im Kontakt mit Sauerstoff relativ instabil ist und zu Cu(II) oxidiert, wird bei Bindungsstudien mit vermeintlichen Cu(I)-Bindungsstellen häufig Ag(I) eingesetzt (Kittleson 2006; Xue 2008). Das Silberion besitzt mit seiner weichen Elektronenhülle ähnliche Bindungseigenschaften und ist redoxstabiler. Einschränkend muss allerdings angemerkt werden, dass Ag(I)-Ionen Komplexe mit den Koordinationszahlen 2 (linear), 3 (trigonal-planar), 4 (tetraedrisch) oder 6 (oktaedrisch) bilden können. Darüber hinaus können die Elemente der 11. Gruppe des Periodensystems (im alten IUPAC-System als I B bezeichnet) in der Oxidationsstufe +1, zu denen Cu(I), Ag(I) und Au(I) zählen, aufgrund ihrer d^{10} -Elektronenkonfiguration sogenannte *Closed-Shell Complexes* bilden, die neben der oben erwähnten Vielzahl an Koordinationsgeometrien zusätzlich homoatomische Metall-Metall-Wechselwirkungen zulassen (Jansen 1987). Aus den genannten Gründen kann die Wirkung von Ag(I) als Kreuzvernetzer von BACE1-Oligomeren also nur mit Einschränkungen eine Aussage über die ablaufende Reaktion liefern. Nichtsdestotrotz ließ sich nach Behandlung mit steigender Silberkonzentration ein interessanter Effekt beobachten. Analog zur Behandlung mit Cu(II) konnten durch nicht-reduzierende SDS-PAGE sowohl SDS-stabile Dimere als auch deutliche Tetramer-Banden sichtbar gemacht werden (Abb. 28). Vergleicht man die Spur mit 100 μM Ag(I) mit derjenigen von 200 μM Ag(I) unter nicht-reduzierenden Bedingungen, zeigt sich eine leichte Abnahme des Dimers zu Gunsten der stärker werdenden Tetramer-Bande. Genau wie nach der Hg(II)- und Pd(II)-Behandlung waren die silbervernetzten BACE1-Oligomere allerdings nicht reduktionsstabil. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen ergibt sich mit Ag(I) aber ein sehr ähnliches Bild im Western Blot wie nach Kupferbehandlung.

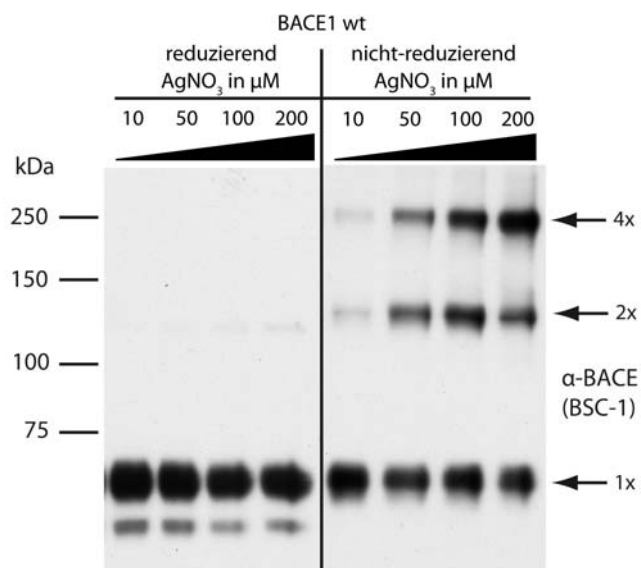


Abb. 28: Silber(I)-vermittelte Kreuzvernetzung von BACE1 wt

Mit steigender Ag(I)-Konzentration von 10, 50, 100 und 200 μM AgNO₃ läßt sich im nicht-reduzierenden Gel zunehmend mehr Dimer und Tetramer nachweisen. Die gebildete Bindung ist nicht stabil gegen Reduktionsmittel, im reduzierenden SDS-PAGE migriert BACE1 vollständig als Monomer.

3.4.6 Kreuzvernetzung durch Pd(II) und Ag(I) ist abhängig von Cys466

Mit Hilfe der BACE1-Mutante C466A konnte gezeigt werden, dass die durch nicht-reduzierende SDS-PAGE beobachtbare Kreuzvernetzung durch Pd(II) und Ag(I) des BACE1-Dimers und -Tetramers an der gleichen Stelle in der TMS wie die zuvor kupfervermittelte Kreuzvernetzung geschieht. Im Gegensatz zu BACE1 wt konnten bei BACE1-C466A weder nach Behandlung mit Pd(II) noch mit Ag(I) SDS-stabile Oligomere in nennenswertem Umfang beobachtet werden (Abb. 29).

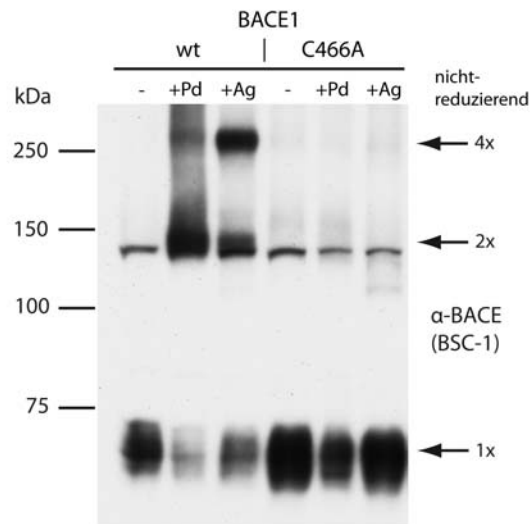


Abb. 29: Pd(II)- und Ag(I)-vermittelte Kreuzvernetzung funktioniert über Cys466

Es wurden jeweils 100 μM Pd(II)Ac₂ bzw. Ag(I)NO₃ eingesetzt, um BACE1 wt bzw. C466A transfizierte Zellen der metallvermittelten Kreuzvernetzung zu unterziehen. Durch nicht-reduzierende SDS-PAGE zeigte sich, dass die Reaktion von Cys466 abhängig ist.

3.4.7 Wirkung von Kupfer und Ascorbinsäure

Um die Kreuzvernetzung von BACE1-Oligomeren durch Behandlung mit Cu(I) zu untersuchen, wurde die Cu(II)-Lösung mit einem doppelten Überschuss des Reduktionsmittels Ascorbinsäure vorinkubiert. Wenn man davon ausgeht, dass der Großteil des Kupfers in diesem Ansatz in reduzierter Form als Cu(I) vorlag, lässt sich die Aussage treffen, dass die kupfervermittelte Kreuzvernetzung mit Cu(I) mindestens genauso gut oder besser wie diejenige durch Cu(II) funktioniert (Abb. 30). Die Reduktion von Cu(II) zu Cu(I) scheint also kein notwendiger Teil der Kreuzvernetzung zu sein, was sich schon durch den Einsatz von Ag(I) angedeutet hatte (siehe 3.4.5). Auch nach Behandlung mit Cu(I) ließen sich unter nicht-reduzierenden Bedingungen bei der SDS-PAGE deutliche Banden für Dimer und Tetramer nachweisen. Im Unterschied zur Wirkung von Ag(I) waren die Dimere allerdings genau wie nach Cu(II)-Behandlung reduktionsstabil in der SDS-PAGE.

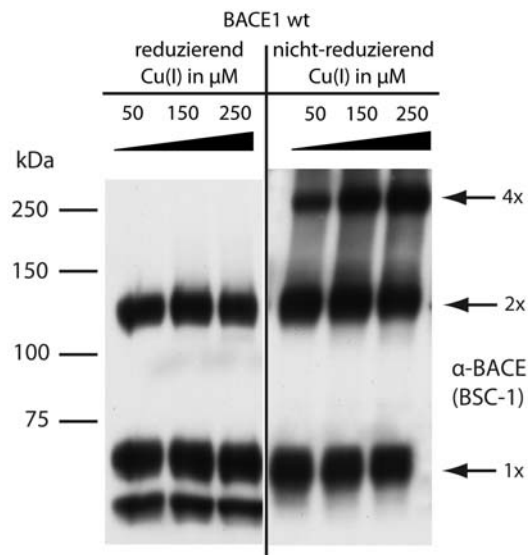


Abb. 30: Cu(I)-vermittelte Kreuzvernetzung

Durch Einsatz eines Ascorbinsäure Überschusses wurde Cu(II) zu Cu(I) reduziert, stabil gehalten und für die Kreuzvernetzungereaktion auf BACE1-transfizierte Zellen in Konzentrationen von 50, 150, 250 μM gegeben. Dabei ergeben sich ähnlich wie durch Cu(II)-Behandlung SDS-stabile Dimere und Tetramere und SDS- und reduktionsstabile Dimere.

3.4.8 Wirkung des Oxidationsmittels KMnO_4

Kaliumpermanganat (KMnO_4) ist ein starkes Oxidationsmittel (Standardpotential $E^0 = +1,51 \text{ V}$), da das Mangan in der Oxidationsstufe +7 vorliegt und eine starke Bestrebung hat, Elektronen aufzunehmen. Cu(I) kann durch KMnO_4 leicht zu Cu(II) oxidiert werden. Folglich sollte die Anwesenheit von KMnO_4 im Puffer in diesem Versuch verhindern, dass das hinzugefügte Cu(II) zu Cu(I) reduziert wird. Es zeigte sich, dass, obwohl mit dem Cu(II)-Analogon Pd(II) Dimere vernetzen werden können (3.4.4), die Anwesenheit von KMnO_4 in steigender Konzentration die kupfervermittelte Kreuzvernetzung von BACE1-Dimeren und -Tetrameren vollständig inhibierte (Abb. 31). In Anbetracht der Wirkung von Ag(I) (3.4.5) und von Ascorbinsäure (3.4.7) scheint dies ein weiteres Indiz dafür zu sein, dass vor allem Cu(I) - nach Reduktion von Cu(II) zu Cu(I) - eine wichtige Rolle bei der beobachteten Kreuzvernetzung spielt.

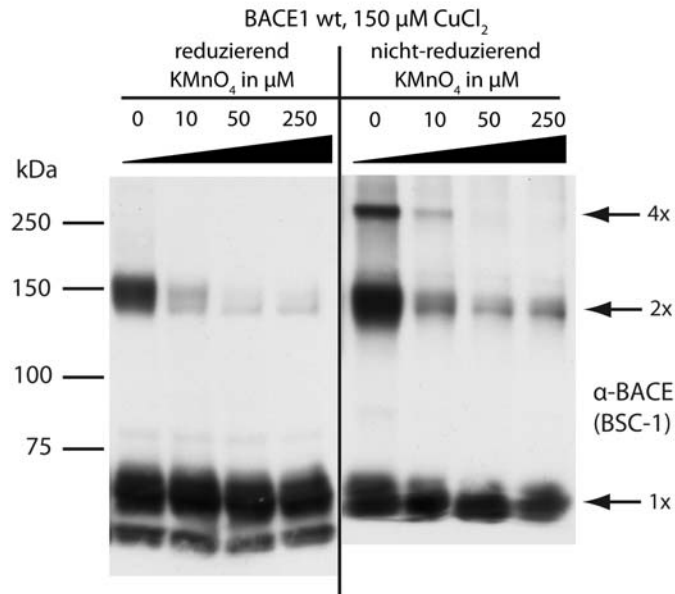


Abb. 31: Inhibition der Cu(II)-vermittelte Kreuzvernetzung durch das Oxidationsmittel KMnO_4

Sowohl die kupfervermittelte Bildung des SDS- und reduktionsstabilen Dimers ($150 \mu\text{M}$ CuCl_2 ; reduzierende SDS-PAGE) als auch die Kreuzvernetzung des Tetramers ($150 \mu\text{M}$ CuCl_2 ; nicht-reduzierende SDS-PAGE) lassen sich durch Anwesenheit einer steigenden Konzentration KMnO_4 (0–250 μM) inhibieren.

3.5 Mutationsanalyse der BACE1-TMS bezüglich Interaktion

3.5.1 Analyse der BACE1-TMS-Interaktion durch Cystein-Austausch (*Cys-Scan*)

Da sich, wie in den Abschnitten 3.2.2 und 3.4.1 gezeigt, BACE1-Dimere über den TMS-Rest Cys466 durch Kupfer- oder Quecksilberbehandlung kreuzvernetzen lassen, liegt der Schluss nahe, dass die TMS-Helices zweier BACE1-Monomere sich in diesem Bereich besonders nahe kommen oder sogar interagieren. Um zu untersuchen, ob sich die kupfer- und quecksilbervermittelte Vernetzungsreaktion noch in anderen Positionen als der natürlichen durchführen lässt, wurden sämtliche Aminosäuren von Met462 bis Met470 einzeln gegen Cys-Reste ausgetauscht, während das natürliche Cys466 zu Ala mutiert wurde (*C466A Background*). Dieser sogenannte *Cys-Scan* ist in ähnlicher Form eine etablierte Methode bei Kanälen oder anderen Transmembranproteinen, um einerseits die Wasser-Zugänglichkeit von Aminosäure-Resten zu untersuchen, und andererseits Helix-Helix-Interaktionen zu kartographieren (Kanaya 1990; Akabas 1992). In diesem Fall wurden also diejenigen Aminosäuren untersucht, die bis zu einer Helix-Windung vor bzw. hinter Cys466 liegen, was einen Aufschluss darüber liefern sollte, welche Aminosäuren die Interaktion vermitteln. Es handelt sich dabei um das metallbindungsstellenähnliche $\text{M}_{462}\text{xxxC}_{466}\text{xxxM}_{470}$ -Motiv.

Durch Western Blot-Analyse offenbarte sich, dass sowohl die kupfer- als auch die quecksilbervermittelte Kreuzvernetzung eines Cys-Restes mit der Ausnahme der Mutante F469C/C466A in allen untersuchten Positionen funktioniert (Abb. 32), da SDS-stabile, vernetzte BACE1-Dimere sichtbar wurden. Dies ist insofern überraschend, da bei der spezifischen Interaktion von zwei TM-Helices eine bestimmte Nahtstelle (*Interface*) zu erwarten gewesen wäre. Da eine Helixwindung im Durchschnitt aus 3,6 Aminosäureresten (AS) besteht, liegt bei einer Helix ein Teil der AS auf der dem vermeintlichen *Interface* abgewandten Seite und nimmt nicht an der Interaktion teil. Da das natürliche Cys466 verlinkt werden kann, waren Mutanten M462C/C466A und M470C/C466A gute Kandidaten für die gleiche Reaktion, da diese Reste wie oben erwähnt eine Helix-Windung vor bzw. hinter Cys466 liegen. Sie sollten somit auf der gleichen Seite der Helix liegen (siehe auch Modell 4.1.3). Im Gegensatz dazu liegen die Reste Ala464 und Leu468 genau zwischen Met462 und Cys466 bzw. Cys466 und Met470 und sollten folglich auf der entgegengesetzten Seite der TM-Helix liegen. Dennoch konnten die Mutanten A464C/C466A und L468C/C466A durch Kupfer oder

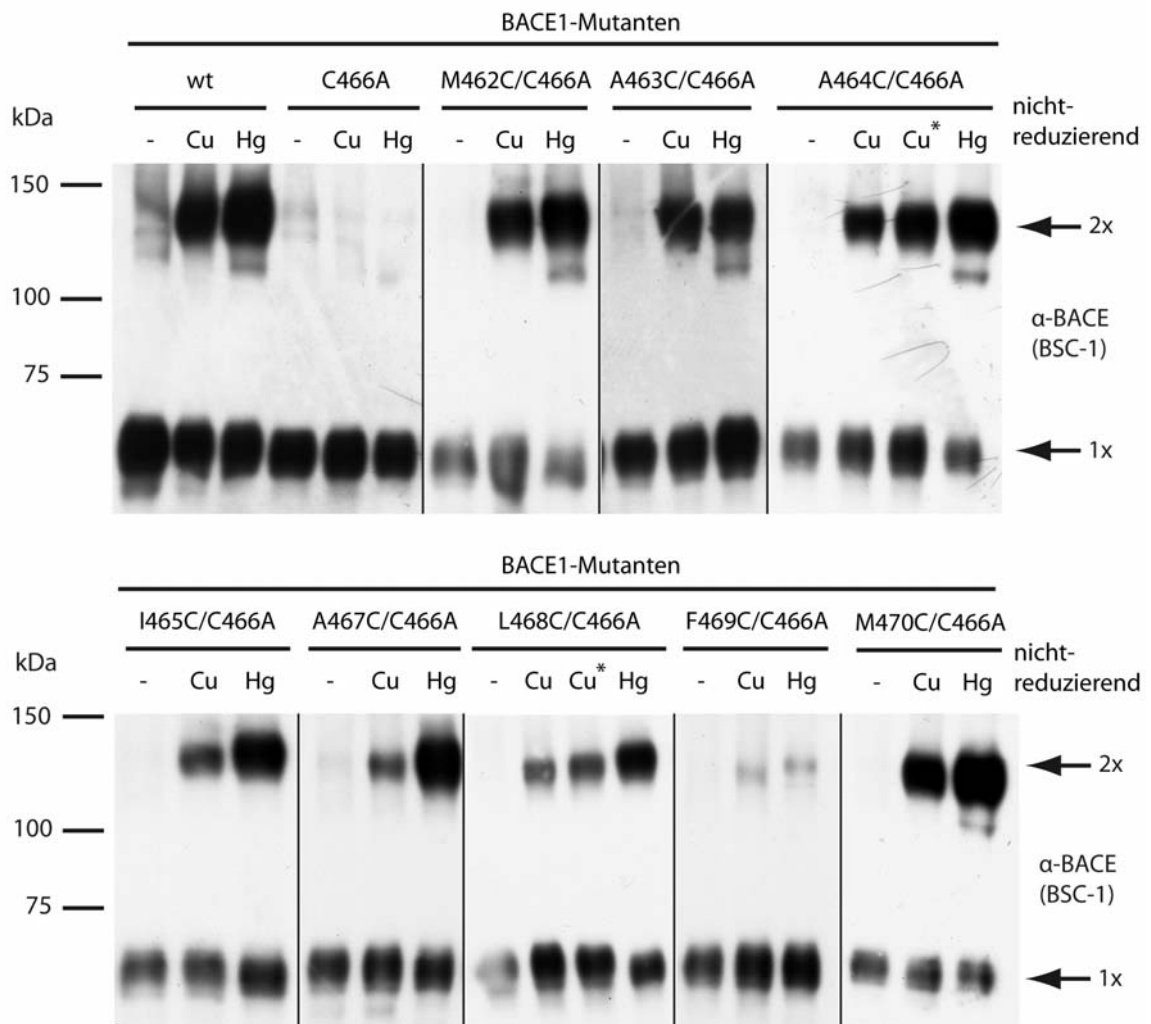


Abb. 32: Cystein Austausch-Analyse der BACE1-TMS von Met462 bis Met470

Mit Hilfe nicht-reduzierender SDS-PAGE und Western Blot wurden BACE1 wt, BACE1-C466A und BACE1-M462C/C466A bis M470C/C466A bezüglich der Vernetzbarkeit mit 100 μM CuCl₂ (Cu) oder 50 μM HgCl₂ (Hg) analysiert. Die mit * markierten Proben wurden mit 300 μM CuCl₂ inkubiert.

Quecksilber zu Dimeren verknüpft werden. Hierfür lassen sich zwei mögliche Erklärungen formulieren. Zum einen könnte es sein, dass die Interaktion der Helices unspezifisch stattfindet bzw. eine hohe Flexibilität aufweist, so dass keine definierte Interaktionsfläche vorhanden ist. Zum anderen wäre es möglich, dass die Erklärung in den Tetrameren liegt, die in nicht-reduzierenden Gelen vor allem nach kupfer- oder silbervermittelter Kreuzvernetzung gefunden werden konnten (3.1.1 und 3.4.5). Möglicherweise gibt es also nicht nur ein, sondern zwei Interaktionsflächen in der TMS, die wechselwirken können und die Tetramer-Bildung ermöglichen. Dann wäre das Dimer, welches sich bei der Kreuzvernetzung des Wildtyps zeigt, nicht das gleiche Dimer, das beispielsweise bei der A464C/C466A-Mutante sichtbar wird. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden Mutanten hergestellt, die neben dem natürlichen Cys466 noch zusätzliche Cys-Reste in den bereits untersuchten Positionen Ala464 und Leu468 tragen (siehe nächster Abschnitt).

3.5.2 Insertion zusätzlicher Cystein-Reste

Um die Hypothese von mehr als einer Interaktionsfläche und einer möglichen Oligomerisierung der TMS über den Dimer-Status hinaus zu untersuchen, wurden die BACE1-Mutanten A464C und L468C hergestellt. Im Western Blot zeigte sich nach reduzierender SDS-PAGE, dass die zusätzlichen Cys-Reste es offenbar ermöglichten, zusätzlich zu dem Dimer noch kupfervermittelte Trimere und Tetramere zu vernetzen, wobei die Trimere als ein kreuzvernetztes Monomer mit einem Dimer interpretiert werden können und die Tetramere als zwei verknüpfte Dimere (Abb. 33). Wie beim Dimer ist die Verknüpfung, die durch Kupfer provoziert wird, stabil gegen Reduktionsmittel.

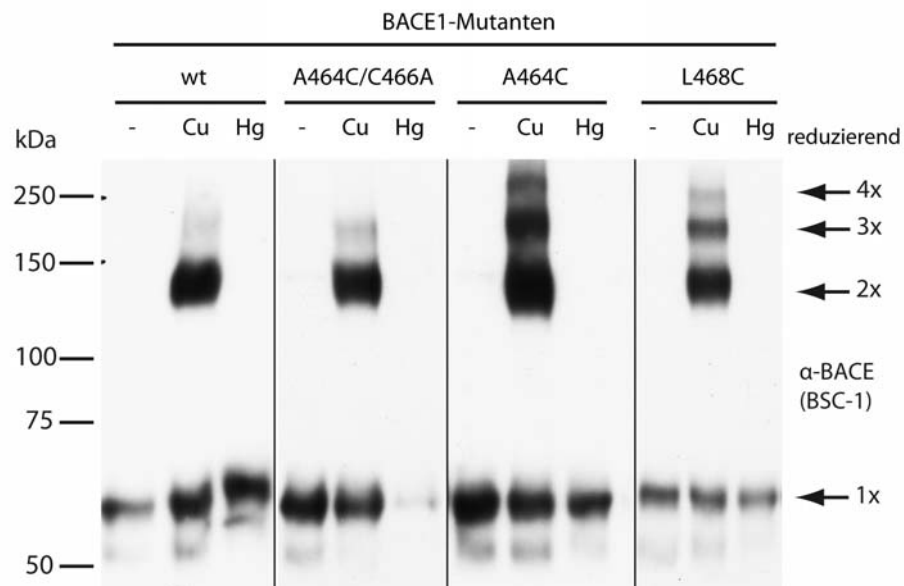


Abb. 33: Insertion zusätzlicher Cys-Reste in die BACE1-TMS

Western Blot Analyse nach reduzierender SDS-PAGE der BACE1-Mutanten mit zusätzlichen Cys-Resten in der TMS (A464C bzw. L468C) im Vergleich zum wt und A464C/C466A. Die Behandlung mit 100 μM CuCl_2 (Cu) oder 50 μM HgCl_2 (Hg) offenbart die Vernetzbarkeit von reduktionsstabilen Trimeren und Tetrameren.

3.6 Enzymatische Aktivität der BACE1-Oligomere

Eine Studie jüngerer Datums hat gezeigt, dass BACE1 als Dimer aktiv ist und sich dabei die aktiven Zentren der beiden Monomere sogar ergänzen können, um die proteolytische Aktivität zu entfalten (siehe 2.3.4) (Jin 2010). Unbekannt ist allerdings, welche Bedeutung die BACE1-Oligomerisierung für die β -Sekretase-Aktivität *in vivo* hat. Insbesondere stellt sich die Frage, ob die Oligomerisierung einen Einfluss auf Substraterkennung und Aktivität in Bezug auf das seinerseits dimerbildende Alzheimer-Protein APP hat. Um die physiologische Relevanz der BACE1-Oligomerisierung zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Aktivitätstests eingesetzt. Dabei wurde zum einen die kupfervermittelte Kreuzvernetzung genutzt, um BACE1-Oligomere zu stabilisieren und deren Aktivität im Vergleich zu unvernetztem BACE1 zu messen. Zum anderen wurde die Mutante C466A genutzt, um einen möglichen Einfluss der TMS auf die Aktivität zu untersuchen.

3.6.1 *In vitro* BACE1-Aktivitätstest

Der *in vitro*-Aktivitätstest basiert auf der Spaltung eines kurzen, synthetischen Peptid-Substrats, welches die BACE1-Spaltstelle im APP mit Schweden-Mutation (APP^{swe}) simuliert (siehe 2.3.3). Da es sich um einen zellfreien Test in wässriger Lösung handelt, wird vor allem die grundlegende enzymatische Aktivität in einer Probe gemessen, wohingegen zelluläre Einflüsse wie Lokalisation der

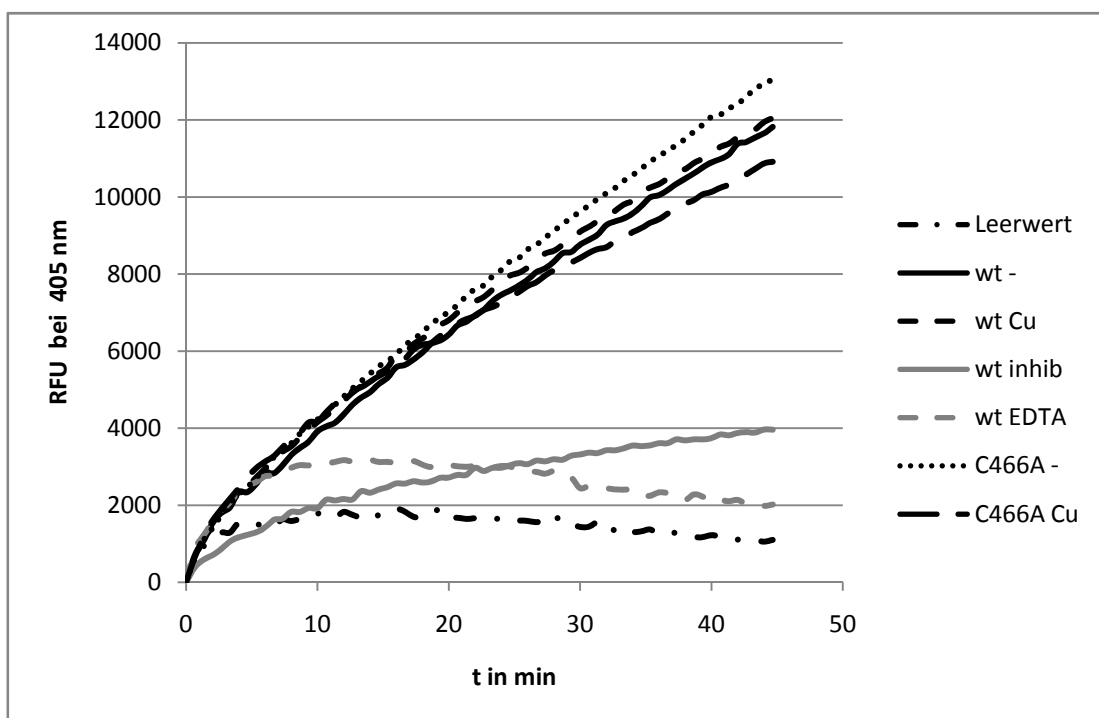


Abb. 34: *In vitro* BACE1-Aktivitätstest

Das Diagramm zeigt einen repräsentativen BACE1-Aktivitätstest. *Relative Fluorescence Units* (RFU) gemessen bei 405 nm sind über der Zeit aufgetragen. Das Substratpeptid war Mca-SEVNL-DAEFR-Dnp-RR (siehe 5.8.1). Unbehandeltes BACE1-wt-6H (wt -), kupferbehandeltes BACE1-wt-6H (wt Cu), unbehandeltes BACE1-C466A-6H (C466A -) und kupferbehandeltes BACE1-C466A-6H (C466A Cu). Alle Messungen wurden bei $t = 0$ min auf RFU = 0 normiert. Kontrollen waren Ni-NTA-Agarose mit *mock* Lysat (Leerwert), unbehandeltes BACE1-wt-6H mit 2 μ M BACE1 Inhibitor IV (Calbiochem) (wt inhib) und unbehandeltes BACE1-wt-6H, bei dem die Ni-NTA-Agarose mit EDTA gewaschen wurde (wt EDTA).

Protease und des Substratproteins keine Rolle spielen. In diesem Test zeigten sich keine signifikanten Aktivitätsunterschiede zwischen unbehandeltem BACE1-wt-6H (BACE1 wt mit HexaHis-Tag für die Isolierung per Ni-NTA-Agarose; siehe 5.8.1), kupfervernetztem BACE1-wt-6H oder BACE1-C466A-6H (Abb. 34). An den gleichermaßen ansteigenden Fluoreszenzkurven lässt sich ablesen, dass weder die Kreuzvernetzung noch das Fehlen des vernetzbaren Cys-Restes die grundlegende BACE1-Aktivität verändern. Die Kontrollen sind Ni-NTA-Agarose-Ansätze, die mit Lysat von untransfizierten Zellen (Leerwert) oder während des Aktivitätstest mit dem kommerziell erworbenen BACE1-Inhibitor IV inkubiert worden sind. Außerdem wurde ein Ansatz mit EDTA-haltigem Puffer gewaschen, um das gebundene BACE1-wt-6H vorzeitig zu eluieren. Sämtliche Kontrollen zeigten schwache bis keine Aktivität.

3.6.2 Zellbasierter Aktivitätstest mittels sAPP β -Freisetzung

Um komplexere Aspekte der Substraterkennung wie die Lokalisation innerhalb der Zellmembran, die Orientierung von Protease und Substrat zueinander oder die Interaktion mit Lipiden zu berücksichtigen, wurde ein zellbasierter Aktivitätstest etabliert, bei dem HEK293T-Zellen mit BACE1 wt bzw. BACE1-Mutante und APP co-transfiziert wurden. Nach der Behandlung der Zellen mit Puffer oder Kupfer wurde das Medium gewechselt und in Gegenwart von Cycloheximid (Chx) konditioniert (siehe 5.8.2). Dabei diente Chx als Inhibitor der Proteinbiosynthese, um die Proteinmenge und den Oligomerisierungszustand der Proteine in den Zellen zum Zeitpunkt $t=0$ zu konservieren. Dies sollte insbesondere verhindern, dass bei den kupferbehandelten Zellen im Verlaufe der Inkubation unvernetztes BACE1 nachproduziert wird, was das Ergebnis verfälscht hätte. Als Maß für die Aktivität wurde die von den Zellen in den Überstand freigesetzte sAPP β -Menge in mehreren Wiederholungen quantifiziert. Es zeigte sich, dass es einen deutlichen Unterschied zwischen der freigesetzten sAPP β -Menge durch unbehandeltes BACE1 wt und kupferbehandeltes BACE1 wt gab (Abb. 35). Offenbar resultierte aus der festen Stabilisierung von BACE1-Dimeren/Oligomeren eine erhöhte Prozessierung von APP. Ein ungewollter Nebeneffekt der Kupferbehandlung auf das APP oder andere zelluläre Komponenten konnte insofern ausgeschlossen werden, da die vernetzungsdefiziente BACE1-Mutante C466A keinen Unterschied zwischen unbehandelt und behandelt zeigte. Dieser Befund deutet auf einen direkten Zusammenhang zwischen der kupfervermittelten Kreuzvernetzung von BACE1 und der erhöhten APP-Prozessierung hin.

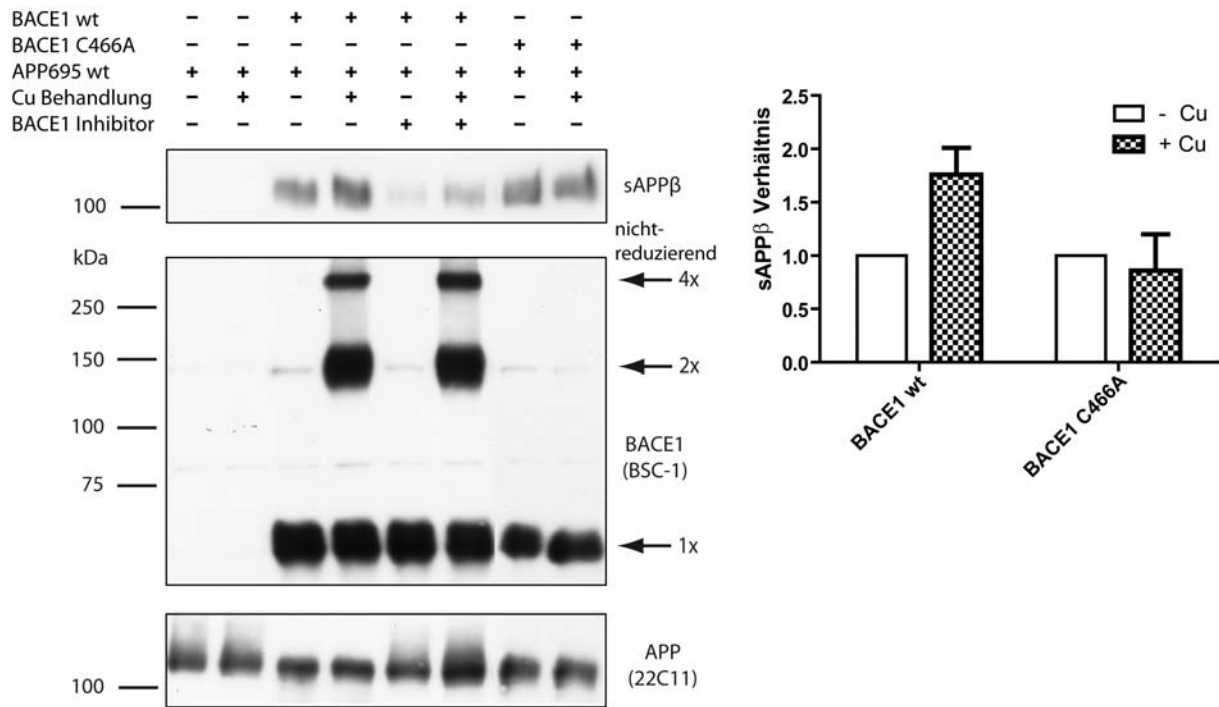


Abb. 35: Zellbasierter Aktivitätstest mittels sAPP β -Freisetzung

Die BACE1-Aktivität wurde im zellbasierten Test quantifiziert. Hierzu wurden APP695 wt und BACE1 wt oder C466A co-transfiziert. sAPP β wurde aus dem konditionierten Medium nach 2h Inkubation durch Western Blot-Analyse quantifiziert (oberer Blot). Aufgrund unterschiedlicher Expressionlevel von BACE1 wt und Mutante wurden die sAPP β -Level nicht direkt verglichen, sondern jeweils für die unbehandelten Zellen auf 1 normiert und dann mit den kupferbehandelten Zellen des gleichen Transfektionsansatzes verglichen. Die Expression von BACE1 und APP wurde mittels WB aus den Lysaten überprüft; Antikörper waren BSC-1 für BACE1 (mittlerer Blot) und 22C11 für APP (unterer Blot). Für die Inhibition von BACE1 wurde Inhibitor IV eingesetzt.

3.7 Der Abbau von BACE1-Monomer und -Dimer

Ein Grund für die erhöhte APP-Spaltung durch kruzvernetztes BACE1-Dimer könnte ein verlangsamter BACE1-Abbau und die daraus resultierende BACE1-Akkumulation in der Plasmamembran bzw. Endosomen sein. Um zu untersuchen, ob die an der Zelloberfläche fest verbundenen Dimere nach Kupferbehandlung stabiler sind, wurde an BACE1-transfizierten Zellen nach Behandlung mit oder ohne Kupfer eine Oberflächenbiotinylierung durchgeführt (Zeitpunkt $t = 0$ h). Zu den Zeitpunkten 0, 4, 8 und 12 h (*Chase*) wurden jeweils Zellen lysiert und nach Isolierung der biotinylierten Proteine per NeutrAvidin-Agarose wurde im Western Blot die vorhandene Menge an biotinyliertem BACE1 quantifiziert. Hier zeigte sich, dass sowohl das unbehandelte BACE1-Monomer als auch das Monomer und das Dimer nach Kupferbehandlung gleich schnell abgebaut wurden (Abb. 36). Die Halbwertszeit lag dabei im Bereich von 4-6 h; nach 12 h waren jeweils noch 20-30% der ursprünglich biotinylierten BACE1-Menge übrig. Die kupfervermittelte Kreuzvernetzung führte also nicht zu einer Verzögerung des BACE1-Abbaus, was daher als Ursache für die erhöhte β -sekretorische APP-Spaltung ausgeschlossen werden konnte.

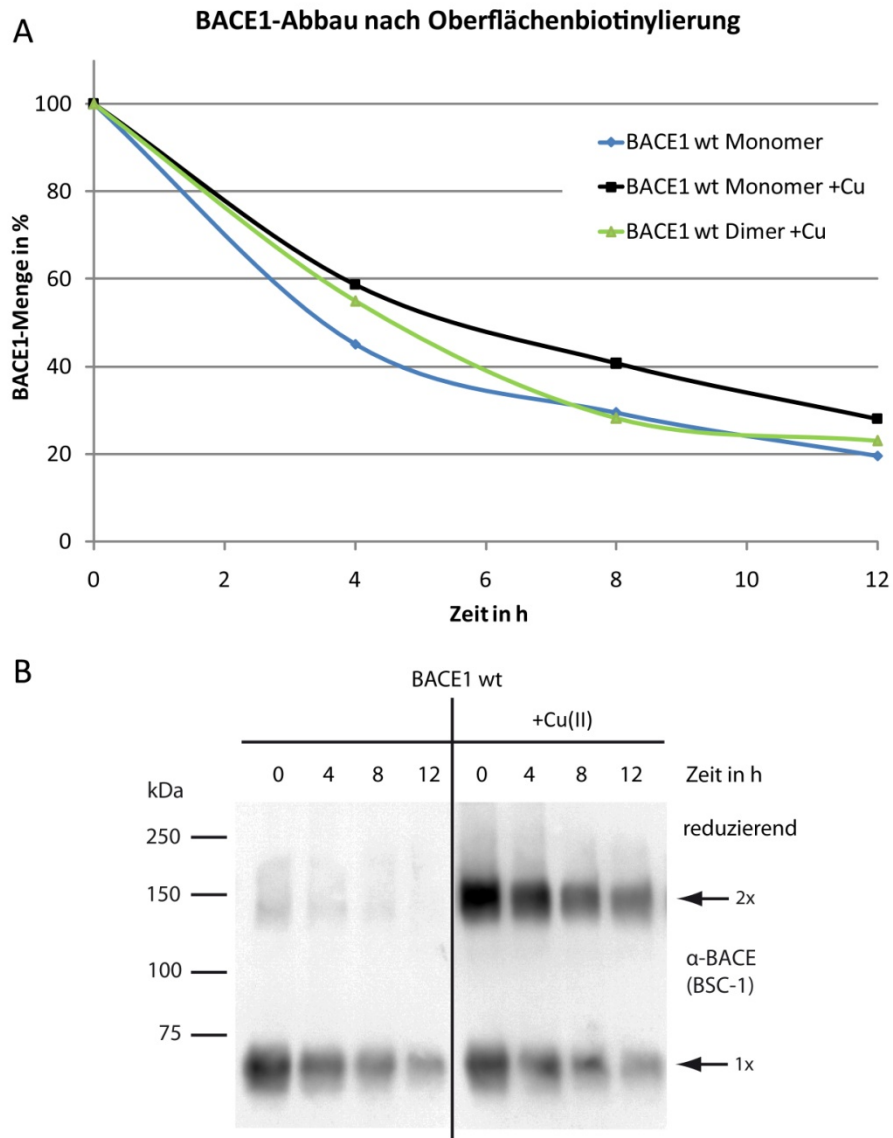


Abb. 36: BACE1-Abbau nach Oberflächenbiotinylierung

Der Abbau von BACE1-wt-Monomeren und -Dimeren wurde in transfizierten HEK293T-Zellen nach 4, 8 und 12 h mit und ohne Kupferbehandlung analysiert, indem zum Zeitpunkt $t = 0$ h eine Oberflächenbiotinylierung durchgeführt wurde.

(A) Repräsentative Abbaukurven von unbehandeltem BACE1-Monomer (blau, Raute), BACE1-Monomer nach Kupferbehandlung (schwarz, Vierecke) und BACE1-Dimer nach Kupferbehandlung (grün, Dreiecke). Die Quantifizierung aus dem Western Blot wurde per ChemiSmart durchgeführt, wobei der Wert zum Zeitpunkt $t = 0$ h auf 100% gesetzt wurde.

(B) Western Blot nach reduzierender SDS-PAGE, aus dem die BACE1-Banden nach Isolierung über NeutrAvidin-Agarose quantifiziert wurden. Ohne Kupferbehandlung zeigt sich vor allem Monomer; nach Behandlung mit $200 \mu\text{M CuCl}_2$ zeigen sich Dimer und Monomer.

3.8 BACE1 im Kupferstoffwechsel von *Drosophila melanogaster*

Aufgrund des in der Einleitung erwähnten hohen Grades der Konservierung zwischen Mensch und Taufliege (siehe Tabelle 2) ist *Drosophila melanogaster* ein gut etabliertes System, um Komponenten und Mechanismen des Kupferstoffwechsels zu untersuchen. Daher wurde *D. melanogaster* ausgewählt, um einen möglichen Einfluss von BACE1 auf den Kupferstoffwechsel von Zellen in einem lebenden Organismus zu untersuchen.

In Kooperation mit Dr. Haiqing Hua aus der Arbeitsgruppe von Prof. Walter Schaffner (Universität Zürich) wurden transgene Fliegen erzeugt, die unter Kontrolle des Aktin-Promotors humanes BACE1 exprimieren, was zu einer ubiquitären Expression des humanen Proteins in den Fliegen führte. Um die Fliegen empfindlicher für Kupfermangelsituationen zu machen, wurde ein Ctr1B $-/-$ Hintergrund verwendet (Zhou 2003; Selvaraj 2005; Balamurugan 2007), da Ctr1B von den drei Homologen Ctr1A, Ctr1B und Ctr1C derjeniger Transporter ist, der vermutlich für die grundlegende Kupferaufnahme im Darm der Fliegenembryos im späten Stadium und der Fliegenlarven zuständig ist (Zhou 2003). Werden die Fliegenlarven auf Standardfutter gesetzt, welches ausreichend Kupfer enthält, können sich die Ctr1B $-/-$ Larven relativ normal entwickeln, da CtrA und ein unspezifischer Kanal für zweiwertige Metallionen (Malvolio, Mvl (Southon 2008); humanes Ortholog ist DMT1 (*Divalent Metal Transporter 1*)) den Verlust von Ctr1B kompensieren können. Enthält das Futter allerdings den Kupfer(I)-Chelator BCS, entsteht eine Kupfermangelsituation, die die Entwicklung der Fliegenlarven je nach BCS-Konzentration stark verlangsamt oder sogar zu einem Absterben der Larven führt. Benutzt man zur Ernährung der Larven also Futter, dessen BCS-Gehalt knapp oberhalb der letalen Konzentration ist (hier 30 μ M BCS), kann das Überleben und die Entwicklung der Larven zu lebenden Fliegen als Anzeichen für eine positive Veränderung bei der Kupferaufnahme herangezogen werden.

Tatsächlich zeigte sich bereits bei den Larven eine Veränderung, wenn diese transgen BACE1 exprimierten. Während die Ctr1B $-/-$ Fliegenlarven ohne BACE1-Expression auf dem Nährboden mit 30 μ M BCS schon früh starben, konnten sich diejenigen Fliegenlarven mit einem Ctr1B $+/-$ Hintergrund und einige mit einem Ctr1B $-/-$ Genotyp und BACE1-Expression (UAS-BACE1 $+/-$, siehe 5.12.1) verpuppen (Abb. 37). Die Ctr1B $+/-$ Puppen zeichnen sich durch einen kürzeren und dunkleren Körper (*tubby +/-*; *yellow +/-*) aus, während die Ctr1B $-/-$ Puppen mit BACE1-Expression (UAS-BACE1 $+/-$) einen längeren, helleren, gelblicheren Körper und leuchtend rote Augen haben (*tubby -/-*; *yellow -/-*; *white +/-*).



Abb. 37: Verpuppte Fliegenlarven der transgenen Fliegen unter Kupfermangelbedingungen

Die linke Puppe mit dem Ctr1B +/- Genotyp ist kürzer, hat einen dunkleren Körper (*tubby +/-; yellow +/-*) und hat weiße Augen (*white -/-*), während die Ctr1B -/- Puppe mit BACE1-Gen länger ist (*tubby -/-*), einen helleren Körper hat (*yellow -/-*) und leuchtend rote Augen hat (*white +/-*).

Erstaunlicherweise entwickeln sich nicht nur die Ctr1B +/- Puppen zu Vollinsekten (Imago), sondern auch ein Teil der Ctr1B -/- BACE1 Puppen (Abb. 38). Wie bei den verpuppten Larven konnte eine eindeutige Unterscheidung aufgrund der Körper- und der Augenfarbe getroffen werden.

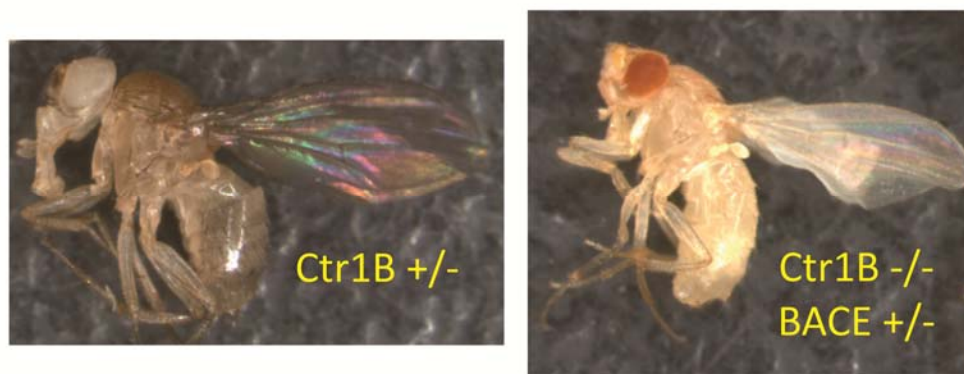


Abb. 38: Unter Kupfermangel geschlüpfte Fliegen mit und ohne Ctr1B

Wie bei den Puppen hat die Ctr1B +/- Fliege ohne BACE1-Gen weiße Augen und einen dunkleren Körper (*white -/-; yellow +/-*). Die Ctr1B -/- Fliege mit BACE1-Gen, die trotz Kupfermangel geschlüpft ist, hat rote Augen und einen helleren Körper (*white +/-; yellow -/-*).

Die Ursache dieses Effektes auf die Kupferaufnahme ist unklar. Aber BACE1 hat offenbar direkt oder indirekt einen positiven Einfluss auf die Kupferaufnahme der Fliegen, der es ihnen ermöglicht, sich trotz Ctr1B -/- Genotyp unter Kupfermangel zu entwickeln. Dieser Effekt scheint zwar relativ schwach zu sein, ist jedoch reproduzierbar vorhanden (Tabelle 4). Während 0% von insgesamt 318 untersuchten Ctr1B -/- Fliegenlarven bei 30 μ M BCS überlebten, sind es bei den Ctr1B -/- BACE1 Larven immerhin 17 von 458 (knapp 4%), die sich zu Fliegen entwickeln. Im Vergleich dazu entwickeln sich rund 24% (28 von 115) der Larven zu Fliegen, deren Ctr1B -/- Hintergrund mit einem Ctr1B-Expressionskonstrukt kompensiert wurde (*Rescue*). BACE1 ist also kein vollwertiger Ersatz für den Ctr1B in den Fliegenlarven, hat aber einen deutlich messbaren Effekt auf die Überlebenschance der Ctr1B -/- Fliegenlarven unter Kupfermangelbedingungen. Um einen möglichen Einfluss der Transmembransequenz und der zytosolischen Cys-Reste (Kupfer(I)-Bindungsstelle, siehe 2.4.4) auf

die beschriebene Wirkung von BACE1 zu untersuchen, wurde im gleichen Überlebenstest die BACE1-Mutante CMCMCCC getestet, bei der nahezu alle Cystein- und Methionin-Reste der TMS und des Zytosols (siehe Abb. 5 und Abb. 16) gegen Alanin ausgetauscht wurden (C466/474/478/482/485A, M470/476A). Hier konnten sich 4 der insgesamt 186 ausgewerteten Larven verpuppen und zu Vollinsekten entwickeln (rund 2%). Es kann also zunächst konstatiert werden, dass auch die BACE1-Mutante einem kleinen Teil der Ctr1B -/- Fliegen das Überleben unter Kupfermangelbedingungen ermöglicht, dieser Effekt also zumindest nicht ausschließlich von den Cys- und Met-Resten der BACE1-TMS abhängig ist. Allerdings scheint die Überlebenswahrscheinlichkeit geringer im Vergleich zu BACE1 wt-Fliegen zu sein.

Tabelle 4: Ergebnisse der Überlebenstests mit transgenen BACE1- und Kontrollfliegen

	Zahl der Larven	Überlebende	Anteil in %
Experiment 1			
Kontrolle (Ctr1B -/-)	200	0	0
Ctr1B	115	28	24.3
BACE1 wt	159	9	5.7
BACE1 wt	141	3	2.1
BACE1-CMCMCCC	124	3	2.4
Experiment 2			
Kontrolle (Ctr1B -/-)	118	0	0
BACE1 wt	97	4	4.1
BACE1 wt	61	1	1.6
BACE1-CMCMCCC	62	1	1.6

3.9 BACE1 und der Abbau von A β (A β clearance)

Aufgrund der Tatsache, dass BACE1 *in vitro* A β an Position 20 und 34 spalten kann (siehe 2.3.3, Abb. 6 und Abb. 7), sollte einer möglichen Funktion von BACE1 beim A β -Abbau (A β clearance) weiter nachgegangen werden. Hierzu wurde zunächst ein *in vitro*-Verdau mit aufgereinigter BACE1-Ektodomäne (BACE1-NT (Bethge 2005)) und synthetischem A β 42 durchgeführt. Die Auswertung der Spaltprodukte per MALDI-MS ergab, dass neben den bereits bekannten Spaltstellen nach AS 20 und 34 noch eine weitere nach Position 15 vorhanden ist (Abb. 39).

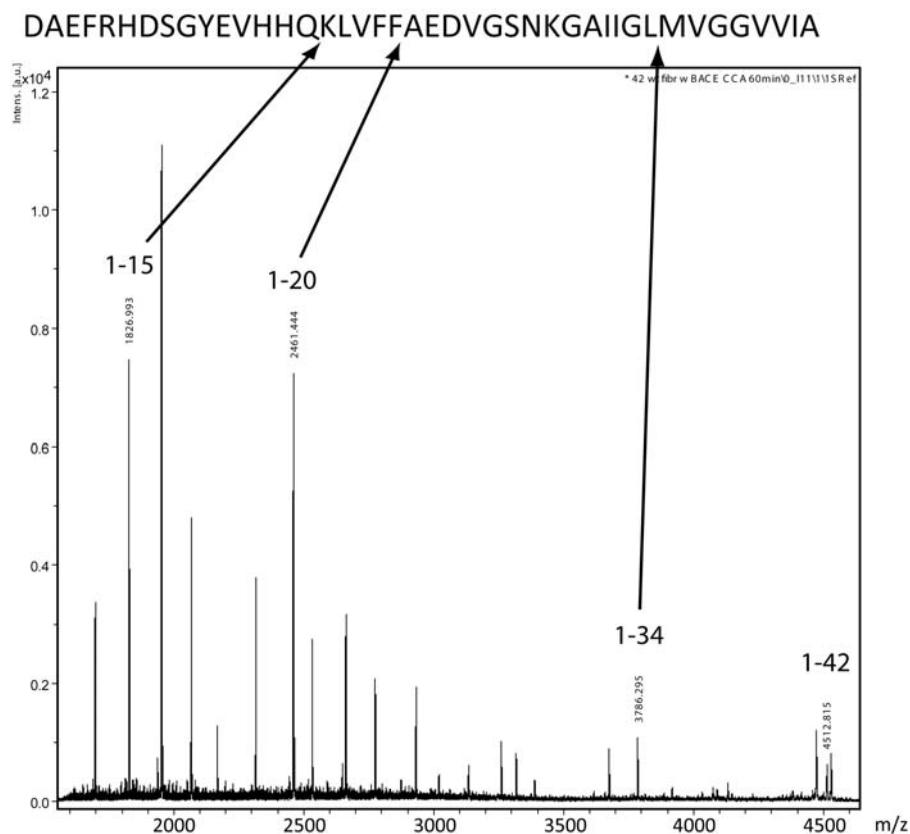


Abb. 39: MALDI-Massenspektrogramm nach A β 42-Verdau durch BACE1 *in vitro*

Massenspektrogramm einer A β 42-Probe, nachdem sie für 1h bei 37°C mit BACE1-NT bei pH4,5 verdaut und mit C18-ZipTip (siehe 5.10) für die Messung vorbereitet worden ist. X-Achse, Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z); Y-Achse, Signalintensität (a.u. = *arbitrary units*). Über dem Spektrogramm ist die Aminosäuresequenz von A β 42 angegeben, schwarze Pfeile zeigen die Spaltstellen. 1-42, unverdautes Peptid; 1-34, 1-20 und 1-15, Fragmente nach Spaltung hinter der entsprechenden Position.

Als Annäherung an die *in vivo*-Situation wurde ein Zellkultursystem etabliert, bei dem HEK293T-Zellen mit BACE1 und SPA4CT co-transfiziert wurden. SPA4CT ist ein APP-Konstrukt, das nach dem Signalpeptid (SP) nicht mehr die APP-Ektodomäne, sondern lediglich das C-terminale Fragment C99 kodiert. Der β -Sekretase-Schnitt ist hier nicht mehr nötig, um das Substrat für die γ -Sekretase zu erhalten, was zu einer starken A β -Produktion dieser Zellen führt. Dieses Konstrukt wurde gewählt, um die proteolytische Aktivität von BACE1 gegenüber A β unabhängig vom initialen β -Schnitt im Vollängen-APP zu messen.

Quantifiziert wurde die von den Zellen sekretierte A β -Menge mit Hilfe eines Sandwich-ELISA gegen A β 40 (Antikörper G2-10, siehe 5.6.2.3) aus dem konditionierten Zellkulturüberstand. Es zeigte sich im Verlauf einer 6h-Zeitreihe, dass im Überstand von Zellen, die mit SPA4CT transfiziert waren, recht große Mengen von A β akkumulierten (Abb. 40). Wurde zusätzlich zu SPA4CT BACE1 wt co-transfiziert, kam es zu einem starken Absinken der nachweisbaren A β 40-Menge im Überstand. Das Gleiche galt für A β 42 (Antikörper G2-13) und Gesamt-A β (Antikörper 4G8) (Daten nicht gezeigt). Um zu belegen, dass dieser Effekt spezifisch für die BACE1-Expression war, wurden die Zellen des Co-Transfektionsansatzes (SPA4CT und BACE1 wt) mit dem BACE1-Inhibitor IV behandelt. Hier zeigte sich, dass das messbare A β -Level wieder auf dem gleichen Niveau wie nach der Transfektion von SPA4CT alleine lag.

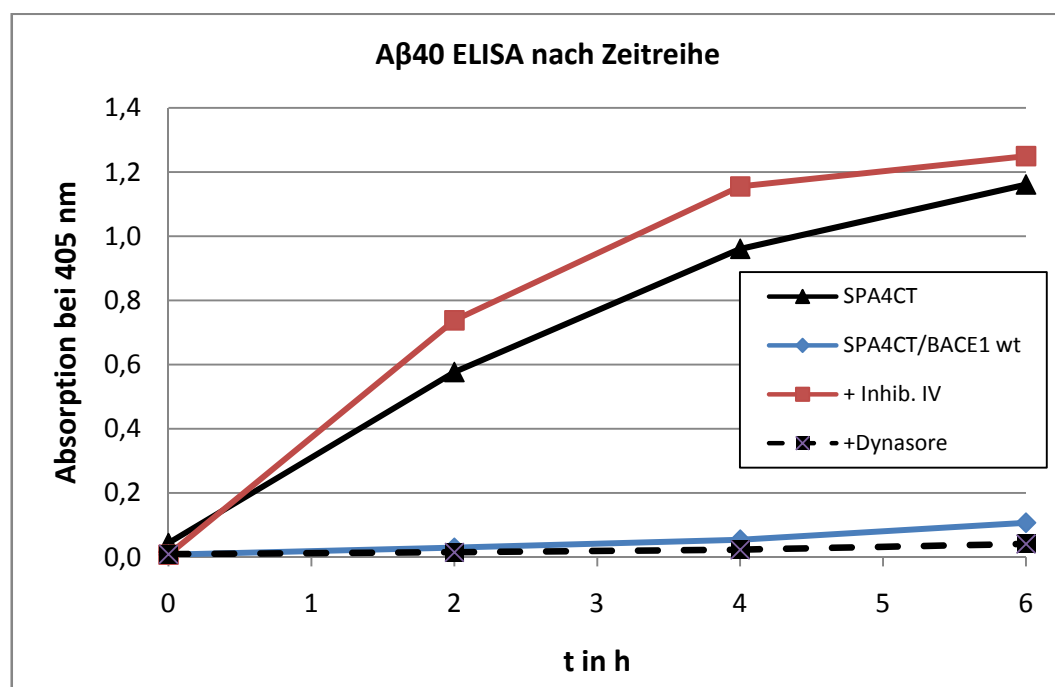


Abb. 40: A β 40 ELISA nach Zeitreihe mit SPA4CT und BACE1 wt

Die Kurven zeigen ein repräsentatives Experiment, wobei jeder Datenpunkt einer Doppelbestimmung entspricht. Die A β 40-Mengen im Zellkulturüberstand wurden mittels ELISA (405 nm) nach einer 6h-Zeitreihe quantifiziert. Schwarze Linie (Dreiecke), SPA4CT ohne BACE1; blaue Linie (Rauten), Co-Transfektion SPA4CT und BACE1 wt; rote Linie (Quadrate), Co-Transfektion SPA4CT und BACE1 wt mit Zugabe von BACE1 Inhibitor IV; schwarze, gestrichelte Linie (Quadrate), Co-Transfektion SPA4CT und BACE1 wt mit Zugabe des Endozytose-Inhibitors Dynasore (40 μ M in 0,1% DMSO, Sigma-Aldrich, USA).

Außerdem wurde der Endozytoseinhibitor Dynasore eingesetzt, um einen Beleg für Endozytoseabhängigkeit der A β -Spaltung zu finden. Hier zeigte sich allerdings, dass die Zellen kein A β mehr produzierten. Offenbar war die A β -Produktion aus SPA4CT durch die γ -Sekretase genau wie die β -Sekretase endozytoseabhängig.

Es konnte mit den beschriebenen Ansätzen nachgewiesen werden, dass das Absinken des A β 40-Spiegels im Überstand eine direkte Folge der β -Sekretase-Aktivität war. Die wahrscheinliche Erklärung hierfür ist, dass das von den Zellen produzierte A β , analog zu der *in vitro*-Spaltung von A β durch BACE1-NT, durch BACE1 wt abgebaut wurde. Im Gegensatz zu der Co-Transfektion von SPA4CT und BACE1 wt konnte allerdings kein A β -Abbau im Überstand registriert werden, wenn das A β 40 als synthetisches Peptid (PSL, Deutschland) zu Zellen gegeben wurde, die nur mit BACE1-transfiziert waren (Abb. 41). Über den gesamten Verlauf der Zeitreihe blieb der A β -Spiegel im Überstand konstant.

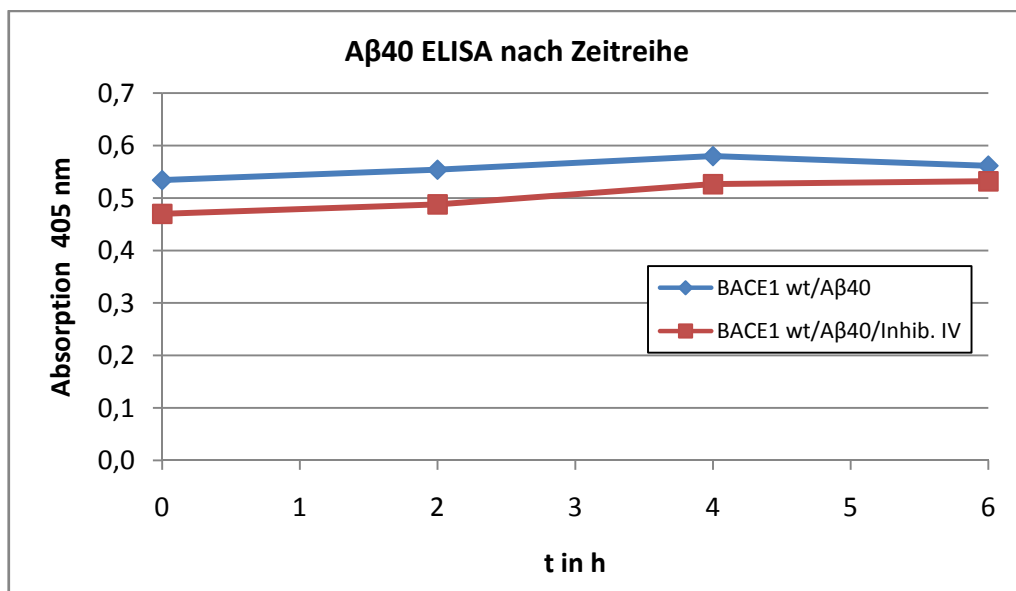


Abb. 41: A β 40 ELISA nach Zeitreihe mit BACE1 wt und synthetischem A β 40

Zum Zeitpunkt t = 0h der 6h-Zeitreihe wurde synthetisches A β 40 (200 pM, PSL, Deutschland) in den Zellkulturüberstand gegeben. Die A β 40-Mengen wurden dann zu den angegebenen Zeitpunkten mittels ELISA (G2-10, 405 nm) quantifiziert. Blaue Linie (Rauten), Transfektion von BACE1 wt und Zugabe von synth. A β 40; rote Linie (Quadrate), Transfektion von BACE1 wt mit Zugabe von BACE1 Inhibitor IV und synth. A β 40.

4 DISKUSSION

4.1 BACE1-Dimerisierung

Eine der möglichen Ursachen, die das Auftreten der sporadischen Alzheimer-Krankheit begünstigt, kann eine erhöhte BACE1-Expression und die damit verbundene β -Sekretase-Aktivität sein (Yang 2003), da, in Kombination mit der γ -Sekretase, die Folge eine Zunahme der amyloidogenen APP-Prozessierung und A β -Produktion ist. Eine Reihe von unterschiedlichen Faktoren, wie regulatorische *microRNAs* (miRs), zerebraler Energiemangel oder oxidativer Stress, können die BACE1-Expression auf Transkriptions- und Translationsebene beeinflussen (Apelt 2004; Blasko 2004; Christensen 2004; Hebert 2008; O'Connor 2008). Im Gegensatz zur komplexen Regulation der Transkription und Translation wird die proteolytische Aktivität von BACE1 im Gehirn offenbar vor allem von dessen bloßer Konzentration bestimmt, was sich an der von Yang et al. (Yang 2003) beschriebenen Korrelation zwischen der vorhandenen BACE1-Menge und der messbaren β -Sekretase-Aktivität ablesen lässt. Zwar wurden Interaktionspartner entdeckt, die Reticulon-Familienmitglieder RTN1-4, die an den C-terminalen Teil von BACE1 binden und so die Spaltung von APP verhindern können (He 2004), körpereigene Modulatoren oder Bedingungen, die die enzymatische Aktivität an sich beeinflussen, wurden hingegen noch nicht identifiziert.

Ein Faktor zur Modulation der BACE1-Aktivität oder -Substraterkennung könnte die Homodimerisierung innerhalb der Membran sein. Durch verschiedene gelektrophoretische Techniken konnte gezeigt werden, dass BACE1 als Dimer aus Hirnhomogenat oder transfizierten Zellen isoliert werden kann (Sidera 2002; Marlow 2003; Schmechel 2004; Westmeyer 2004). Westmeyer et al. entdeckten durch *in vitro*-Aktivitätsmessungen, bei denen die Aktivität einer Membranpräparation mit dimerisierendem Vollängen-BACE1 mit derjenigen von BACE1-NT-Monomeren verglichen wurde, dass membrangebundenes BACE1 eine höhere katalytische Aktivität hat. Unklar blieb, wie sich die Aktivität von membranständigem Dimer zu membranständigem Monomer verhält, und folglich, ob die durch *in vitro*-Methoden gezeigte Homodimerisierung von BACE1 *in vivo* eine Bedeutung für Aktivität, Lokalisation oder Substraterkennung hat.

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe von mikroskopbasierten Interaktionsmessungen (FLIM-FRET) erstmals gezeigt werden, dass BACE1 in lebenden Zellen Homodimere bildet (3.3). Diese Homodimere konnten durch Behandlung mit Kupfer, dessen Interaktion mit BACE1 bereits durch den Nachweis von Bindungsstellen in Ektodomäne und zytosolischem Teil gezeigt wurde (2.4.4), über einen konservierten Cys-Rest (Cys466) in der Transmembransequenz von BACE1 kreuzvernetzt werden (3.2.2). Mit Hilfe dieser kupfervermittelten Kreuzvernetzung konnten neben den SDS- und reduktions-stabilen BACE1-Dimeren zusätzlich unter nicht-reduzierenden Bedingungen noch BACE1-Tetramer-Banden nachgewiesen werden (3.1.1). Der Einsatz von zwei unterschiedlichen BACE1-

Aktivitätstests – einem *in vitro*-Ansatz mit fluoreszenzmarkiertem Substrat und einem zellkulturbasierten Test mit APP als Substrat – ermöglichte die Aussage, dass der Austausch des Cys466 gegen Ala oder dessen kupfervermittelte Kreuzvernetzung zwar die grundlegende enzymatische Aktivität der β -Sekretase BACE1 nicht beeinflussen, die Stabilisierung des BACE1-Dimers über Cys466 allerdings die APP-Spaltung erhöht (3.6). Somit konnte im Zellkultursystem ein Zusammenhang zwischen der BACE1-Oligomerisierung und dessen proteolytischer Aktivität gegenüber dem für die Alzheimer-Krankheit zentralen Substrat APP hergestellt werden.

4.1.1 Die Wirkung von Kupfer und anderen Metallen auf die BACE1-TMS

Im Rahmen dieser Arbeit wurde beschrieben, dass die Behandlung von membranständigem BACE1 wt mit Cu(II)-Ionen zu einer reduktionsstabilen Kreuzvernetzung von BACE1-Dimeren führt. Außer einer Arbeit aus dem Jahr 1980, in der Cytochrom P450 durch die Behandlung mit Kupfer und dem Chelator 1,10-Phenanthrolin zu einem Dimer verknüpft wurde, welches selbst durch reduzierende SDS-PAGE nicht zu trennen war, gibt es in der Literatur keine Beispiele für eine solche Reaktion (McIntosh 1980). Anders als beim Beispiel Cytochrom P450 konnte für BACE1 durch Mutationsanalyse gezeigt werden, dass diese Reaktion von Cys466 in der BACE1-TMS abhängig ist (3.1.1 und 3.2.2). Dieser Rest liegt zentral zwischen der inneren und äußeren Membrangrenze, eingebettet in das Motiv $M_{462}xxx C_{466}xxx M_{470}xxx C_{474}x M_{476}x C_{478}$ -Motiv (3.2.1), welches Ähnlichkeit mit den Kupferbindungsmotiven aus den Kupferchaperonen/Cu-ATPasen ($MxCxxC$) und dem Kupfertransporter Ctr1 ($MxM, MxxM, MxxxM$) aufweist (2.4.2).

Da die Stabilisierung des BACE1-Dimers mit Cu(II) ablief, nicht aber mit den ähnlichen, redox-inerten Übergangsmetallen Zn(II) oder Ni(II), liegt die Vermutung nahe, dass eine Redox-Reaktion direkt oder indirekt an der Kreuzvernetzung beteiligt ist. Dies wird durch die Tatsache unterstützt, dass sich die kupfervermittelte Kreuzvernetzung durch das Oxidationsmittel $KMnO_4$ inhibieren ließ, welches die Reduktion von Cu(II) zu Cu(I) verhindern sollte. Im Einklang damit steht der Befund, dass der Cu(I)-Chelator BCS die Reaktion ebenfalls blockieren konnte. Allerdings scheint die Reduktion von Cu(II) zu Cu(I) kein essentieller Bestandteil der beobachteten Kreuzvernetzung zu sein, da sie sich direkt mit Cu(I) (durch Vorinkubation von Cu(II) mit dem Reduktionsmittel Ascorbinsäure), dem Thiophil Hg(II) und dem Cu(I)-Analogon Ag(I) durchführen ließ. Zusammengefasst sprechen diese Indizien dafür, dass die Kreuzvernetzung durch eine Chelatierung erfolgt, bei der zwei bzw. vier BACE1-Transmembransequenzen eines Homodimers bzw. Tetramers eine Metallbindungsstelle für Cu(I) oder Ag(I) ausbilden. Hg(II) stellt einen Sonderfall dar, weil hier eine lineare Verknüpfung der Koordinationszahl 2 ausreicht, um eine Kreuzvernetzung zu SDS-stabilen Dimeren zu erreichen. Unklar bleibt in diesem Modell der Mechanismus der Cu(II)-Reduktion und warum diese Reaktion zu einem reduktionsstabilen Dimer führte, während mit Ag(I) nur unter nicht-reduzierenden Bedingungen Dimere und Tetramere zu beobachten sind. Ein Unterschied zwischen Cu(I) und Ag(I) könnte auf die unterschiedlichen Ionenradii zurückzuführen sein. Beide Metallionen haben zwar

ähnliche Bindungseigenschaften, allerdings ist Ag(I) mit einem Ionenradius von 126 pm deutlich größer als Cu(I) mit einem Ionenradius von 96 pm (die Ionenradii variieren mit der Art und Koordinationszahl gebundener Liganden (Ahrens 1952; Shannon 1976)). Dieser größere Ionenradius führt möglicherweise dazu, dass Ag(I) weniger fest gebunden vorlag als Cu(I) und daher von Reduktionsmitteln bzw. schwefelhaltigen Chelatoren wie β MCE und DTT aus der Bindungsstelle verdrängt werden konnte.

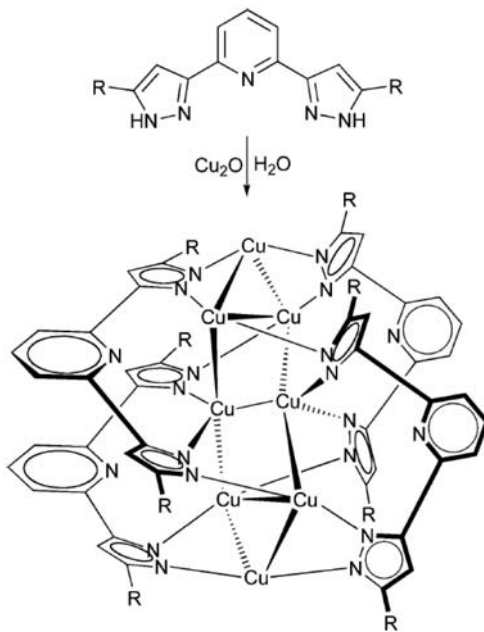


Abb. 42: Cu-Cu-Interaktionen in einem Closed-Shell Complex

Vier Monomere des stickstoffhaltigen Ligand 2,6-bis(5-Methyl-1H-Pyrazol-3-yl)-Pyridin bilden mit Cu(I)-Ionen einen oktanukleären Komplex unter Beteiligung von Cu-Cu-Wechselwirkungen.

(Zhou 2007)

Treten nun sulfhydrylhaltige Chelatoren, wie β MCE oder DTT im reduzierenden Probenpuffer, mit den Cu-Cu-Interaktionen in Konkurrenz, werden die Bindungen, die das Tetramer stabilisieren, dissoziieren. Diese Hypothese impliziert, dass die Wechselwirkungen zwischen dem BACE1-Dimer und Cu stark genug sind, um der Konkurrenz durch β MCE oder DTT zu widerstehen.

Für die These, dass letztlich Cu(I) und nicht Cu(II) durch eine dimere BACE1-TMS chelatiert wurde, spricht auch, dass die Dimere im EDTA-haltigen Lysepuffer (Chelator für zweiwertige Kationen) stabil blieben. Eine alternative Erklärung für das redox-stabile Dimer wäre, dass bei der Reduktion von Cu(II) zu Cu(I) eine Disulfid- oder Thioether-Brücke zwischen den Cys466-Resten ausgebildet wird. Ein in der Literatur beschriebenes Beispiel für ein Transmembranprotein mit einem funktionellen Cys-Rest in der Membran, dessen Homodimerisierung über eine Disulfid-Brücke stabilisiert wird, ist p75^{NTR} (p75 Neurotrophin-Rezeptor) (Vilar 2009). Die Disulfid-Brücke des p75^{NTR}-Dimers ist allerdings

Eine ähnliche Ursache könnte es haben, dass nach nicht-reduzierender SDS-PAGE (nach Behandlung mit Cu(II), Cu(I) oder Ag(I)) Tetramere auftreten, während unter reduzierenden Bedingungen lediglich Dimere (nach Behandlung mit Cu(I) und Cu(II)) nachweisbar sind. Sowohl Cu(I) als auch Ag(I) können sogenannte *Closed-Shell Complexes* oder d^{10} - d^{10} -Interaktionen ausbilden (Jansen 1987), bei denen neben der Koordination durch nukleophile Liganden noch Metall-Metall-Wechselwirkungen beteiligt sind (Abb. 42). Dabei dienen die Imidazol/Histidin-ähnliche Pyrazolat-Gruppen (2,6-bis(5-Methyl-1H-Pyrazol-3-yl)-Pyridin) als Liganden, um einen tetrameren Komplex mit Cu(I) auszubilden, in dem, neben der Koordination über die Stickstoffe, cuprophile Interaktionen stattfinden (Zhou 2007). Diese Wechselwirkungen sind zwar schwächer als kovalente Bindungen, reichen aber möglicherweise aus, um unter nicht-reduzierenden Bedingungen analog zum gezeigten Beispiel tetramere BACE1-Cu-Komplexe zu stabilisieren.

nicht reduktionsstabil, so dass der Rezeptor nur bei nicht-reduzierender SDS-PAGE als Dimer migriert. Die Disulfid-Brücke von BACE1 müsste also sterisch abgeschirmt vorliegen, um resistent gegen Reduktionsmittel zu sein. Für die Reaktion zum Thioether, die als Zwischenprodukt vermutlich ein Dehydro-Alanin nach Eliminierung von H_2S haben würde, gibt es keine bekannten Beispiele aus anderen Biomolekülen, was unklar lässt, unter welchen Bedingungen eine solche Reaktion ablaufen könnte. Gegen diese beiden Möglichkeiten spricht, dass auch die Ag(I)-vermittelte Kreuzvernetzung primär von Cys466 abhängt (3.4.6), der Beitrag dieser reduziert vorliegenden Sulfhydryl-Gruppen also essentiell für die Metallkoordination und die Ausbildung der vermeintlichen Cu(I)/Ag(I)-Bindungsstelle ist.

Um die Idee der Metall-Chelatierung durch die BACE1-TMS weiter zu verfolgen und deren mögliche Geometrie aufzuklären, wurde für die Vernetzungsreaktion von BACE1 Palladium(II) eingesetzt, welches die quadratisch-planare Bindungsgeometrie von Cu(II) simulieren sollte (Abb. 43). Der beobachtete Effekt durch Palladium(II) bei der Kreuzvernetzung von BACE1-Dimeren steht in einem leichten Widerspruch zu den zuvor beschriebenen Befunden. Trotz der vermuteten Chelatierung von Cu(I)/Ag(I), die tendenziell in einer tetraedrischen Geometrie zu erwarten ist (Abb. 43), lassen sich BACE1-Dimere auch durch Pd(II) vernetzen (3.4.4). Allerdings bildet Pd(II) (Elektronenkonfiguration der äußeren Schale $4d^8$) keine *Closed-Shell Complexes* aus, was erklärt, warum die Kreuzvernetzung durch Pd(II) kaum zu stabilen Tetrameren sondern lediglich zu Dimeren nach nicht-reduzierender SDS-PAGE führt. Der Ionenradius von Pd(II) ist zwar mit 100 pm dem von Cu(I) ähnlich, dennoch ist die Wechselwirkung zur Dimerstabilisierung analog zu Ag(I) nicht reduktionsstabil. Die postulierte Metallbindungsstelle in der BACE1-TMS ist also möglicherweise flexibel genug, um ein Ion in der quadratisch-planaren Geometrie zu koordinieren (Pd(II)), entfaltet allerdings erst die volle Affinität in einer tetraedrischen Anordnung (Cu(I)).

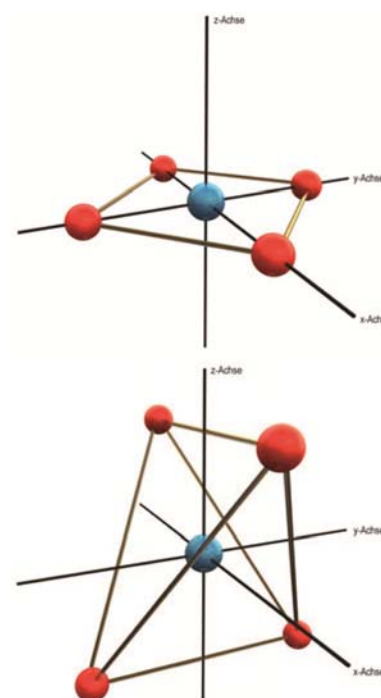


Abb. 43: Koordinationsgeometrien

Während Cu(II) und Pd(II) eher eine quadratisch-planare Geometrie bevorzugen (oben), neigen Cu(I), Ag(I) und Zn(II) zur tetraedrischen Geometrie (unten). Das metallische Zentralatom ist jeweils blau, die schwefel- und stickstoffhaltigen Liganden rot dargestellt.

Quelle: www.ddesignmedia.de

Alle Metallionen, die zur Kreuzvernetzung von BACE1-Dimeren eingesetzt werden konnten, haben als Gemeinsamkeit „weiche“ Bindungseigenschaften (HSAB-Theorie, 2.4.1). Im Gegensatz dazu fand die Reaktion mit „mittelharten“ Metallionen wie Zn(II), Ni(II), Mn(II) oder Co(II) nicht statt (3.4.3). Dies spricht für die Beteiligung von „weichen“ Koordinationsliganden wie der Sulfhydryl-Gruppen von Cys-Resten, der Thioether-Gruppen von Methioninen und der Stickstoffe des Peptidrückgrats. Betrachtet man alle Indizien zur metallvermittelten Kreuzvernetzung von BACE1-Dimeren und -Tetrameren,

verfestigt sich die Hypothese, dass zwei bzw. vier BACE1-Transmembransequenzen eine Metallbindungsstelle bilden können, die mit hoher Affinität Cu(I) und mit Abstrichen Ag(I) und Pd(II) bindet. Diese Bindungsstelle scheint also eine gewisse Flexibilität aufzuweisen, da Cu(I)/Ag(I) und Pd(II) unterschiedliche Bindungsgeometrien bevorzugen. Der zentrale Ligand ist dabei jeweils das Cys466, wobei Met462 und Met470 auch eine Rolle spielen könnten (3.2.2). Welche Liganden noch beteiligt sind und wie die Konformation der TM-Helix im Bereich der vermeintlichen Metallbindungsstelle im Detail aussieht, wird in zukünftigen Studien durch strukturaufklärende Methoden wie EPR (*Electron Paramagnetic Resonance*) oder NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*) zu bestimmen sein. Diese werden ebenfalls Aufschluss darüber liefern, warum die geladenen Metallionen in der Lage sind, in die Membran einzudringen, um dort Wechselwirkungen mit der BACE1-TMS einzugehen. Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund interessant, dass Ag(I) und dessen Bindung an Cys-Reste in früheren Studien erfolgreich eingesetzt werden konnte, um die porenformenden Aminosäure-Reste eines tetrameren Kalium-Kanals zu bestimmen (Lu 1995).

Da es in der BACE1-TMS eine signifikante Häufung von konservierten Aminosäure-Resten gibt, die für das hydrophobe Membranmilieu eher ungewöhnlich sind (26% Cys- und Met-Reste statt der durchschnittlichen 6%, 3.2.1), liegt die Vermutung nahe, dass diese eine physiologische Funktion erfüllen. Letztlich bleibt die Frage zu klären, ob der beobachtete Effekt von Kupferionen auf die Dimerstabilisierung eine Bedeutung *in vivo* hat, oder ob es sich um ein Artefakt des verwendeten Untersuchungssystems handelt. Einerseits sind die verwendeten Konzentrationen, die einen deutlichen Effekt hatten, rund zehnmal so hoch wie die physiologische Konzentration von 15 μM im synaptischen Spalt oder im Serum. Andererseits gibt es im Organismus zahlreiche Proteine wie die zytosolischen Kupferchaperone CCS, Cox17 oder Atox1 oder das Serum-Protein Ceruloplasmin, die Kupfer gezielt zu bestimmten Orten in der Zelle bzw. auf der Zelloberfläche transportieren können, was die Betrachtung von Durchschnittskonzentrationen hinfällig machen könnte. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang der Unterschied zwischen der Überexpression von BACE1 im Zellkultursystem und der Isolierung aus Hirnhomogenat. Während ohne die kupfervermittelten Kreuzvernetzung der überwiegende Teil der BACE1-Menge aus Zellkultur nach SDS-PAGE als Monomer sichtbar wird (siehe Abb. 11 und Abb. 12), migrieren rund 50% der aus Hirnhomogenat isolierten BACE1-Menge als Dimer (Schmechel 2004). Ob diese Diskrepanz auf unterschiedliche Präparationsarten zurückzuführen ist, oder ob das komplexe System aus Protein-Protein- und Protein-Metall-Wechselwirkungen im Gehirn, welches in Zellkultur nur unvollständig simuliert werden kann, hierfür verantwortlich ist, werden zukünftige Studien zeigen.

4.1.2 Untersuchung der Transmembraninteraktion von BACE1 mittels *Cys-Scan*

Da sich BACE1-Dimere innerhalb der Membran durch Metallbehandlung vernetzen ließen, wurde die These aufgestellt, dass die Transmembransequenzen zweier BACE1-Monomere sich sehr nahe kommen und interagieren. Daher wurde eine Reihe von Cystein-Austausch-Mutanten (*Cys-Scan*) getestet, um die kupfer- und quecksilber-vermittelte Kreuzvernetzungsreaktion zur Eingrenzung der Helix-Helix-Nahtstelle zu nutzen (3.5.1). Eine Helix-Windung besteht im Schnitt aus 3,6 AS, so dass die Mutanten M462A/C466A bis M470A/C466A zwei Helix-Windungen (eine vor und eine hinter Cys466) abdeckten. Jede 3. bis 4. Aminosäure liegt mit der nach außen (von der Längsachse der Helix weg) zeigenden Seitenkette auf einer Seite der Helix und bildet mit den anderen Aminosäuren auf der gleichen Seite eine Interaktionsfläche (Abb. 44). Folglich liegen die potentiell metallbindenden AS-Reste Met462, Cys466 und Met472 auf der gleichen Seite der Helix und bilden eine Interaktionsfläche, was zu der Hypothese führte, dass sich die Mutanten M462C/C466A und M470C/C466A ähnlich gut wie BACE1 wt kreuzvernetzen lassen sollten.

Dieser Versuch erbrachte das überraschende Ergebnis, dass sich nicht nur die Mutanten M462C/C466A und M470C/C466A, sondern, mit der Ausnahme von F469C/C466A, alle Mutanten zu Dimeren vernetzen ließen. Es konnte also zunächst keine spezifische Interaktionsfläche oder Nahtstelle (*Interface*) für die Helix-Helix-Interaktion des BACE1-Dimers identifiziert werden, was zu zwei alternativen Hypothesen führte:

(I) Es muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass es keine spezifische Interaktion zwischen zwei BACE1-Transmembransequenzen gab.

(II) Die Transmembranhelices von BACE1 sind in der Lage, nicht eine, sondern zwei Interaktionsflächen auszubilden, was die Beobachtung von BACE1-Tetrameren nach nicht-reduzierender SDS-PAGE und Kupferbehandlung erklären würde. Falls es zwei Interaktionsflächen in der TMS gäbe, wäre bei Annahme einer gewissen Flexibilität der Helices eine Kreuzvernetzung in nahezu jeder Position möglich. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde eine halbe Helixwindung vor und hinter dem für die Dimervernetzung essentiellen Cys466 jeweils ein weiterer Cys-Rest eingefügt (A464C und L468C, 3.5.2).

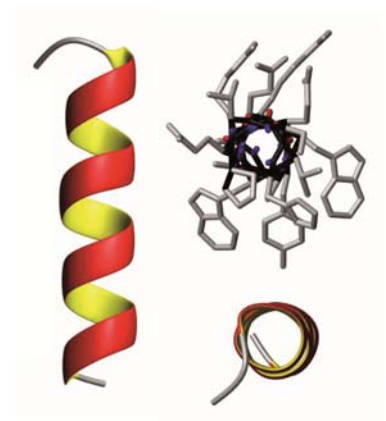


Abb. 44: Modelle einer α -Helix

Die Modelle zeigen verschiedene Darstellungsweisen einer α -Helix. Links, Seitenansicht im Bändermodell ohne Seitenketten; rechts unten, Bändermodell ohne Seitenketten in der Aufsicht; rechts oben, Aufsicht mit den nach außen zeigenden Seitenketten im Stabmodell.

Quelle: en.citizendium.org

Tatsächlich zeigten diese Mutanten die neue Eigenschaft, dass sich durch Kupferbehandlung nicht nur Dimere reduktionsstabil kreuzvernetzen ließen, sondern auch Trimere und Tetramere. Folglich wäre das Dimer, das man nach Kreuzvernetzung von BACE1 wt im Western Blot beobachten konnte, nicht das gleiche Dimer, welches die A464C/C466A-Mutante bildete, da Ala464 verglichen mit Cys466 auf der entgegengesetzten Seite der TM-Helix liegt und die Seitenketten vom Zentrum der Helix weg zeigen (Abb. 45).

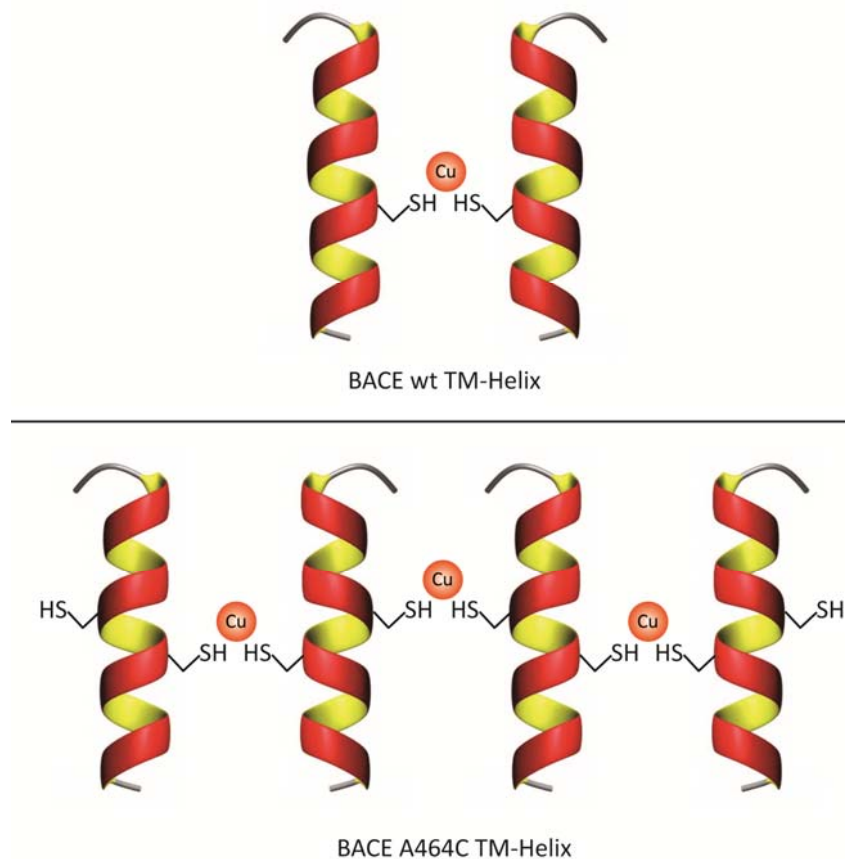


Abb. 45: Schematische Darstellung der Kreuzvernetzung von BACE1 wt und A464C

BACE1 wt wird durch Kupferbehandlung über Cys466 in der TM-Helix kreuzvernetzt (oben). Das Einführen eines zusätzlichen Cys-Restes auf der entgegengesetzten Seite der Helix bei der Mutante A464C ermöglicht die Kreuzvernetzung zu reduktionsstabilen Trimeren und Tetrameren (unten).

4.1.3 Das AxxxAxxxA-Motiv und ein Strukturmodell

Unabhängig von der Metallbindung unter Beteiligung von Cys466 stellte sich die Frage, welche Motive innerhalb der BACE1-TMS an einer Homointeraktion teilnehmen. Da es in der Literatur keine Beispiele für Proteine gibt, in denen Helix-Helix-Interaktionen unter Beteiligung von M/CxxxM/C-Motiven stattfinden – solche und ähnliche Motive kommen vor allem in Metallbindungsstellen von löslichen Proteinen bzw. hydrophilen Bereichen von Membranproteinen vor –, wurde die TMS in Hinblick auf alternative Interaktionsmotive analysiert. Dabei konnte ein AxxxAxxxA-Motiv in der BACE1-TMS identifiziert werden, welches sich von Ala457 bis Ala467 erstreckt und mit dem MxxxCxxxMxxxC-Motiv interkaliert vorliegt (grau unterlegt in Abb. 16). Motive der Form GxxxG(xxxG), in denen die Gly-Reste auch gegen andere kleine Aminosäurereste wie Ala und Ser ausgetauscht sein können, sind gut charakterisierte TMS-Interaktionsmotive. Unter den zahlreichen Beispielen in der Literatur finden sich so unterschiedliche Proteine wie APP (Munter 2007), Ctr1 (Aller 2004), p75^{NTR} (Vilar 2009) und Aquaporin-1 (Murata 2000). Das bestuntersuchte Modell-Protein für ein GxxxG-Motiv ist allerdings das Typ I-Transmembranprotein Glycophorin A (Lemmon 1992; Engelman 1993; Lemmon 1994; MacKenzie 1997; Brosig 1998; Russ 2000; Senes 2000), dessen Struktur zunächst im Computermodell berechnet und dann per NMR bestätigt werden konnte.

In Kooperation mit Dr. Peter Hildebrand (Charité – Universitätsmedizin Berlin) konnte abgeleitet vom GxxxG-Motiv im Glycophorin A ein energieminiertes, validiertes Modell der BACE1-TMS berechnet werden, bei dem das zentrale Interaktionsmotiv das A₄₅₉XxxxA₄₆₃XxxxA₄₆₇-Motiv darstellt (Abb. 46). Obwohl es keine Sequenzhomologie zwischen Glycophorin A und der BACE1-TMS gibt, kann davon ausgegangen werden, dass das AxxxAxxxA-Motiv aufgrund seiner typischen Sequenz-Struktur-Beziehung eine ähnliche Geometrie und Helix-Helix-Anordnung annimmt (Senes 2004). Im berechneten Modell haben die Peptidrückgrate bei Ala463 die größte Nähe zueinander (3,7 Å) und der Kreuzungswinkel der rechtshändigen Helix-Packung (Walters 2006) beträgt 34°. In Übereinstimmung mit der metallvermittelten Kreuzvernetzung befinden sich in dieser hypothetischen Dimer-Anordnung die Seitenketten der Cys466-Reste einander zugewandt und in geringem Abstand, so dass ein Metallion die Verbrückung herstellen kann. Mögliche Rotamere der Cys-Seitenkette erhöhen zusätzlich die Bindungsmöglichkeiten.

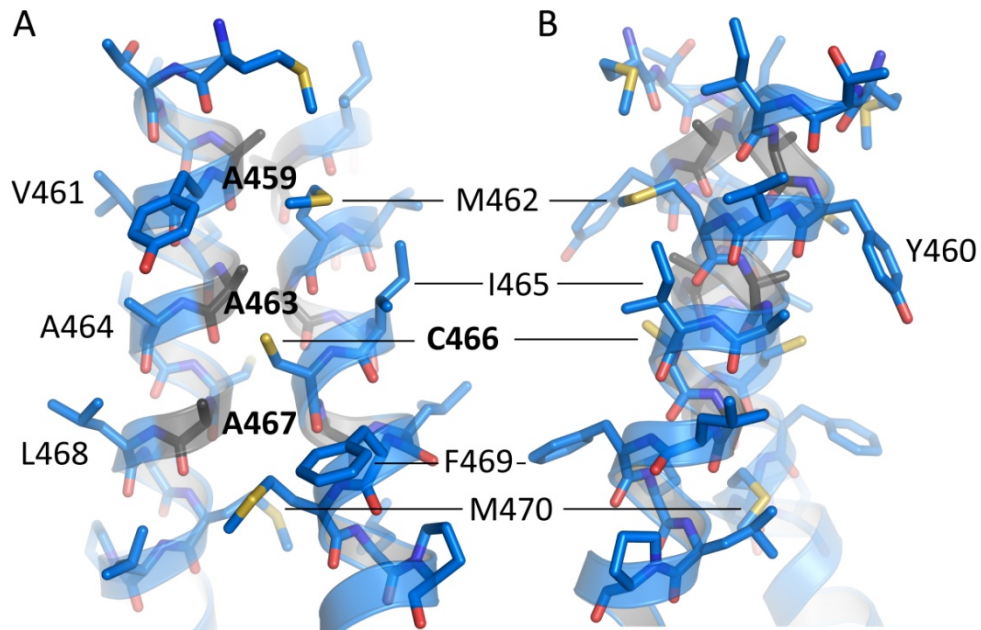


Abb. 46: Strukturmodell der Helix-Helix-Interaktion der BACE1-TMS

Dargestellt sind zwei verschiedene Blickwinkel (A und B) auf das Strukturmodell einer rechtshändigen Helix-Packung der dimerisierten BACE1-TMS. Der Torsionswinkel zwischen den Helices beträgt 34° , der Abstand bei Ala463 beträgt $3,7 \text{ \AA}$. Erstellt wurde das Modell mit Hilfe des *Swiss PDB Viewer* und energetisch minimiert mittels GROMACS. Nummeriert sind die TM-Aminosäurereste 459 bis 470. Schwarz, Ala-Reste des AxxxAxxxA-Motivs; blau, Kohlenstoff; rot, Sauerstoff; gelb, Schwefel.

Für die Bildung einer weiteren Interaktionsfläche, die an der Bildung des Tetramers beteiligt sein könnte, wäre eine weitere rechtshändige Helix-Packung, die auf das Dimer aufbaut, möglich. Unklar ist hier allerdings, welche AS-Reste daran beteiligt sein würden und welche Rolle dabei das MxxxCxxxM-Motiv im Zusammenspiel mit Metallionen einnehmen würde (4.1.1).

4.1.4 Die Homodimerisierung von BACE1 in lebenden Zellen

Mit Hilfe der FLIM-FRET-Technik konnte gezeigt werden, dass BACE1-Dimere in der Plasmamembran von lebenden Zellen bildet (3.3). Somit konnte ein wichtiges Indiz erbracht werden, dass die BACE1-Dimerisierung *in vivo* eine Rolle bei der Regulation der β -Sekretase-Aktivität oder Substraterkennung spielen könnte. Die gemessene Dimerisierung wurde weder durch die Abwesenheit des kreuzvernetzbaaren Cys466 noch durch die kupfervermittelte Kreuzvernetzung beeinflusst, was zwei Schlussfolgerungen zulässt:

(I) Die Dimerisierung von BACE1 in lebenden Zellen ist nicht oder zumindest nicht ausschließlich vom Cys466 in der TMS abhängig. Es kann die Hypothese aufgestellt werden, dass analog zum APP mehrere Dimerisierungsstellen im BACE1-Molekül vorhanden sind. Im Falle des APP ist sowohl die Ektodomäne, als auch die TMS an der Dimerisierung beteiligt, wobei der Beitrag der schwächeren TMS-Wechselwirkungen für die Dimerisierung des Volllängen-APP nicht essentiell ist (Scheuermann 2001; Soba 2005; Munter 2007; Kaden 2008). Eine ähnliche Rolle könnten das AxxxAxxxA-Motiv und/oder das MxxxCxxxM-Motiv der BACE1-TMS einnehmen, indem diese TMS-Motive die durch die

Ektodomäne vermittelte Dimerisierung stabilisieren. Die postulierten Wechselwirkungen der TMS scheinen auch hier für die Dimerisierung nicht notwendig zu sein, da Westmeyer et al. durch native Gelelektrophorese (*blue native gel*, BN-PAGE) zeigen konnten, dass BACE1, welches über eine C-terminale poly-Ala-Kette oder einen Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker mit der Membran verbunden war, immer noch Dimere bilden konnte (Westmeyer 2004). Im Kontrast dazu wurde in der gleichen Studie allerdings gezeigt, dass die BACE1-Ektodomäne alleine (BACE1-NT) selbst in BN-PAGE ausschließlich als Monomer migrierte, für die Dimerisierung also offenbar die Membranständigkeit nötig war. Dieser Widerspruch wird in zukünftigen Studien aufzulösen sein, indem die genauen Interaktionsstellen des BACE1-Dimers und deren energetische Beiträge zur Bindung aufgeklärt werden. Die bisherigen Befunde sprechen dafür, dass der Hauptbeitrag der homophilen Interaktion von der richtig orientierten Ektodomäne ausgeht und die Interaktion der TMS stabilisierend wirkt.

(II) Da die kupfervermittelte Kreuzvernetzung die gemessene FRET-Effizienz nicht erhöht, werden offenbar nur BACE1-Dimere kreuzvernetzt, die ohnehin in der Plasmamembran vorhanden sind. Die Dimerisierung wird also nicht durch Kupfer induziert, sondern lediglich stabilisiert. Dabei ist es allerdings nicht möglich, eine genaue Aussage über den wahren Anteil von BACE1-Dimeren gegenüber Monomeren zu treffen. Da die FRET-Effizienz nicht nur vom Anteil der FRET-Aktiven BACE1-CFP/BACE1-YFP-„Heterodimere“, sondern auch von deren genauen Abstand und Orientierung zueinander abhängig ist, liefert der Wert der FRET-Effizienz nur qualitative Aussagen über eine stattfindende Interaktion. Die Abschätzung des Monomer/Dimer-Verhältnisses nach kupfervermittelter Kreuzvernetzung im Western Blot ist ebenfalls fehlerbehaftet, da die Effizienz der Vernetzungsreaktion unbekannt ist. Während beispielsweise die Behandlung der BACE1-transfizierten Zellen mit 100 μM CuCl_2 zu einem BACE1-Dimer-Anteil von 30-50% nach reduzierender SDS-PAGE führte (für Beispiele siehe Abb. 11 oder Abb. 22), demonstrierten Westmeyer et al. eine BACE1-Dimerisierung von 100% durch BN-PAGE (Westmeyer 2004). Hier wird zu klären sein, inwiefern diese Diskrepanz durch unterschiedliche Präparationsmethoden zustande kommt; jedoch scheint es vor dem Hintergrund der Kreuzvernetzungsexperimente und der mäßig hohen FRET-Effizienz unwahrscheinlich zu sein, dass in lebenden Zellen 100% der BACE1-Menge als Dimer vorliegen. Vielmehr legt die Messung einer erhöhten APP-Spaltung durch stabil kreuzvernetzte BACE1-Dimere (siehe nächster Abschnitt) nahe, dass in der Membran von lebenden Zellen ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Monomeren und Dimeren/Oligomeren herrscht.

4.1.5 Der Einfluss der BACE1-Dimerisierung auf die BACE1-Aktivität und die APP-Spaltung

In Hinblick auf die Alzheimer-Krankheit ist die zentrale Frage, ob die BACE1-Dimerisierung einen Einfluss auf die APP-Spaltung hat. Zunächst konnte nach kupfervermittelter Kreuzvernetzung von BACE1-6H im *in vitro*-Aktivitätstest, bei dem ein kurzes, Fluorophor-gekoppeltes Peptid mit APPswe-Schnittstelle als Substrat diente, kein signifikanter Unterschied zum unbehandelten BACE1 registriert werden. Die Dimerstabilisierung hatte also offenbar keinen Einfluss auf dessen grundlegende proteolytische Aktivität (3.6.1).

Im Gegensatz dazu konnte mit Hilfe eines zellbasierten Aktivitätstests, bei dem nach Co-Transfektion von BACE1 und APP in HEK293T-Zellen die produzierte sAPP β -Menge im Western Blot quantifiziert wurde, gezeigt werden, dass die APP-Spaltung durch die kupfervermittelte Dimerstabilisierung von BACE1 erhöht wurde (3.6.2). Da die Kupferbehandlung die zelluläre Lokalisation von BACE1 nicht veränderte (Daten nicht gezeigt), aber auch die Proteinstabilität des BACE1-Dimers gegenüber dem Monomer gleich blieb (3.7), scheiden diese Erklärungen für den beobachteten Effekt aus. Die Möglichkeit, dass die zur Kreuzvernetzung eingesetzte Kupfermenge einen Effekt auf die Zellen oder das APP hatte, wurde durch die parallele Co-Transfektion der vernetzungsdefizienten C466A-Mutante mit APP ausgeschlossen. Unklar ist lediglich, ob die feste Stabilisierung des BACE1-Dimers die Sublokalisierung innerhalb der Membran (*Lipid Rafts*, *Liquid-Ordered Phase*) beeinflusste. Durch den Austausch der BACE1-TMS gegen einen GPI-Anker konnten Cordy et al. zeigen, dass die resultierende Verstärkung der *Lipid Raft*-Lokalisation von BACE1 die APP-Spaltung erhöhte, und auch Eehalt et al. konnten die *Lipid Raft*-Abhängigkeit der APP-Spaltung demonstrieren (Cordy 2003; Eehalt 2003).

Eine andere Erklärung für den beobachteten Effekt könnte in der Tatsache liegen, dass das Substrat APP ebenfalls Dimere bilden kann. Wird nun durch die kupfervermittelte Kreuzvernetzung das dynamische Gleichgewicht zwischen BACE1-Monomer und -Dimer zu Gunsten des Dimers blockiert, erhöht sich möglicherweise die Wahrscheinlichkeit, dass ein BACE1-Dimer in der Membran auf ein dimeres APP-Molekül trifft, was die Spaltungseffizienz erhöhen würde. Vor dem Hintergrund dieser Hypothese könnte ein therapeutischer Ansatz darin bestehen, nach Bedingungen oder Interaktionspartnern zu suchen, die die BACE1-Dimerisierung inhibieren und auf diese Weise die β -sekretorische APP-Spaltung verringern.

4.2 BACE1 und der Kupferstoffwechsel

Um eine mögliche Rolle von BACE1 im Kupferstoffwechsel *in vivo* zu untersuchen, wurden transgene Fliegen erzeugt, die humanes BACE1 exprimierten (3.8). Es zeigte sich, dass die BACE1-Expression die Überlebenschance von Ctr1B ^{-/-} Fliegen unter Kupfermangelbedingungen (BCS-haltige Nahrung) von 0% (nicht lebensfähig) auf rund 5% erhöhte. Für diese Beobachtung lassen sich zwei mögliche Hypothesen formulieren:

(I) Humanes BACE1 interagiert mit anderen Komponenten des Kupferstoffwechsels wie Kupferchaperonen oder dem für den Import zuständigen Kupfertransporter Ctr1A und stimuliert so die endogene Kupferaufnahme der Fliegen, was deren Überleben unter Kupfermangelbedingungen mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit ermöglicht.

(II) Humanes BACE1 selbst kann auf bisher unbekannte Weise einen Kupferimport ermöglichen. Hierfür sind grundsätzlich zwei Wege denkbar. Zum einen könnte BACE1 analog zum Transferrin-Rezeptor, welcher das eisenbeladene Transferrin bindet, gebundenes Metall per Endozytose aufnehmen (Ciechanover 1983). Zum anderen könnte BACE1 durch Oligomerisierung und unter Beteiligung seiner postulierten Metallbindungsstelle(n) in der TMS (4.1.1) möglicherweise eine Pore formen, um analog zum Ctr1 Kupfer durch die Membran ins Zytosol zu schleusen. Für die erste Möglichkeit spricht hier, dass die TM-Mutante CMCMCCC (C466/474/478/482/485A, M470/476A), der ein Großteil der Cys- und Met-Reste der TMS fehlten, offenbar trotzdem noch einem Teil der Fliegen das Überleben ermöglichte (rund 2%). Die Überlebensrate dieser Fliegen ist allerdings um mehr als die Hälfte gegenüber den Fliegen mit BACE1 wt-Expression verringert, was auf eine Funktion der Cys- und Met-Reste der TMS hindeutet. Außerdem würde zu der Kanal-Hypothese passen, dass die Aminosäuren der TMS für Metallionen zugänglich sind und BACE1 mittels C-terminalen Teils mit dem Kupferchaperon CCS interagieren kann. Beim Kupferimport durch Ctr1 erfüllen ebenfalls Kupferchaperone die wichtige Rolle, die importierten Kupferionen im Zytosol aufzunehmen. Allerdings besitzt Ctr1 drei Transmembranhelices und bildet ein Trimer, so dass für die Kanalbildung insgesamt neun Transmembranhelices zur Verfügung stehen (Aller 2004; De Feo 2009). Selbst wenn BACE1 also *in vivo* Tetramere bilden sollte, wie im Zuge dieser Arbeit beschrieben, hätte es dennoch nur vier TM-Helices. Ob diese ausreichen, um eine funktionelle Pore zu bilden, ist fraglich. Eine weitere Analogie zum Import durch Ctr1 könnte die notwendige Reduktion von Cu(II) zu Cu(I) sein, die im Falle vom menschlichen Ctr1 möglicherweise von Mitgliedern der Steap-Familie durchgeführt wird (siehe 2.4.2). Die Ergebnisse der BCS- und der KMnO₄-Behandlung (3.1.2) deuten darauf hin, dass auch für die feste Bindung von Kupfer in der BACE1-TMS eine Reduktion zu Cu(I) nötig ist.

Auf welche Weise BACE1 in den Kupferstoffwechsel der Fliegen oder auch in menschlichen Zellen eingreift, wird durch weitere Studien eingehend zu untersuchen sein.

4.3 BACE1 und der Abbau von A β

Führt man einen ELISA zur Quantifizierung von A β nach Co-Transfektion von HEK293T-Zellen mit APP und BACE1 durch, stößt man auf das Phänomen, dass sich im ELISA weniger A β nachweisen lässt als bei einem parallelen Ansatz, in dem nur APP transfiziert wurde. Obwohl die Überexpression von BACE1 zu einem Vielfachen der amyloidogenen APP-Spaltung führt, was sich durch Quantifizierung der freigesetzten sAPP β -Menge bestätigen lässt, ist die produzierte A β -Menge scheinbar kleiner. Die Erklärung hierfür liegt in der Tatsache begründet, dass BACE1 *in vitro* bzw. im Zellkultursystem nicht nur APP spaltet, sondern auch A β (Fluhrer 2003; Shi 2003).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass neben den publizierten Spaltstellen C-terminal der Aminosäuren 34 und 20 noch eine weitere nach Aminosäure 15 in der A β -Sequenz existiert. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass das durch den γ -Sekretase-Schnitt von Zellen freigesetzte A β von BACE1 abgebaut werden kann. Im Kontrast dazu wurde synthetisches, dem Medium hinzugesetztes, A β von membranständigem BACE1 nicht mehr signifikant gespalten. Möglicherweise ist es für die Spaltung durch BACE1 notwendig, dass die A β -Peptide noch in Membrannähe bzw. membranassoziiert vorliegen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass BACE1 bevorzugt Substrate spaltet, die eine α -helikale Konformation besitzen, während bereits freigesetztes bzw. synthetisches A β eine Umfaltung in eine β -Faltblatt-Struktur durchlaufen (Soto 1995). Darüber hinaus benötigt die Aspartat-Protease BACE1 für die enzymatische Aktivität einen sauren pH-Wert, der im zellulären System nur nach Endozytose von Enzym und Substrat in den sauren Endosomen erreicht werden kann. Der Einsatz des Endozytose-Inhibitors „Dynasore“ (Macia 2006; Thompson 2006) verhinderte die A β -Produktion aus SPA4CT, so dass zumindest in den verwendeten HEK293T-Zellen die γ -Sekretase-Aktivität ebenfalls endozytoseabhängig zu sein schien (siehe 3.9, Abb. 40). Dies könnte darauf hindeuten, dass die A β -Peptide durch BACE1 dort in Endosomen gespalten wurden, wo sie durch die γ -Sekretase entstanden.

Ein interessantes Indiz für eine A β -Abbaufunktion von BACE1 *in vivo* könnte der Befund darstellen, dass eine erhöhte BACE1-Aktivität in der Umgebung von amyloiden Plaques existiert (Zhao 2007). Eine Ursache hierfür könnte sein, dass einerseits die Kombination aus A β und Cu(II) in den Plaques oxidativen Stress durch ROS verursacht (Huang 1999; Apelt 2004), und andererseits oxidativer Stress die BACE1-Expression erhöht (Tamagno 2002; Tamagno 2008). Dies könnte also als Abwehrversuch gegen die Quelle des oxidativen Stresses interpretiert werden. Letztlich befördert die Erhöhung der BACE1-Expression allerdings die A β -Produktion noch zusätzlich, so dass nach der Hypothese von Zhao et al. eine positive Rückkopplungsschleife vorliegt, die das Fortschreiten der Alzheimer-Pathologie beschleunigt (Zhao 2007). Unklar bleibt, ob die Spaltung von A β durch BACE1 *in vivo* stattfindet, und ob zelluläre Bedingungen existieren, bei denen BACE1 verstärkt den Abbau von A β im Vergleich zur A β -Produktion fördert, was sich positiv auf die Alzheimer-Pathologie auswirken würde.

4.4 Konklusion und Ausblick

Neben der Modulation der γ -Sekretase (Wolfe 2008) ist die Inhibition der β -Sekretase BACE1 eine der vielversprechendsten therapeutischen Strategien, um Alzheimer-Patienten zu behandeln bzw. den Ausbruch der Alzheimer-Krankheit zu verhindern (Ghosh 2008). In der vorliegenden Arbeit konnten eine Reihe von strukturellen und funktionellen Aspekten von BACE1 beschrieben werden, die es in Zukunft ermöglichen könnten, die Zellbiologie von BACE1 und die Regulation der β -Sekretase-Aktivität besser zu verstehen. Dies wiederum könnte die Entwicklung von besseren, nebenwirkungsfreiere, BACE1-Inhibitoren oder -Modulatoren ermöglichen.

Die präsentierten Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass Aufbau und Funktion von BACE1 komplexer als bisher angenommen sind. So konnte gezeigt werden, dass BACE1 in der Plasmamembran von lebenden Zellen Dimere bildet, und dass durch den Einsatz einer bisher unbekanntem kupfervermittelten Kreuzvernetzungsreaktion BACE1-Dimere und -Tetramer isoliert werden können (Abb. 47). Möglicherweise findet *in vivo* also eine Oligomerisierung statt, die über die Dimerisierung hinausgeht. Durch Mutationsanalyse und den Einsatz von Cu(II) und verschiedenen anderen Metallionen wie Ag(I) und Pd(II) stellte sich heraus, dass Cys466 in der ungewöhnlichen Transmembransequenz von BACE1 die zentrale Rolle für die beobachtete Kreuzvernetzung spielt. Aus diesen Experimenten konnte gefolgert werden, dass die Kreuzvernetzung von BACE1-Oligomeren das Resultat einer Chelatierung durch das metallbindungsstellenähnliche $M_{462}xxx C_{466}xxx M_{470}$ -Motiv ist. Während frühere Studien den Fokus vor allem auf die katalytische Funktion der BACE1-Ektodomäne oder die regulatorischen Funktionen des kurzen zytosolischen Parts (Palmitoylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung) legten, wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals eine detaillierte Untersuchung der BACE1-TMS vorgenommen. Dies führte zur Identifizierung des $A_{459}xxx A_{463}xxx A_{467}$ -Motivs, welches typisch für Helix-Helix-Interaktionen innerhalb der Membran ist, das mit dem $M_{462}xxx C_{466}xxx M_{470}$ -Motiv interkaliert vorliegt und auf dessen Basis ein Strukturmodell eines möglichen BACE1-TMS-Dimers berechnet werden konnte.

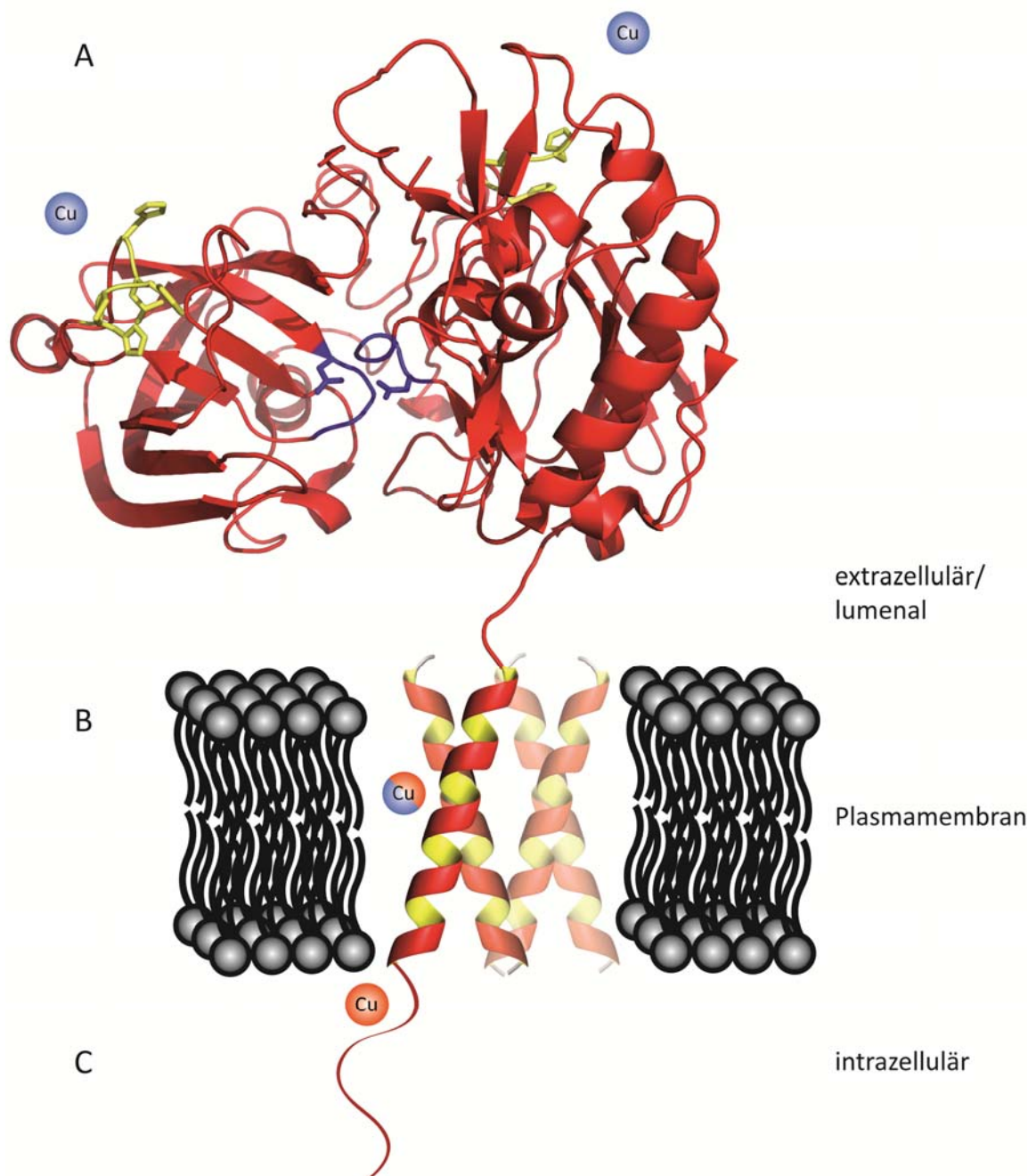


Abb. 47: Schematischer Überblick über den strukturellen Aufbau von BACE1 und dessen Kupferbindungseigenschaften

Die schematische Darstellung zeigt den nicht maßstabsgetreuen strukturellen Aufbau von BACE. Der Übersichtlichkeit halber wurden nur eine Ektodomäne und ein intrazellulärer Teil des BACE1-Oligomers dargestellt.

Die Struktur der Ektodomäne (A) wurde der Proteindatenbank entnommen und mit PyMol modifiziert (*PDB entry 2wjo*, AS 58-460 (Nicholls 2010)); blau, aktives Zentrum mit D₉₃ und D₂₈₉; gelb, Kupferbindungsstellen H₁₀₆xxxH₁₁₀ und H₄₂₁xH₄₂₃. Extrazellulär liegt Kupfer als Cu(II) vor (blaue Kugeln).

Die TM-Helices (B) von BACE1 interagieren und bilden wahrscheinlich Dimere und Tetramere per rechtshändige Helix-Packung. Die Cys466-Reste der Transmembransequenzen formen eine Metallbindungsstelle, die Cu(II) und Cu(I) (mit Präferenz für Cu(II)) koordinieren (blau-orange Kugel). Möglicherweise gibt es hier eine Redox-Aktivität, die Cu(II) zu Cu(I) reduziert.

Der kurze, intrazelluläre Teil (C) beinhaltet die Cu(I)-Bindungsstelle C₄₇₈xxxC₄₈₂xxxC₄₈₅; Cu(I), orange Kugel.

Die Tatsache, dass BACE1 sowohl mit der Ektodomäne als auch innerhalb der TMS und im Zytosol Kupferionen binden kann, führte zu der Hypothese, dass BACE1 eine Funktion in der zellulären Kupferhomöostase übernimmt oder durch Kupfer reguliert wird. Ein Indiz für eine mögliche Rolle im Kupferstoffwechsel lieferte das *in vivo*-Modell *D.melanogaster*. Es konnte gezeigt werden, dass unter Kupfermangelbedingungen Fliegen mit einem Ctr1B $-/-$ Hintergrund nur überlebten, wenn sie als Transgen humanes BACE1 exprimierten. Dies war ein deutliches Indiz dafür, dass BACE1 direkt oder indirekt die Kupferaufnahme der Fliegen stimulieren konnte.

Zusammengefasst eröffnen die gezeigten Befunde eine neue Sichtweise auf die β -Sekretase BACE1, die offenbar mehr ist als eine membrangebundene Aspartat-Protease. Stattdessen könnte BACE1 als oligomerer, dynamischer Komplex mit einer funktionellen und interagierenden Transmembransequenz verstanden werden. Neben der proteolytischen Aktivität bindet der Komplex Metallionen und könnte eine Rolle im Kupferstoffwechsel einnehmen.

Zukünftige Studien werden klären, wie die Struktur der Kupferbindungsstellen in Ektodomäne, TMS und zytosolischem Teil aussieht und welche Funktion die Bindung der Kupferionen *in vivo* erfüllt. Außerdem wird zu untersuchen sein, wie das dynamische Gleichgewicht zwischen BACE1-Monomer, -Dimer und -Tetramer in lebenden Zellen reguliert wird, wo die Interaktionsstellen liegen und welche Bedeutung die Oligomerisierung für die BACE1-Aktivität hat. Da im Zellkultursystem gezeigt werden konnte, dass die stabile Kreuzvernetzung von BACE1-Oligomeren zu einer erhöhten APP-Spaltung im Vergleich zu unbehandeltem BACE1 führte, lässt sich schlussfolgern, dass die Oligomerisierung von BACE1 einen stimulierenden Einfluss auf dessen β -Sekretase-Aktivität ausübt. Die Störung der BACE1-Oligomerisierung stellt demnach ein neues therapeutisches Ziel dar, um die β -sekretorische Aktivität zu modulieren und eine der Ursachen der Alzheimer-Krankheit zu bekämpfen. Darüber hinaus könnte ein therapeutischer Ansatz darin bestehen, die mögliche A β -Abbaufunktion von BACE1 gegenüber der A β -Produktion (N-terminale APP-Spaltung) zu unterstützen, indem die BACE1-Schnittstelle im APP durch spezifische Antikörper (Arbel 2005; Thomas 2006), RNA-Aptamere (Tuerk 1990; Rahimi 2010) oder andere Substanzen blockiert wird.

5 MATERIAL UND METHODEN

5.1 Geräte

5.1.1 Elektrophorese und Elektroblot

- Vertikal-Elektrophorese-System für Minigele Mini-PROTEAN Tetra Cell (Biorad, USA)
- Vertikal-Elektrophorese-System für Fertiggele XCell SureLock (Invitrogen, USA)
- Tankblot-Apparatur Transblot-Cell (Biorad, USA)
- Horizontal-Elektrophorese-System für Agarose-Gele (Selbstanfertigung am ZMBH, Universität Heidelberg)
- Strombereitstellungsgeräte: Electrophoresis Power Supply EPS 301 (Amersham, USA), Power Supply 2000/200 (Biorad, USA)

5.1.2 Zellkultur

- Begasungsbrutschrank Hera Cell 240 (Heraeus-Kendro, USA)
- Lichtmikroskop Axiovert 135 (Zeiss, Deutschland)
- Sterile Werkbank Herasafe (Heraeus-Kendro, USA)
- Casy Cellcounter DT (Innovatis, Deutschland)
- Wasserbad (GFC, Deutschland)

5.1.3 Zentrifugen

- Tischzentrifuge 5417R, kühlbar (Eppendorf, Deutschland)
- Zellzentrifuge Megafuge 1.0 (Heraeus-Kendro, USA)
- Tischzentrifuge Biofuge fresco, kühlbar (Heraeus-Kendro, USA)
- Zellzentrifuge Multifuge 3 S-R (Heraeus-Kendro, USA)
- Kühlzentrifuge GS-6KR (Beckman, USA)
- Ultrazentrifuge J2-MC (Beckman, USA)

5.1.4 Chromatographie

- Mini Leer-Säulen (Biorad, USA und Bakerbond, J.T.Baker, USA)

5.1.5 Sonstige Geräte

- Vakuumkonzentrator SpeedVac (Savant, USA)
- Kühlfalle RVT400 Thermo (Savant, USA)
- Vakuumpumpe (Vacuubrand, Wertheim)
- Analysenwaage BP 211D (Sartorius, Göttingen)

- Fluoreszenzlesegerät Synergy2 Multi-Mode Microplate Reader (Biotek, Bad Friedrichshall)
- Überkopf-Schüttler Reax 2 (Heidolph, Schwabach)
- Schütteltisch CAT ST5 (Neolab, Heidelberg)
- ELISA Waschkamm (Nunc, Dänemark)
- Thermomixer Comfort (Eppendorf, Deutschland)
- PCR-Maschine Mastercycler (Eppendorf, Deutschland)
- Photometer SmartSpec 3000 (Biorad, USA)
- Brutschrank für Bakterienkultur (Memmert GmbH, Deutschland)
- Geldokumentation AlphaImager 2200 (Biozym, Deutschland)
- ChemiSmart (PeqLab, Deutschland)
- Entwicklermaschine Cawomat 2000 IR (Cawo, Deutschland)
- Spektrophotometer Nanodrop1000 (Thermo Scientific/PeqLab, Deutschland)
- Massenspektrometer Bruker UltraFlexII, MALDI-TOF-Massenspektrometer mit Reflektor (Bruker Daltonic, Deutschland)
- Konfokales Mikroskop Fluoview 1000 (Olympus, Japan)
- Notebook Dell D830 (Dell, USA)
- Kaffeemaschine PrimaDonna (DeLonghi, Italien)

5.2 Software

- Microsoft Office (Microsoft, USA)
- Adobe Creative Suite 3 (Adobe, USA)
- PyMol 1.1eval (DeLano Scientific, USA)
- Bio1D (PeqLab, Deutschland)
- FlexControl, FlexAnalysis (Bruker, Deutschland)
- GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., USA)
- Mikroskop-Software (Olympus, Japan)
- SymphoTime (PicoQuant, Deutschland)

5.3 Verbrauchsmaterial

- Nitrozellulosemembran Porablot NCP, Porenweite 0,45 µm (Macherey-Nagel, Deutschland)
- Filterpapier Whatman 3MM (Whatman International Ltd., GB)
- Röntgenfilme (Konica Minolta/Hartenstein, Deutschland)
- Ni-NTA-Agarose (Qiagen, Deutschland)
- Sterilfilter, Minisart, Porengröße 0,2 µm (Sartorius, Deutschland)
- Sterilfilter, 500 ml Steritop 0,22 µm (Millipore, Deutschland)

- Schraubdeckelröhrchen, 15 ml und 50 ml (Sarstedt, Deutschland und BD, USA)
- Reaktionsgefäße; 0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml (Sarstedt, Deutschland)
- C4 und C18 ZipTips (10 µl) für MS-Probenpräparation (Millipore, Deutschland)
- Amicon Ultra Zentrifugenfiltrerröhren, 30.000 MWCO, 4 und 15 ml (Millipore, Deutschland)
- Microcon Zentrifugen-Filter, 3.000 und 30.000 MWCO (Millipore, Deutschland)
- JustSpin Gel Extraction columns (Genaxxon, Deutschland)
- Petri-Schalen (Greiner *bio-one*, Österreich)
- Pipettenspitzen (Steinbrenner, Deutschland)

5.4 Chemikalien

- Acetonitril (Sigma-Aldrich, USA)
- Acrylamid Rotiphorese GEL 30, 30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid (Roth, Deutschland)
- Agar (BD, USA)
- Agarose (Invitrogen, USA)
- Ampicillin (Roth, Deutschland)
- Ascorbinsäure (Sigma-Aldrich, USA)
- Bromphenolblau (Serva, Deutschland)
- BSA (NEB, USA)
- Dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich, USA)
- Entwickler und Fixierer für Röntgenfilme (Unimatic, Calbe Fotochemie GmbH, Deutschland)
- Hefe-Extrakt (BD, USA)
- Imidazol (Sigma-Aldrich, USA)
- Kobaltchlorid CoCl_2 (Roth, Deutschland)
- Kupferchlorid CuCl_2 (Sigma-Aldrich, USA)
- Magermilchpulver frema Reform (Granovita, Deutschland)
- Manganchlorid MnCl_2 (Sigma-Aldrich, USA)
- β -Mercaptoethanol (Merck, Deutschland)
- Nickelsulfat NiSO_4 (Sigma-Aldrich, USA)
- Palladiumacetat PdAc_2 (Geschenk von Prof. Abram, FU Berlin)
- Precision Plus Protein Marker, *prestained* (Biorad, USA)
- Polyethylenimin (Sigma-Aldrich, USA)
- Quecksilberchlorid HgCl_2 (Roth, Deutschland)
- SDS (Merck, Deutschland)
- Silbernitrat AgNO_3 (Sigma-Aldrich, USA)
- TEMED (Pharmacia, Schweden)
- Trifluoacetat (Sigma-Aldrich, USA)

- Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA)
- Trypton (BD, USA)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, USA)
- Zinkchlorid ZnCl_2 (Sigma-Aldrich, USA)

Alle gängigen Chemikalien wurden in p.A. Qualität von den Herstellern Merck (Deutschland), Roth (Deutschland) oder Sigma-Aldrich (USA) bezogen. Sämtliche Restriktionsenzyme und Restriktionspuffer wurden von New England Biolabs (NEB, USA) bezogen.

5.5 Verwendete DNA-Konstrukte, Klonierungen und Mutagenese

5.5.1 Verwendete Bakterienmedien und -stämme

Bakterienmedien :	<u>LB (« Light Broth »)</u>	<u>SOC</u>
	Hefeextrakt 5 g	Hefeextrakt 5 g
	Trypton 10 g	Trypton 20 g
	NaCl 10 g	NaCl 0,5 g
	H ₂ O ad 1 l	KCl 0,19 g
		Glucose 20 mM
		mit NaOH auf pH7
		H ₂ O ad 1 l

Für LB-Agar-Platten wird pro Liter 20 g Agar hinzugefügt. Das Ampicillin bzw. Kanamycin zur Selektion (Endkonzentration 100 µg/ml) wird erst nach dem Autoklavieren und Abkühlen hinzugegeben.

Zur Selektion und Vermehrung von Plasmiden wurde der *Escherichia coli*-Stamm *α-Select* oder *CH3* (Bioline, Deutschland) verwendet. Sie wurden jeweils gemäß der Herstellerangaben per Hitzeschock bei 42°C für 30 s transformiert.

5.5.2 Verwendete DNA-Vektoren

Für alle Klonierungen wurden die eukaryotischen Expressions-Vektoren pcDNA3+/G418 und pcDNA3.1+/Zeocin von Invitrogen verwendet, wobei die Originalvektoren noch durch die Insertion der Gateway-Kassette (Gateway-Klonierungssystem, Invitrogen, USA) modifiziert wurden. Neben einer *Multiple Cloning Site* (MCS) und einem Cytomegalovirus-Promotor (CMV) für die Expression des insertierten Gens enthalten die rund 5,0 kbp großen Vektoren ein Gen für Ampicillin-Resistenz für die Selektion der transformierten Bakterien. Zur Sequenzierung wurden neben zwei sequenzspezifischen BACE1-Primern folgende Standardprimer verwendet: T7, M13fw (*forward*), M13rev (*reverse*) und BGHrev.

5.5.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR), Mutagenese und Mutagenese-Kit

Für sämtliche PCR-Reaktionen, die der Klonierung von DNA-Fragmenten oder der zielgerichteten Mutagenese dienen, wurde die *PfuUltra II Fusion HS* DNA Polymerase (Stratagene/Agilent, USA) verwendet. Für besonders schwierig zu erhaltende Mutanten wurde alternativ mit dem QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene/Agilent, USA) gearbeitet.

5.5.4 Für Klonierungen und Mutagenesen verwendete Primer

Die Sequenzen für sämtliche verwendeten Klonierungs- und Mutagenese-Primer finden sich in einer Tabelle in Anhang 7.3.

5.5.5 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

Zur Analyse von DNA-Fragmenten, wie etwa von PCR-Produkten und Restriktionsfragmenten, wurde die Agarose-Gelelektrophorese genutzt. Die Agarose wurde von Invitrogen (USA) bezogen. Entsprechend der erwarteten Fragmentgrößen wurde ein 0,8–1,2%iges Gel verwendet. Durch Zugabe von Ethidiumbromid (1 mg/ml Endkonzentration) konnte die DNA auf einem UV-Tisch sichtbar gemacht werden.

1x TBE Laufpuffer: 90 mM Tris, pH 8,3, 90 mM Borsäure, 0,1 mM EDTA

6x DNA-Probenpuffer: 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 60% (v/v) Glycerin, 0,1 mM EDTA, pH 8,0

5.5.6 Verwendete DNA-Konstrukte und Mutanten

Gen/Insert	Vektor	Mutanten/Varianten	Markierung (tag)	Quelle
BACE1	pcDNA3.1+/Zeo (Invitrogen)	wt; H106/110/421/423A; C478/482/485A; Y460A; M462A; C466A; M470A; C474A; M462C/C466A; A463C/C466A; A464C/C466A; I465C/C466A; A467C/C466A; L468C/C466A; A464C; L468C		AG Multhaup
BACE1-6H	pcDNA3.1+/Zeo (Invitrogen)	wt, C466A	HexaHis-Tag (6H)	AG Multhaup
BACE1	pUAST-attB	wt; C466/474/478/482/485A, M470/476A		AG Schaffner (Bischof 2007)
BACE1-CFP/YFP	pcDNA3+/G418 (Gateway, Invitrogen)	wt; C466I		Ursprungsvektor pcDNA3/G418/CFP/YFP AG Schäfer (Voigt 2005)
HA-AAA-YFP	pEYFP (Clontech)	C551/559/562A		AG Herrmann (Engel 2010)
SPA4CT	pCEP4 (Invitrogen)	wt		AG Multhaup

HA, Hemagglutinin

Zeo, Zeocin (Invitrogen)

SPA4CT, C99 aus der APP-Sequenz mit Signalpeptid

5.6 SDS-PAGE und Western Blot

5.6.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Sammelgelpuffer: 1 M Tris/HCl pH 6,8
Trenngelpuffer: 2 M Tris/HCl pH 8,8
Elektrophoresepuffer: 192 mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS in 20 mM Tris
6x SDS-Probenpuffer (reduzierend und nicht-reduzierend), 100 ml:
 25 g SDS; 12,5 ml β MCE bzw. H₂O; 45 ml Glycerin; 0,0012 g Bromphenolblau;
 37,5 ml 1 M Tris/HCl pH 6,8

Die Trennung von Proteinen entsprechend ihrer Größe erfolgt mittels der diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) (Laemmli 1970). Die Methode beruht auf der Wanderung geladener Moleküle zu dem jeweils entgegengesetzten Pol des angelegten Feldes. Das negativ geladene Detergenz SDS lagert sich an Aminosäuren an (etwa 1 SDS Molekül pro 2 Aminosäuren), so dass die negative Ladung, die das Protein erhält, zu der molaren Masse des Proteins proportional ist. Die Polyacrylamidgele werden entsprechend des Pipettierschemas in Tabelle 5 hergestellt. Die Proben werden mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 95°C im Heizblock aufgeköcht. Die Elektrophorese wird für ca. 75 min mit 20 mA je Polyacrylamidgel bei einem Maximum von 200V im Elektrophoresepuffer durchgeführt.

Tabelle 5: Pipettierschema für Sammel- und Trenngele (ausreichen für 2 Biorad Mini-Gele)

Trenngel (für jeweils 2 Gele á 15 Taschen (1,5 mm)):						
Acrylamid/ Endkonz.	Rotiphorese	2 M Tris/ HCl pH 8,8	20% w/v SDS- Stocklsg.	H ₂ O MilliQ	APS 10% w/v	TEMED
%	ml	ml	μ l	ml	μ l	μ l
8	6	4,2	112,5	12	112,5	11,25
10	7,5	4,2	112,5	10,5	112,5	11,25
12,5	9,375	4,2	112,5	8,7	112,5	11,25
16	12	4,2	112,5	6	112,5	11,25
Sammelgel (für jeweils 2 Gele á 15 Taschen (1,5 mm)):						
Acrylamid/ Endkonz.	Rotiphorese	1 M Tris/ HCl pH 6,8	20% w/v SDS- Stocklsg.	H ₂ O MilliQ	APS 10% w/v	TEMED
%	ml	ml	μ l	ml	μ l	μ l
5	1,275	0,93	37,5	5,25	37,5	7,5

Für eine bessere Trennung von BACE1-Monomer (65–70 kDa) und -Tetramer (ca. 250–280 kDa) wurden neben den selbsthergestellten Biorad Mini-Gelen noch gekaufte Gradientengele (Tris-Glycin, 4–12%, 1 mm, 15 Taschen von Anamed, Deutschland) verwendet.

5.6.2 Western Blot

5.6.2.1 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen

Blotpuffer:	192 mM Glycin; 10% Ethanol in 25 mM Tris
Ponceau S-Färbelösung:	0,2% (w/v) Ponceau S; 1% (v/v) Essigsäure
PBS :	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄

In der SDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennte Proteine können für weitere Untersuchungen zugänglich gemacht werden, indem diese durch Blotten auf Nitrozellulosemembranen übertragen werden. Hierfür wird das Polyacrylamidgel zunächst kurz in Blotpuffer äquilibriert. Der Transfer der Proteine auf die Membranen erfolgt im Tankblotverfahren in einer Transblot-Apparatur für 3 h bei einer Stromstärke von 380 mA oder bei 150 mA über Nacht. Die transferierten Proteine können durch reversible Färbung mit Ponceau S auf der Nitrozellulosemembran sichtbar gemacht werden, indem die Nitrozellulosemembran mit der Ponceau S-Färbelösung für 1 min inkubiert wird. Die Proteinbanden werden durch mehrfaches Waschen mit deionisiertem Wasser sichtbar und durch Waschen mit PBS wieder vollständig entfärbt.

5.6.2.2 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Blockierlösung:	10% (w/v) Magermilchpulver in PBS
Waschpuffer PBST:	PBS mit 0,1% Tween-20

Nach dem elektrophoretischen Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran können diese von einem spezifischen Antikörper gebunden werden. Um den spezifischen Antikörper sichtbar zu machen, muss dieser wiederum von einem peroxidasekonjugierten Sekundärantikörper gebunden werden. Das gekoppelte Enzym Peroxidase ist in der Lage eine chemische Reaktion zu katalysieren, welche eine Chemolumineszenz zur Folge hat und somit auf Röntgenfilm detektiert werden kann. Zunächst wird die Membran für 30 min mit 20 ml Blockierlösung inkubiert, um unspezifische Antikörperbindung auf der Membran oder im Gefäß zu verhindern. Dann wird der Primärantikörper (siehe 5.6.2.3) wie angegeben in PBST oder PBST mit 5% Magermilchpulver verdünnt und für 2 h mit der Membran inkubiert. Nach drei Waschschritten mit PBST (3 x 5 min) kann die Membran für 1 h mit dem Sekundärantikörper (siehe 5.6.2.4) inkubiert werden. Unspezifisch gebundener Sekundärantikörper wird durch viermaliges Waschen mit PBST bzw. PBS (4 x 15 min) entfernt. Das Chemilumineszenz-Reagenz (siehe 5.6.2.5) wird für 1 min auf die Membran gegeben, so dass diese vollständig mit einem dünnen Flüssigkeitsfilm bedeckt ist. Nun lässt man die Detektionslösung abtropfen, legt die Membran zwischen zwei klare Plastikfolien, presst mit einem Tuch restliche Lösung und Luftblasen heraus und legt sie in eine Filmkassette. Die Belichtungszeit der Röntgenfilme variiert je nach Antikörperbindung, Hintergrund und Proteinmenge zwischen 30 s und 1 h.

5.6.2.3 Primärantikörper

- **BSC-1**, monoklonaler Antikörper (Maus) gegen die BACE1-Ektodomäne, AS 46–128 (Epitop eingegrenzt durch Markus Strauß), 8,22 mg/ml, eingesetzt 1:10.000, zur Verfügung gestellt durch Dr. Brockhaus, Roche
- **EE-17**, polyklonaler BACE1-Antikörper (Kaninchen) gegen BACE1-Ektodomäne, AS 46–62, eingesetzt 1:4.000, Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
- **HA**, monoklonaler Antikörper (Maus) gegen das Hemagglutinin-Epitop der Sequenz YPYDVPDYA, 1:10.000, Cell Signaling (NEB) (Frankfurt am Main)
- **Aktin**, monoklonaler Antikörper (Maus) gegen Aktin, AS 50–70, 1:2000, Chemicon International
- **sAPP β** , polyklonaler Antikörper (Kanninchen) gegen sAPP β wt, 1:100, IBL (Japan)
- **22C11**, monoklonaler Antikörper (Maus) gegen die APP-Ektodomäne, AS 66–81 (Hilbich 1993), 1:10.000

5.6.2.4 Sekundärantikörper

- **Anti-Maus-IgG, HRP(*horseradish peroxidase*)-konjugiert**, 1 mg/ml, 1:10.000 (Promega, USA)
- **Anti-Kaninchen-IgG, HRP-konjugiert**, 1 mg/ml, 1:10.000 (Promega, USA)

5.6.2.5 Fluoreszentes Substrat für Röntgenfilmbelichtung

Das auf Luminol basierende Gemisch zur Detektion der im Western Blot gebundenen, HRP-gekoppelten Antikörper wurde nach folgendem Rezept selbst hergestellt:

- **Lösung A: 50 mg Luminol (Sigma-Aldrich, USA) gelöst in 200 ml 0,1 M Tris/HCl pH 8,6**
- **Lösung B: 22 mg p-Hydroxycoumarinsäure (Sigma-Aldrich, USA) gelöst in 20 ml DMSO**
- **H₂O₂ (35%)**

Auf den Blot wird jeweils ein frisch angesetztes Gemisch aus 1 ml Lösung A, 0,3 μ l H₂O₂ und 0,1 ml Lösung B gegeben (für mehr oder größere Blots entsprechend skalierbar).

Alternativ zur Belichtung eines Röntgenfilms erfolgte die Detektion mit dem gleichen Substrat per CCD-Kamera (ChemiSmart, PeqLab).

Zellen können mit Medium oder PBS aufgenommen und 1:2 bis 1:20 verdünnt erneut ausgesät werden.

5.7.4 Transfektion der HEK293T-Zellen

Die Transfektion der HEK293T-Zellen erfolgt durch das positiv geladene Polymer Polyethylenimin (PEI). Es handelt sich hier um verzweigtes Polyethylenimin der Grundformel $H(NHCH_2CH_2)_nNH_2$ mit einer durchschnittlichen Verzweigung von $M_n = 10000$ und einer durchschnittlichen Molmasse von $M_w = 25000$ g/mol (Sigma-Aldrich, #408727). Am Tag vor der geplanten Transfektion werden die Zellen in sterilen Zellkulturschalen ausgesät (z.B. 6-Well- oder 12-Well-Platten), so dass man am Folgetag eine Konfluenz von 70-90% erhält. Die zu transfizierende Plasmid-DNA wird jeweils in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß in Optimem (oder anderem serumfreien Medium) verdünnt (für Mengen/Volumen siehe Tabelle 6). In einem weiteren Reaktionsgefäß wird das gleiche Volumen vorgelegt und PEI (2 mg/ml) hinzugegeben. Die PEI-Menge wird so gewählt, dass ein Verhältnis von 4:1 gegenüber der DNA-Menge vorliegt (z.B. 4µg PEI pro 1 µg DNA) (Ehrhardt 2006). Beide Gefäße werden kurz gevortext. Dann gibt man die PEI/Optimem-Mischung zu der DNA und vortext für 15s. Im Anschluss inkubiert man die Mischung für 30 min bei Raumtemperatur. Nun kann man den Überstand der zu transfizierenden Zellkulturschale absaugen, die Zellen vorsichtig mit dem Transfektionsansatz überschichten und mit Vollmedium (DMEM mit 10% FCS) auffüllen. Die Toxizität des PEI/DNA-Gemisches ist gering, daher kann der Überstand über Nacht auf den Zellen verbleiben.

Tabelle 6: Transfektionsansätze mit Polyethylenimin (PEI)

Format	Vol. OptiMem in µl (jeweils vor Mischen)	Plasmid-DNA in µg	Vol. PEI Stammlösung (2 mg/ml) in µl	ad Vollmedium in µl
50 mm	500	4-8	8-16	4000
6 well/35 mm	250	2-4	4-8	1500-2000
12 well	100	1-2	2-4	800

5.7.5 Zellyse

Zur Lyse der HEK293T-Zellen wurde, wenn nicht anders erwähnt, folgender Lysepuffer verwendet:

**20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,5% TritonX-100, 0,5% NaDesoxycholat, 1 mM EDTA,
Complete Proteaseinhibitor (Roche, Schweiz), pH 7,5**

Für die Lyse wurden die Zellen jeweils für mindestens 30 min bei 4 °C auf einem Schütteltisch inkubiert. Anschließend wurden die Lysate in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 500 rpm in einer Tischzentrifuge bei 4 °C für 10 min zentrifugiert.

5.7.6 Metallvermittelte Kreuzvernetzung von BACE1

Zwar funktioniert die kupfervermittelte Kreuzvernetzung von BACE1-Dimeren auch, indem man dass CuCl_2 dem Zellkulturmedium hinzufügt (Inkubation für 4-20h) oder einen kupferhaltigen, EDTA-freien Lysepuffer verwendet, allerdings ist bei der Handhabung von einigen der Nebengruppenmetalle, wie **Kupfer(II)** und **Zink(II)**, die Neigung zur Präzipitation als Metallhydroxid oberhalb von pH 7 zu beachten. Des Weiteren präzipitiert Kupfer(II) in Gegenwart von Phosphat-Ionen. Daher wurde ein Puffersystem etabliert, welches die physiologischen Eigenschaften von PBS $+/+$ weitgehend hat, dabei aber leicht unter pH 7 liegt und phosphatfrei ist.

BBS (*Bis-Tris-buffered saline*):

20 mM Bis-Tris-HCl, 137 mM NaCl, 27 mM KCl, 10 mM CaCl_2 , 5 mM MgCl_2 , pH 6,8

Um die kupfervermittelte Kreuzvernetzung durchzuführen, wurden die Zellen zweimal mit PBS $+/+$ gewaschen, mit 100 μM CuCl_2 /BBS überschichtet (300 μl bei 12well-Format) und für 10 min bei Raumtemperatur auf dem Wipptisch inkubiert. Analog wurde für die Metalle **Zn(II)**, **Ni(II)**, **Mn(II)**, **Co(II)** und **Pd(II)** verfahren. Nach der Inkubation wurde der metallhaltige Überstand entfernt. Die Zellen wurden einmal mit PBS $-/-$ gewaschen, um überschüssige Metallionen zu entfernen und lysiert. Dieses Verfahren zur metallvermittelten Kreuzvernetzung hat den Vorteil, dass es schnell geht und so die hohe Zytotoxizität einiger der verwendeten Metalle keine Bedeutung hat. Die Zellen werden direkt im Anschluss lysiert. Die Kontrollen wurden mit BBS oder PBS ohne Metallionen für den gleichen Zeitraum inkubiert.

Mit Hilfe von **Quecksilber(II)** können freie Thiolgruppen linear komplexiert werden. Die Handhabung von Quecksilber ist insofern unproblematisch, da es hier keinerlei Löslichkeitsprobleme gibt. Für die quecksilbervermittelte Kreuzvernetzung wurden 50 μM HgCl_2 in PBS $+/+$ gelöst und, wie oben beschrieben, auf die Zellen gegeben.

Silber(I)-Ionen sollten als Analoga zu Cu(I) dienen. Die Problematik bei der Handhabung von Silber(I)-Ionen ist die Präzipitation von AgCl. Daher wurde anstelle von BBS oder PBS eine Lösung mit 150 mM Natriumacetat (NaAc) genutzt, mit der die Zellen zunächst dreimal gewaschen wurden, um die Chlorid-Ionen weitgehend zu entfernen. Die Kreuzvernetzung erfolgte dann durch AgNO_3 (10-200 μM) in 150 mM NaAc für 10 min bei RT.

5.7.7 Zelloberflächenbiotinylierung und Isolierung der markierten Proteine

Um die Protein-Stabilität bzw. die Abbaugeschwindigkeit von BACE1 wt und des kreuzvernetzten Dimers zu untersuchen, wurde eine Zelloberflächenbiotinylierung durchgeführt. Dabei reagiert das Biotinylierungsreagenz (EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin, Pierce/Thermo Scientific, USA) mit seiner Sulfosuccinimidyl-Gruppe (siehe Abb. 48) mit der ϵ -Aminogruppe von Lysin-Resten der Zelloberflächenproteine und bildet eine kovalente Bindung. Über ein spaltbares Verbindungsstück (*Linker*) wird auf diese Weise das Biotin an die Lysin-Reste der Oberflächenproteine gekoppelt.

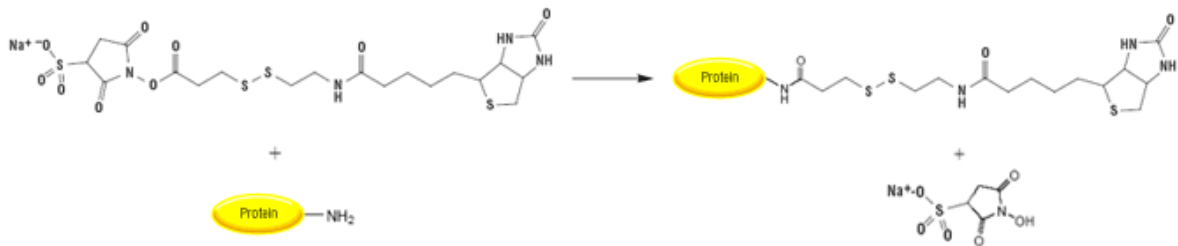


Abb. 48: Chemische Struktur und Reaktion des Biotinylierungsreagenzes Sulfo-NHS-SS-Biotin

Sulfo-NHS-SS-Biotin (Sulfosuccinimidyl-2-[biotinamido]ethyl-1,3-dithiopropionat) reagiert mit primären Aminen (vor allem Lysin-Reste, seltener der N-Terminus) unter Abspaltung von N-Hydroxysulfosuccinimid (NHS). Die Dithio-Gruppe im Verbindungsstück ist durch Reduktionsmittel, wie DTT oder β -Mercaptoethanol, spaltbar.

Quelle: <http://www.piercenet.com>

Da das Biotinylierungsreagenz mit jeglichen primären Aminen reagiert, wurden die in 35 mm-Schalen transient transfizierten Zellen vor der Markierung zunächst dreimal mit vorgewärmtem PBS +/- gewaschen und für 10 min in PBS +/- bei 37°C inkubiert, um die Endozytoseprozesse der Zellen zum Stillstand zu bringen. Die Biotinylierung erfolgte dann für 10 min bei RT auf einem Kipptisch (500 μ l, 0,5 mg/ml Sulfo-NHS-SS-Biotin in PBS +/-). Zum Abstoppen wurden die Zellen ein weiteres Mal mit PBS +/- gewaschen und wieder mit Vollmedium überschichtet. Die Zellen für den ersten Zeitpunkt ($t = 0$ h) wurden nach kurzer Inkubation lysiert (siehe nächster Abschnitt), weitere Schalen mit Zellen wurden für 4, 8 und 12 h weiterinkubiert und dann lysiert.

Die Analyse der zu jedem Zeitpunkt vorhandenen Menge an biotinyliertem BACE1 sollte eine Aussage darüber liefern, wie schnell der Abbau des reifen, membranständigen BACE1 vonstatten geht. Hierzu wurde jeweils ein kleiner Teil des Lysats im 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit NeutrAvidin-Agarose (Pierce/Thermo Scientific, Braunschweig) inkubiert, um die biotinylierten Proteine aus dem Lysat zu binden. Insgesamt erhält man 500-600 μ l Lysat pro 35 mm-Schale; 50 μ l Lysat wurden mit 500 μ l Waschpuffer A (siehe unten) und 20 μ l NeutrAvidin-Agarose für mindestens 30 min bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Die NeutrAvidin-Agarose wurde im Anschluss dreimal gewaschen:

1. Zentrifugation für 1 min bei 500 rpm, Überstand absaugen
2. 500 µl **Waschpuffer A (10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0,2 % NP40, 2 mM EDTA, pH7,5)**
+ Complete Proteaseinhibitor (Roche)
3. Zentrifugation für 1 min bei 500 rpm, Überstand absaugen
4. 500 µl **Waschpuffer B (10 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 0,2 % NP40, 2 mM EDTA, pH 7,5)**
5. Zentrifugation für 1 min bei 500 rpm, Überstand absaugen
6. 500 µl **Waschpuffer C (10 mM Tris/HCl pH 7,5)**
7. Zentrifugation für 1 min bei 500 rpm, Überstand absaugen

Durch Zugabe von reduzierendem SDS-Probenpuffer (20 µl 6x PP, 20 µl Wasser) und Aufkochen wird die Dithio-Gruppe im Linker gespalten und das über Biotin gebundene Protein wird für die Analyse mittels SDS-PAGE/Western Blot freigesetzt. 20 µl des Überstandes werden auf ein Gel aufgetragen. Die Quantifizierung der Banden erfolgt mittels ChemiSmart-System (siehe Abschnitt 5.6).

5.8 BACE1-Aktivitätstests

5.8.1 *In vitro* BACE1-Aktivitätstest

Um die basale enzymatische Aktivität von unbehandeltem und kupferverknüpftem BACE1 wt sowie der TMS-Mutante C466A zu bestimmen, wurden Konstrukte hergestellt, die C-terminal einen HexaHis-Tag (6H) tragen, und in HEK293T-Zellen exprimiert. Nach der Behandlung mit BBS-Puffer +/- Cu (siehe 5.7.6) wurden die Zellen in einem speziellen **Lysepuffer** solubilisiert:

50 mM NaPhosphat, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 1% Triton X100, 1x Complete Proteaseinhibitor ohne EDTA (Roche), pH 8.

Die genomische DNA wurde im Anschluss an die Lyse (mindestens 30 min bei 4°C) durch Zentrifugation in einer Eppendorf-Tischzentrifuge pelletiert (10min, 500 rpm, 4°C). Zur Isolierung von BACE1 aus den Lysaten wurden 100 µl des Lysats mit 500 µl Lysepuffer und 20 µl Ni-NTA-Agarose (Qiagen) in 1,5 ml Reaktionsgefäßen im Überkopfschüttler für mindestens 2h bei 4°C inkubiert. Nach 3 Waschzyklen (Zentrifugation für 1 min bei 500 rpm und 4°C, Entfernung des

Überstandes, Resuspension in Waschpuffer (**Waschpuffer = Lysepuffer, außer 20 mM Imidazol und 0,5% TritonX100**) wurde die Ni-NTA-Agarose in 30 µl *Fluorescence Assay Buffer* (BACE1 Activity Detection Kit (Fluorescence), Sigma Aldrich, USA) resuspendiert und in schwarze 96-Well-Platten überführt (Nunc, Dänemark). Die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe von 50 µl eines Puffer/Substrat-Gemisches (48 µl *Fluorescence Assay Buffer*, 2 µl Substratpeptid (1 mg/ml) zu jedem Ansatz gestartet. Das Substratpeptid Mca(Methoxycumarin-4-acetyl)-SEVNL-DAEFR-Dnp(Dinitrophenyl)-RR beinhaltet die BACE1-Schnittstelle aus APP mit schwedischer Mutation (APP_{swe}) und trägt ein Fluorophor (Mca), welches bei 320 nm angeregt werden kann. Die resultierende Fluoreszenz (405 nm) wird durch den *Quencher* Dnp absorbiert, bis das Substrat gespalten wird und somit Fluorophor und Quencher voneinander getrennt werden (Abb. 49). Die Zunahme der Fluoreszenz bei 405 nm über die Zeit, ausgedrückt als *Relative Fluorescence Units* (RFU), ist also das Maß für die Höhe der enzymatischen Aktivität. Aufgezeichnet wurden die Fluoreszenzdaten in 40 s-Intervallen über einen Zeitraum von 45 min mit dem Plattenlesegerät Synergy2 Multi-Mode Microplate Reader (Biotek, Deutschland).

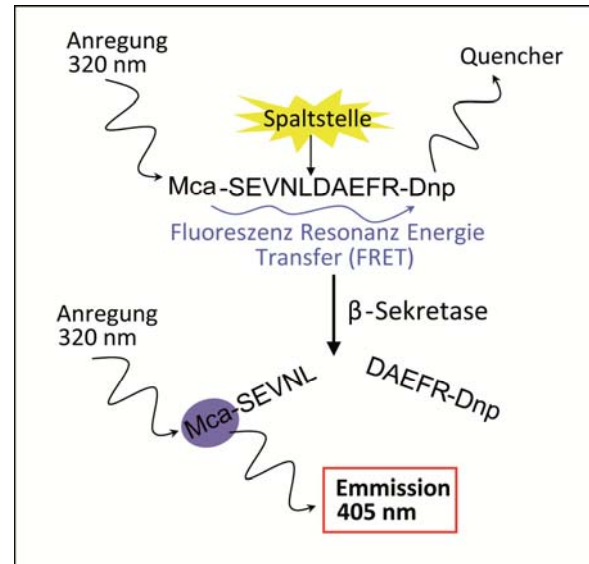


Abb. 49: Schema des Mca-Aktivitätstests

Schematische Darstellung des *in vitro*-Aktivitätstests. Der bei 320 nm anzuregende Fluorophor Methoxycumarin-4-acetyl (Mca) ist gekoppelt mit einem kurzen Peptid, welches die BACE1-Schnittstelle des APP_{swe} trägt. Dinitrophenyl (Dnp) fungiert bis zur Spaltung als Quencher, der bei 405 nm emittierten Fluoreszenz.

Zu dieser Art *in vitro*-Test ist anzumerken, dass man zwar die reine Proteaseaktivität recht gut bestimmen kann, allerdings wichtige Aspekte, wie die sterische Anordnung von Protease und natürlichem Substrat in der Plasmamembran, also die Lokalisation und Substratbindung, nicht berücksichtigt werden.

5.8.2 Zellbasierter Aktivitätstest mittels sAPP β -Freisetzung

Anders als der *in vitro*-Test weist der zellbasierte Aktivitätstest, der im Rahmen dieser Arbeit etabliert wurde, deutlich mehr Gemeinsamkeiten mit der *in vivo*-Situation auf. Beispielsweise treffen hier Enzym und Substrat in membrangebundener Form aufeinander, sind also auf laterale Bewegungen beschränkt und können in natürlichen Zellkompartimenten, wie den Endosomen, miteinander reagieren. Hierzu wurden HEK293T-Zellen mit BACE1 (wt oder C466A) und APP695 wt co-transfiziert. 20-24 h nach der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit PBS +/- gewaschen und wie oben beschrieben (5.7.6) mit BBS-Puffer mit und ohne Kupfer behandelt. Anschließend wurden 300 μ l Optimem (Invitrogen, USA) mit 10 μ g/ml Cycloheximid (Chx) (Sigma Aldrich, USA) (bei 12-well Format) auf die Zellen gegeben. Dabei dient das Cycloheximid der Blockierung der Proteinbiosynthese, was das Verhältnis von Monomer zu kreuzvernetztem Dimer konstant hält, indem die Produktion von unvernetztem BACE1-Monomer verhindert wird. Für die Inhibition von BACE1 in den gekennzeichneten Ansätzen wurde BACE1 Inhibitor IV (Calbiochem) mit einer Konzentration von 4 μ M eingesetzt. Der Überstand wurde für 2 h konditioniert, abgenommen und für die Western Blot-Analyse mit sAPP β -Antikörper (IBL) verwendet. Die Signale wurden mit einem ChemiSmart System detektiert und mit Hilfe der Bio1D Software quantifiziert.

5.9 ELISA zur Quantifizierung von A β

Um den Abbau von A β durch BACE1 zu quantifizieren, wurden transient co-transfizierte HEK293T-Zellen für 0 bis 6 h im 35 mm-Format bei 37°C inkubiert und der Überstand dann mit Hilfe eines A β -ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) analysiert. Für den benutzten Sandwich-ELISA wurde eine spezielle 96-well-Platte zunächst mit einem der monoklonalen „Fänger-Antikörper“ (G2-10 für A β 40 und G2-13 für A β 42, The Genetics Company, Schweiz; 4G8 für Gesamt-A β (Epitop 17-24), Signet/Covance, USA) beschichtet. Anschließend wurden unbesetzte Bindungsstellen der positiv geladenen Kunststoffoberfläche mit *StabilCoat* (SurModics/Diarect, Deutschland) abgesättigt. Der zu untersuchende Zellkulturüberstand (jeweils 50 μ l) wurde zusammen mit dem Detektionsantikörper WO-2-Biotin (in 50 μ l Liquorpuffer; Epitop 5-8 (Ida 1996), The Genetics Company, Schweiz) in eine Vertiefung gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die zur Detektion dienende HRP lag konjugiert mit Streptavidin vor, welches mit hoher Affinität und Spezifität an das Biotin bindet. Als Substrat der HRP diente „1-Step Ultra TMB“ (Thermo Scientific, USA). Der ELISA wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

5.10 Massenspektrometrie und Probenvorbereitung

Um mit den ZipTips, die in ihrer Spitze C18 *Reversed Phase*-Silicagel enthalten, Peptide aus einer Lösung binden zu können, muss das Chromatographiematerial zunächst mit Acetonitril befeuchtet werden, bevor es mit 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) gespült wird. Um eine optimale Bindung der Peptide an das hydrophobe Material zu erreichen, sollten alle verwendeten Lösungen inklusive Probenlösung einen pH von unter 4 haben, was durch eine Einstellung auf 0,1–1% TFA erreicht wird. Die Bindung erreicht man nun, indem die maximal 10 μ l aufnehmende Spitze in die Probe getaucht und 15–20 mal auf und ab pipettiert wird. Die aufkonzentrierten Peptide auf der Minisäule werden nun gewaschen und entsalzt, indem die Spitze zweimal in frische 0,1% TFA Lösungen (jeweils 500 μ l) getaucht wird und die Lösung wiederum mehrmals aufgezogen wird. Durch Zugabe von 5% Methanol oder Acetonitril zur Waschlösung lässt sich die Entsalzung unter Umständen verbessern und die Stringenz optional erhöhen. Die Elution der gebundenen Peptide erfolgt in 3–5 μ l 80% Acetonitril mit 0,1% TFA. Das Eluat kann nun direkt auf einen MALDI-Probenteller aufgetragen werden.

Die MALDI-TOF-MS-Messungen (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation, Time of Flight, Massenspektrometrie*) wurden mit einem Bruker UltraFlex II-Massenspektrometer durchgeführt. Je 1 μ l der Probe wurde mit 1 μ l der Matrix-Substanz Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure (CCA) oder Sinapinsäure (SA) (gesättigte Lösung in 0,1% TFA/33% Acetonitril) vermischt und auf den stählernen Probenteller pipettiert. Durch Verdampfung co-kristallisiert die Probe mit der Matrix (*Dried Droplet*) und kann vermessen werden.

5.11 FLIM-FRET-Messungen

Die Homodimerisierung von BACE1 in lebenden Zellen wurde mit Hilfe von FLIM-FRET gemessen. Als Grundlage hierfür diente die von Scolari et al. beschriebene Methode (Scolari 2009). Sämtliche Messungen wurden mit einem invertierten FluoView 1000 Mikroskop (Olympus, Tokyo, Japan) durchgeführt, welches mit einem zeitauflösenden LSM Upgrade Kit (PicoQuant, Berlin, Germany) und einem 60x (1.35 numerische Apertur) Öl-Immersions-Objektiv ausgestattet ist. Um den Energietransfer (FRET) zwischen BACE1-CFP (Donor) und BACE1-YFP (Akzeptor) zu untersuchen, wurden beide Konstrukte co-transfiziert, und dann per *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy* (FLIM) vermessen. Das Grundprinzip der Messung ist, dass die gemessene Fluoreszenzlebensdauer von CFP ohne FRET, also ohne YFP in seiner Nähe, länger ist als mit FRET (Abb. 50). Die Verkürzung der Fluoreszenzlebensdauer τ dient also als Maß für die Interaktion zwei potenzieller Dimerisierungspartner.

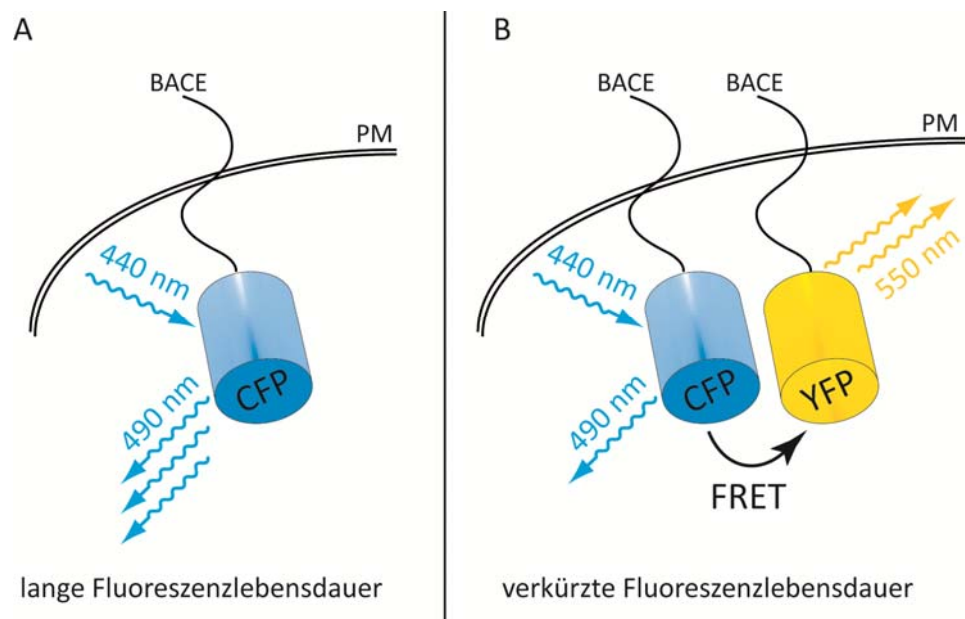


Abb. 50: Prinzip der FLIM-FRET-Messungen

A: Zunächst wird die Fluoreszenzlebensdauer von BACE1-CFP alleine gemessen, wobei nur Protein in der Plasmamembran (PM) Berücksichtigung findet.

B: Kommt es nach Co-Transfektion von BACE1-CFP und BACE1-YFP zu einer Verkürzung der Fluoreszenzlebensdauer des CFP aufgrund von FRET, kann rückgeschlossen werden, dass eine kurze Distanz zwischen den Chromophoren vorliegt und eine Interaktion zwischen den BACE1-Monomeren stattfindet.

Dabei war es wichtig, dass der Akzeptor BACE1-YFP im Überschuss transfiziert und expremiert wurde (1,5 μg Plasmid-DNA des BACE1-CFP und 2 μg Plasmid-DNA des BACE1-YFP auf 80% konfluente Zellen in 35 mm Glasboden-Schälchen (MatTek, USA)), um die Bildung von BACE1-CFP/CFP-Dimeren zu minimieren. Da lediglich „Heterodimere“ aus BACE1-CFP/YFP FRET-aktiv sind, würden die CFP/CFP-Homodimere das Ergebnis dahingehend verfälschen, dass weniger FRET zu messen wäre. BACE1-

YFP/YFP-Homodimere sind zwar ebenfalls nicht FRET-aktiv, stören das gemessene Ergebnis allerdings nicht. Um die Expression und das Verhältnis von CFP zu YFP zu kontrollieren, wurden beide Chromophore angeregt und Intensitätsbilder der Fluoreszenz aufgezeichnet. Dabei wurde CFP mit Hilfe einer Laserdiode bei 440 nm angeregt und die resultierende Fluoreszenz wurde im Bereich von 460 bis 490 nm detektiert. YFP wurde über einen Argon-Laser bei 515 nm angeregt, detektiert wurde im Bereich von 535 bis 575 nm. Die aufgezeichneten Fluoreszenzintensitäten von Donor und Akzeptor wurden mit Hilfe von ImageJ ausgewertet.

Die eigentlichen FLIM Bilder des Donors BACE1-CFP wurden in Ab- und Anwesenheit des Akzeptors BACE1-YFP nach Anregung durch eine gepulste Laserdiode bei 440 nm aufgezeichnet. Dabei diente eine *Single Photon Avalanche Photodiode* (SPAD) und ein 470 +/- 15 nm Bandpassfilter zur Detektion. Zur Verarbeitung der elektrischen Signale und Weiterleitung zum Computer wurde eine TimeHarp 200 PC Karte genutzt, was die Analyse der FLIM-Aufnahmen mit Hilfe der speziellen Software Sym-PhoTime (PicoQuant) ermöglichte. Die FLIM-Bilder wurden bei jeder Einzelmessung über einen Zeitraum von 90 s akkumuliert (60 Aufnahmen mit einer Photonenrate von 2–8 x 10⁴ Counts/s). Zur Auswertung wurden lediglich diejenigen Pixel herangezogen, die mit der Plasmamembran korrespondierten, da die hohe Proteindichte des ER/Golgi-Bereichs im Inneren der Zelle das Ergebnis verfälscht hätte. Die gemessenen Photonen pro Pixel wurden mittels Software in einer Zerfallskurve kombiniert (siehe Abb. 19), welche durch ein mathematisches *Fitting* analysiert wurde. Sym-PhoTime stellt hierzu eine sogenannte "nicht-lineare, iterative Prozedur der kleinsten Quadrate" bereit, bei der eine biexponentielle Funktion berechnet wird, welche der gemessenen Zerfallskurve möglichst nahe kommen soll. Mit einbezogen wird neben der Vermessung der Zelle noch die *Instrument Response Function* (IRF), die von der Form des verwendeten Laser abhängig ist und die Auswertung von kurzen Fluoreszenzdauern (< 5 ns) ermöglicht. Diese Art von *Fitting* ist notwendig, da ein multipler exponentieller Zerfall für fluoreszente Proteine bereits bekannt ist (Lackowicz 2006). Die Qualität des *Fitting* wird im χ^2 -Wert ausgedrückt, welcher umso stärker von 1 abweicht (höher oder niedriger), je schlechter die berechnete mathematische Funktion zu den Messwerten passt.

5.12 Erzeugung und Kultivierung der transgenen Fliegen

5.12.1 Das Expressionssystem

Zur Expression der zu untersuchenden Proteine in *Drosophila melanogaster* wurde das aus der Hefe adaptierte GAL4/UAS-System verwendet (Fischer 1988; Brand 1993; Duffy 2002). Dabei wurde BACE1 wt und die BACE1-TMS-Mutante CMC³MCCC (C466/474/478/482/485A, M470/476) zunächst hinter den UAS-Promotor (UAS, *Upstream Activation Sequence*) im pUAST-attB-Vektor (attB, bakterielle Insertionsstelle für den Bakteriophagen ϕ 31C) kloniert. Durch Injektion der erhaltenen Plasmid-DNA in die Gonaden-Region von Fliegeniern und homologe Rekombination erhält man in der nachfolgenden Generation transgene Fliegen, die das insertierte Gen mit UAS-Promotor im Genom tragen. Hierfür wurde ein Fliegenstamm verwendet, der eine attP-Insertionssequenz (attP,

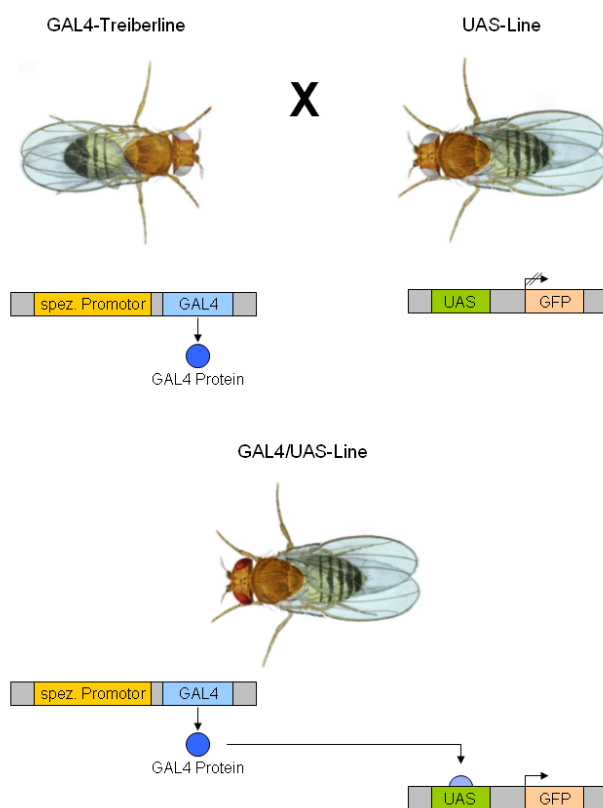


Abb. 51: Schematische Darstellung des GAL4/UAS-Systems

Die UAS-Linie trägt das Gen von Interesse (oben rechts, hier BACE1 wt oder Mutante statt GFP), exprimiert es aber erst nach einer Verkreuzung mit der GAL4-Treiberlinie (oben links), die den Transaktivator GAL4 unter Kontrolle eines gewebsspezifischen Promotors exprimiert

Quelle: de.wikipedia.org

Insertionssequenz des Bakteriophagen ϕ 31C) an einer bestimmten Stelle im Genom hat, um eine zielgerichtete Insertion zu ermöglichen (hier Site 51D auf Chromosom 2, (Thorpe 1998; Groth 2004; Bischof 2007)). Die zielgerichtete Insertion dient dabei dem Zweck, dass sowohl BACE1 wt als auch die Mutante das gleiche genetische Umfeld haben, um gleiche Expressionslevel zu erhalten. Kreuzt man diese transgenen Fliegen, die durch äußerliche Marker, wie rote Augen (*white*), veränderte Haarstrukturen (*humeral*), veränderte Körperfarbe (*yellow*) oder veränderten Körperbau (*tubby*) erkennbar werden, mit Fliegen, die unter der Kontrolle eines gewebsspezifischen Promotors oder dem universellen Aktin-Promotor den Hefe-Transkriptionsaktivator GAL4 exprimieren (in diesem Fall durch den Aktin-Promotor), wird in den Nachkommen die transgene Expression initiiert (Abb. 51).

5.12.2 Kultivierung und Ernährung der Fliegen

Die Fliegen wurden bei 25°C und 65% Luftfeuchtigkeit gehalten.

1 Liter des Standardfutters besteht aus:

- 55 g Maismehl
- 10 g Weizenmehl
- 100 g Hefeextrakt
- 75 g Glucose
- 8 g Agar
- 15 ml des anti-fungalen Reagenzes Nipagin (15% in Ethanol)

Für den Überlebenstest (5.12.3) wurden dem Futter zusätzlich 30 μ M Bathocuproindisulfonsäure (BCS) hinzugesetzt

5.12.3 Überlebenstest

Für den Überlebenstest wurden Fliegen, die homozygot für das zu exprimierende Gen UAS-BACE1 wt (bzw. UAS-BACE1-CMCMCCC oder UAS-Ctr1B) waren, mit Fliegen gekreuzt, die einen Ctr1B -/- Hintergrund hatten. Die Expression des Transgens sollte durch den ubiquitären Gal4-Transaktivator (Aktin-Gal4) initiiert werden. Hierzu wurden nur die Nachkommen mit dem Genotyp Ctr1B -/- und UAS-BACE1 wt +/- (bzw. UAS-BACE1-CMCMCCC oder UAS-Ctr1B) mit Fliegen gekreuzt, die Ctr1B -/- waren und Aktin-Gal4 trugen. Diese Verkreuzung wurde auf Futter durchgeführt, das 30 μ M BCS enthielt, um für die nachfolgende Generation eine Kupfermangelsituation herzustellen. Es konnten zwei Sorten von überlebenden Nachkommen erhalten werden: 1. Ctr1B -/- Fliegen, die BACE1 exprimierten, 2. Ctr1B +/- Fliegen, die zwar UAS-BACE1 trugen, das Transgen aber nicht exprimierten, da GAL4 fehlte. Die Fliegenlarven und -Puppen wurden qualitativ begutachtet, während zur quantitativen Auswertung die geschlüpften Fliegen jeweils mit CO₂ betäubt und gezählt wurden.

5.13 Computer-basierte Methoden

5.13.1 Sequenzvergleich (*Alignment*)

Die Sequenzen der verschiedenen BACE1-Orthologen wurden der Datenbank UniProtKB entnommen (für Referenznummern siehe Abb. 16) and mit Hilfe des ClustalW2 Algorithmus (EMBL-EBI) vergleichend angeordnet (*Aligned*).

5.13.2 Modellierung der BACE1-TMS

Das Modell für ein BACE1-TMS-Dimer wurde auf Basis der Western Blot-Daten und der bekannten NMR-Struktur des Glycophorin A (GpA) gebaut (MacKenzie 1997). Obwohl es keine direkte Sequenzhomologie zwischen BACE1 und GpA gibt (siehe Abb. 16), findet sich in der BACE1-TMS ein ähnliches Motiv wie im GpA. Das AxxxAxxxA-Motiv in der BACE1-TMS führt mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer ähnlichen Helix-Helix-Anordnung und -Geometrie wie das GxxxG(xxxG)-Motiv des GpA (Senes 2004). Das Achter-Muster (*Octad Repeat*) solcher kleinen und mittelpolaren Aminosäuren erlaubt die Formation einer rechtshändigen Helix-Packung (Walters 2006). An diesen Positionen kommen sich die Atome des Peptidrückgrats beider Helices sehr nahe und Wasserstoffbrückenbindungen können sich ausbilden (Senes 2001). Um das hypothetische Modell mit Hilfe des *Alignment* (siehe Abb. 16) zu erzeugen, wurde der *Swiss PDB Viewer* genutzt. Das Modell wurde energetisch durch den Einsatz von GROMACS (*GROningen MACHine for Chemical Simulations*) minimiert (Van Der Spoel 2005). Als Resultat konnte eine stabile, störungsfreie Struktur des dimeren BACE1-TMS-Homodimers erhalten werden. Zusätzlich wurden die vermeintlichen Grenzen der Membran über die Hydrophobizität der Aminosäurereste berechnet (*Mplot*).

6 LITERATUR

- Acquati, F., M. Accarino, et al. (2000). "The gene encoding DRAP (BACE2), a glycosylated transmembrane protein of the aspartic protease family, maps to the down critical region." *FEBS Lett* **468**(1): 59-64.
- Ahrens, L. H. (1952). "The Use of Ionization Potentials .1. Ionic Radii of the Elements." *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **2**(3): 155-169.
- Akabas, M. H., D. A. Stauffer, et al. (1992). "Acetylcholine receptor channel structure probed in cysteine-substitution mutants." *Science* **258**(5080): 307-310.
- Aller, S. G., E. T. Eng, et al. (2004). "Eukaryotic CTR copper uptake transporters require two faces of the third transmembrane domain for helix packing, oligomerization, and function." *J Biol Chem* **279**(51): 53435-53441.
- Alzheimer, A. (1907). "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde." *Allg. Z. Psychiat.* **64**: 146-148.
- Alzheimer, A. (1911). "Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters." *Zschr. Ges. Neur. Psychiat.* **4**: 356-385.
- Andreasen, N., M. Sjogren, et al. (2003). "CSF markers for Alzheimer's disease: total tau, phospho-tau and Abeta42." *World J Biol Psychiatry* **4**(4): 147-155.
- Angeletti, B., K. J. Waldron, et al. (2005). "BACE1 cytoplasmic domain interacts with the copper chaperone for superoxide dismutase-1 and binds copper." *J Biol Chem* **280**(18): 17930-17937.
- Apelt, J., M. Bigl, et al. (2004). "Aging-related increase in oxidative stress correlates with developmental pattern of beta-secretase activity and beta-amyloid plaque formation in transgenic Tg2576 mice with Alzheimer-like pathology." *Int J Dev Neurosci* **22**(7): 475-484.
- Arbel, M., I. Yacoby, et al. (2005). "Inhibition of amyloid precursor protein processing by beta-secretase through site-directed antibodies." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(21): 7718-7723.
- Arnold, F. H. and B. L. Haymore (1991). "Engineered metal-binding proteins: purification to protein folding." *Science* **252**(5014): 1796-1797.
- Arredondo, M. and M. T. Nunez (2005). "Iron and copper metabolism." *Mol Aspects Med* **26**(4-5): 313-327.
- Atwood, C. S., R. D. Moir, et al. (1998). "Dramatic aggregation of Alzheimer abeta by Cu(II) is induced by conditions representing physiological acidosis." *J Biol Chem* **273**(21): 12817-12826.
- Atwood, C. S., G. Perry, et al. (2004). "Copper mediates dityrosine cross-linking of Alzheimer's amyloid-beta." *Biochemistry* **43**(2): 560-568.
- Balamurugan, K., D. Egli, et al. (2007). "Copper homeostasis in Drosophila by complex interplay of import, storage and behavioral avoidance." *EMBO J* **26**(4): 1035-1044.
- Balamurugan, K. and W. Schaffner (2006). "Copper homeostasis in eukaryotes: teetering on a tightrope." *Biochim Biophys Acta* **1763**(7): 737-746.
- Bayer, T. A., S. Schafer, et al. (2003). "Dietary Cu stabilizes brain superoxide dismutase 1 activity and reduces amyloid Abeta production in APP23 transgenic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(24): 14187-14192.
- Beel, A. J. and C. R. Sanders (2008). "Substrate specificity of gamma-secretase and other intramembrane proteases." *Cell Mol Life Sci* **65**(9): 1311-1334.
- Benjannet, S., A. Elagoz, et al. (2001). "Post-translational processing of beta-secretase (beta-amyloid-converting enzyme) and its ectodomain shedding. The pro- and transmembrane/cytosolic domains affect its cellular activity and amyloid-beta production." *J Biol Chem* **276**(14): 10879-10887.

- Bertinato, J. and M. R. L'Abbe (2004). "Maintaining copper homeostasis: regulation of copper-trafficking proteins in response to copper deficiency or overload." J Nutr Biochem **15**(6): 316-322.
- Bethge, T. (2005). Identifizierung und funktionelle Charakterisierung der Metallbindungsstellen in der Ektodomäne des beta-site APP-cleaving enzyme 1 (BACE1). Diplomarbeit.
- Bischof, J., R. K. Maeda, et al. (2007). "An optimized transgenesis system for Drosophila using germ-line-specific phiC31 integrases." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(9): 3312-3317.
- Blasko, I., R. Beer, et al. (2004). "Experimental traumatic brain injury in rats stimulates the expression, production and activity of Alzheimer's disease beta-secretase (BACE-1)." J Neural Transm **111**(4): 523-536.
- Borchardt, T., J. Camakaris, et al. (1999). "Copper inhibits beta-amyloid production and stimulates the non-amyloidogenic pathway of amyloid-precursor-protein secretion." Biochem J **344 Pt 2**: 461-467.
- Brand, A. H. and N. Perrimon (1993). "Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes." Development **118**(2): 401-415.
- Brookmeyer, R., E. Johnson, et al. (2007). "Forecasting the global burden of Alzheimer's disease." Alzheimers Dement **3**(3): 186-191.
- Brosig, B. and D. Langosch (1998). "The dimerization motif of the glycoporphin A transmembrane segment in membranes: importance of glycine residues." Protein Sci **7**(4): 1052-1056.
- Brunkan, A. L. and A. M. Goate (2005). "Presenilin function and gamma-secretase activity." J Neurochem **93**(4): 769-792.
- Burch, E. A., Jr. and S. R. Andrews (1987). "Comparison of two cognitive rating scales in medically ill patients." Int J Psychiatry Med **17**(2): 193-200.
- Capell, A., H. Steiner, et al. (2000). "Maturation and pro-peptide cleavage of beta-secretase." J Biol Chem **275**(40): 30849-30854.
- Christensen, M. A., W. Zhou, et al. (2004). "Transcriptional regulation of BACE1, the beta-amyloid precursor protein beta-secretase, by Sp1." Mol Cell Biol **24**(2): 865-874.
- Ciechanover, A., A. L. Schwartz, et al. (1983). "Kinetics of internalization and recycling of transferrin and the transferrin receptor in a human hepatoma cell line. Effect of lysosomotropic agents." J Biol Chem **258**(16): 9681-9689.
- Cirulli, E. T. and D. B. Goldstein (2010). "Uncovering the roles of rare variants in common disease through whole-genome sequencing." Nat Rev Genet **11**(6): 415-425.
- Citron, M. (2004). "Strategies for disease modification in Alzheimer's disease." Nat Rev Neurosci **5**(9): 677-685.
- Cleary, J. P., D. M. Walsh, et al. (2005). "Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function." Nat Neurosci **8**(1): 79-84.
- Cobine, P. A., L. D. Ojeda, et al. (2004). "Yeast contain a non-proteinaceous pool of copper in the mitochondrial matrix." J Biol Chem **279**(14): 14447-14455.
- Cordy, J. M., I. Hussain, et al. (2003). "Exclusively targeting beta-secretase to lipid rafts by GPI-anchor addition up-regulates beta-site processing of the amyloid precursor protein." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(20): 11735-11740.
- Dahlgren, K. N., A. M. Manelli, et al. (2002). "Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability." J Biol Chem **277**(35): 32046-32053.
- Dancis, A., D. S. Yuan, et al. (1994). "Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: an unexpected role for copper in iron transport." Cell **76**(2): 393-402.

- De Feo, C. J., S. G. Aller, et al. (2009). "Three-dimensional structure of the human copper transporter hCTR1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(11): 4237-4242.
- De Strooper, B. and W. Annaert (2000). "Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein." *J Cell Sci* **113** (Pt **11**): 1857-1870.
- De Strooper, B., R. Vassar, et al. (2010). "The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease." *Nat Rev Neurol* **6**(2): 99-107.
- Deibel, M. A., W. D. Ehmann, et al. (1996). "Copper, iron, and zinc imbalances in severely degenerated brain regions in Alzheimer's disease: possible relation to oxidative stress." *J Neurol Sci* **143**(1-2): 137-142.
- Dominguez, D., J. Tournoy, et al. (2005). "Phenotypic and biochemical analyses of BACE1- and BACE2-deficient mice." *J Biol Chem* **280**(35): 30797-30806.
- Duffy, J. B. (2002). "GAL4 system in Drosophila: a fly geneticist's Swiss army knife." *Genesis* **34**(1-2): 1-15.
- Eehalt, R., P. Keller, et al. (2003). "Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts." *J Cell Biol* **160**(1): 113-123.
- Eehalt, R., B. Michel, et al. (2002). "Splice variants of the beta-site APP-cleaving enzyme BACE1 in human brain and pancreas." *Biochem Biophys Res Commun* **293**(1): 30-37.
- Ehrhardt, C., M. Schmolke, et al. (2006). "Polyethylenimine, a cost-effective transfection reagent." *Signal Transduction* **6**: 179-184.
- Engel, S., S. Scolari, et al. (2010). "FLIM-FRET and FRAP reveal association of influenza virus haemagglutinin with membrane rafts." *Biochem J* **425**(3): 567-573.
- Engelman, D. M., B. D. Adair, et al. (1993). "Dimerization of glycoporphin A transmembrane helices: mutagenesis and modeling." *Soc Gen Physiol Ser* **48**: 11-21.
- Finney, L. A. and T. V. O'Halloran (2003). "Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors." *Science* **300**(5621): 931-936.
- Fischer, J. A., E. Giniger, et al. (1988). "GAL4 activates transcription in Drosophila." *Nature* **332**(6167): 853-856.
- Fluhrer, R., G. Multhaup, et al. (2003). "Identification of a beta-secretase activity, which truncates amyloid beta-peptide after its presenilin-dependent generation." *J Biol Chem* **278**(8): 5531-5538.
- Folstein, M. F., S. E. Folstein, et al. (1975). "'Mini-mental state'. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician." *J Psychiatr Res* **12**(3): 189-198.
- Furnham, N., S. Ruffle, et al. (2004). "Splice variants: a homology modeling approach." *Proteins* **54**(3): 596-608.
- Furukawa, K., B. L. Sopher, et al. (1996). "Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain." *J Neurochem* **67**(5): 1882-1896.
- Georgatsou, E., L. A. Mavrogiannis, et al. (1997). "The yeast Fre1p/Fre2p cupric reductases facilitate copper uptake and are regulated by the copper-modulated Mac1p activator." *J Biol Chem* **272**(21): 13786-13792.
- Ghosh, A. K., N. Kumaragurubaran, et al. (2008). "Memapsin 2 (beta-secretase) inhibitors: drug development." *Curr Alzheimer Res* **5**(2): 121-131.
- Glenner, G. G. and C. W. Wong (1984). "Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein." *Biochem Biophys Res Commun* **122**(3): 1131-1135.
- Groth, A. C., M. Fish, et al. (2004). "Construction of transgenic Drosophila by using the site-specific integrase from phage phiC31." *Genetics* **166**(4): 1775-1782.
- Gruninger-Leitch, F., D. Schlatter, et al. (2002). "Substrate and inhibitor profile of BACE (beta-secretase) and comparison with other mammalian aspartic proteases." *J Biol Chem* **277**(7): 4687-4693.

- Haniu, M., P. Denis, et al. (2000). "Characterization of Alzheimer's beta -secretase protein BACE. A pepsin family member with unusual properties." J Biol Chem **275**(28): 21099-21106.
- Harmer, A., C. Wozny, et al. (2009). "Role of amyloid-beta glycine 33 in oligomerization, toxicity, and neuronal plasticity." J Neurosci **29**(23): 7582-7590.
- Harold, D., R. Abraham, et al. (2009). "Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease." Nat Genet **41**(10): 1088-1093.
- Hartter, D. E. and A. Barnea (1988). "Evidence for release of copper in the brain: depolarization-induced release of newly taken-up ⁶⁷copper." Synapse **2**(4): 412-415.
- He, W., Y. Lu, et al. (2004). "Reticulon family members modulate BACE1 activity and amyloid-beta peptide generation." Nat Med **10**(9): 959-965.
- He, X., W. P. Chang, et al. (2002). "Memapsin 2 (beta-secretase) cytosolic domain binds to the VHS domains of GGA1 and GGA2: implications on the endocytosis mechanism of memapsin 2." FEBS Lett **524**(1-3): 183-187.
- He, X., F. Li, et al. (2005). "GGA proteins mediate the recycling pathway of memapsin 2 (BACE)." J Biol Chem **280**(12): 11696-11703.
- Hebert, S. S., K. Horre, et al. (2008). "Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(17): 6415-6420.
- Hesse, L., D. Beher, et al. (1994). "The beta A4 amyloid precursor protein binding to copper." FEBS Lett **349**(1): 109-116.
- Hilbich, C., U. Monning, et al. (1993). "Amyloid-like properties of peptides flanking the epitope of amyloid precursor protein-specific monoclonal antibody 22C11." J Biol Chem **268**(35): 26571-26577.
- Hildebrand, P. W., R. Preissner, et al. (2004). "Structural features of transmembrane helices." FEBS Lett **559**(1-3): 145-151.
- Hong, L., G. Koelsch, et al. (2000). "Structure of the protease domain of memapsin 2 (beta-secretase) complexed with inhibitor." Science **290**(5489): 150-153.
- Hopt, A., S. Korte, et al. (2003). "Methods for studying synaptosomal copper release." J Neurosci Methods **128**(1-2): 159-172.
- Hu, X., C. W. Hicks, et al. (2006). "Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system." Nat Neurosci **9**(12): 1520-1525.
- Hu, X., X. Zhou, et al. (2010). "BACE1 Deficiency Causes Altered Neuronal Activity and Neurodegeneration." J Neurosci **30**(26): 8819-8829.
- Huang, X., M. P. Cuajungco, et al. (1999). "Cu(II) potentiation of alzheimer abeta neurotoxicity. Correlation with cell-free hydrogen peroxide production and metal reduction." J Biol Chem **274**(52): 37111-37116.
- Hung, Y. H., A. I. Bush, et al. (2010). "Copper in the brain and Alzheimer's disease." J Biol Inorg Chem **15**(1): 61-76.
- Huse, J. T., D. S. Pijak, et al. (2000). "Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase." J Biol Chem **275**(43): 33729-33737.
- Hussain, I., D. Powell, et al. (1999). "Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase." Mol Cell Neurosci **14**(6): 419-427.
- Ida, N., T. Hartmann, et al. (1996). "Analysis of heterogeneous A4 peptides in human cerebrospinal fluid and blood by a newly developed sensitive Western blot assay." J Biol Chem **271**(37): 22908-22914.
- Jansen, M. (1987). "Homoatomic D10-D10 Interactions - Their Effects on Structure and Chemical and Physical-Properties." Angewandte Chemie-International Edition in English **26**(11): 1098-1110.

- Jin, S., K. Agerman, et al. (2010). "Evidence for dimeric BACE-mediated APP processing." Biochem Biophys Res Commun.
- Joutel, A. and E. Tournier-Lasserre (1998). "Notch signalling pathway and human diseases." Semin Cell Dev Biol **9**(6): 619-625.
- Kaden, D., L. M. Munter, et al. (2008). "Homophilic interactions of the amyloid precursor protein (APP) ectodomain are regulated by the loop region and affect beta-secretase cleavage of APP." J Biol Chem **283**(11): 7271-7279.
- Kaden, D., P. Voigt, et al. (2009). "Subcellular localization and dimerization of APLP1 are strikingly different from APP and APLP2." J Cell Sci **122**(Pt 3): 368-377.
- Kanaya, E., S. Kanaya, et al. (1990). "Introduction of a non-native disulfide bridge to human lysozyme by cysteine scanning mutagenesis." Biochem Biophys Res Commun **173**(3): 1194-1199.
- Kang, E. L., A. N. Cameron, et al. (2010). "Ubiquitin regulates GGA3-mediated degradation of BACE1." J Biol Chem.
- Kessler, H., T. A. Bayer, et al. (2008a). "Intake of copper has no effect on cognition in patients with mild Alzheimer's disease: a pilot phase 2 clinical trial." J Neural Transm **115**(8): 1181-1187.
- Kessler, H., F. G. Pajonk, et al. (2008b). "Effect of copper intake on CSF parameters in patients with mild Alzheimer's disease: a pilot phase 2 clinical trial." J Neural Transm **115**(12): 1651-1659.
- Kessler, H., F. G. Pajonk, et al. (2005). "[The role of copper in the pathophysiology of Alzheimer's disease]." Nervenarzt **76**(5): 581-585.
- Kim, D. Y., L. A. Ingano, et al. (2005). "Presenilin/gamma-secretase-mediated cleavage of the voltage-gated sodium channel beta2-subunit regulates cell adhesion and migration." J Biol Chem **280**(24): 23251-23261.
- Kitazume, S., Y. Tachida, et al. (2003). "Characterization of alpha 2,6-sialyltransferase cleavage by Alzheimer's beta -secretase (BACE1)." J Biol Chem **278**(17): 14865-14871.
- Kittleson, J. T., I. R. Loftin, et al. (2006). "Periplasmic metal-resistance protein CusF exhibits high affinity and specificity for both CuI and AgI." Biochemistry **45**(37): 11096-11102.
- Kodama, H., I. Okabe, et al. (1988). "Does CSF copper level in Wilson disease reflect copper accumulation in the brain?" Pediatr Neurol **4**(1): 35-37.
- Kopan, R. and M. X. Ilagan (2004). "Gamma-secretase: proteasome of the membrane?" Nat Rev Mol Cell Biol **5**(6): 499-504.
- La Fontaine, S. and J. F. Mercer (2007). "Trafficking of the copper-ATPases, ATP7A and ATP7B: role in copper homeostasis." Arch Biochem Biophys **463**(2): 149-167.
- Lackowicz, J. R., Ed. (2006). Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd Ed. New York, Springer Science & Business Media.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lambert, J. C., S. Heath, et al. (2009). "Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease." Nat Genet **41**(10): 1094-1099.
- Lammich, S., E. Kojro, et al. (1999). "Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(7): 3922-3927.
- Lee, E. B., D. M. Skovronsky, et al. (2003). "Secretion and intracellular generation of truncated Abeta in beta-site amyloid-beta precursor protein-cleaving enzyme expressing human neurons." J Biol Chem **278**(7): 4458-4466.
- Leissring, M. A. (2008). "The AbetaCs of Abeta-cleaving proteases." J Biol Chem **283**(44): 29645-29649.

- Lemmon, M. A., J. M. Flanagan, et al. (1992). "Glycophorin A dimerization is driven by specific interactions between transmembrane alpha-helices." *J Biol Chem* **267**(11): 7683-7689.
- Lemmon, M. A., H. R. Treutlein, et al. (1994). "A dimerization motif for transmembrane alpha-helices." *Nat Struct Biol* **1**(3): 157-163.
- Li, Q. and T. C. Sudhof (2004). "Cleavage of amyloid-beta precursor protein and amyloid-beta precursor-like protein by BACE 1." *J Biol Chem* **279**(11): 10542-10550.
- Lichtenthaler, S. F., D. I. Dominguez, et al. (2003). "The cell adhesion protein P-selectin glycoprotein ligand-1 is a substrate for the aspartyl protease BACE1." *J Biol Chem* **278**(49): 48713-48719.
- Linder, M. (1991). "Biochemistry of copper." *Plenum Press, New York and London*: 1-13.
- Linder, M. C., L. Wooten, et al. (1998). "Copper transport." *Am J Clin Nutr* **67**(5 Suppl): 965S-971S.
- Lindley, P. F. (2001). *Handbook of metalloproteins*.
- Loftin, I. R., N. J. Blackburn, et al. (2009). "Tryptophan Cu(I)-pi interaction fine-tunes the metal binding properties of the bacterial metallochaperone CusF." *J Biol Inorg Chem* **14**(6): 905-912.
- Loftin, I. R., S. Franke, et al. (2007). "Unusual Cu(I)/Ag(I) coordination of Escherichia coli CusF as revealed by atomic resolution crystallography and X-ray absorption spectroscopy." *Protein Sci* **16**(10): 2287-2293.
- Lovell, M. A., J. D. Robertson, et al. (1998). "Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques." *J Neurol Sci* **158**(1): 47-52.
- Lu, Q. and C. Miller (1995). "Silver as a probe of pore-forming residues in a potassium channel." *Science* **268**(5208): 304-307.
- Lutsenko, S., E. S. LeShane, et al. (2007). "Biochemical basis of regulation of human copper-transporting ATPases." *Arch Biochem Biophys* **463**(2): 134-148.
- Macia, E., M. Ehrlich, et al. (2006). "Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin." *Dev Cell* **10**(6): 839-850.
- MacKenzie, K. R., J. H. Prestegard, et al. (1997). "A transmembrane helix dimer: structure and implications." *Science* **276**(5309): 131-133.
- Marlow, L., M. Cain, et al. (2003). "Beta-secretase processing of the Alzheimer's amyloid protein precursor (APP)." *J Mol Neurosci* **20**(3): 233-239.
- Masters, C. L., G. Simms, et al. (1985). "Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome." *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(12): 4245-4249.
- Maurer, K., S. Volk, et al. (1997). "Auguste D and Alzheimer's disease." *Lancet* **349**(9064): 1546-1549.
- Maynard, C. J., R. Cappai, et al. (2002). "Overexpression of Alzheimer's disease amyloid-beta opposes the age-dependent elevations of brain copper and iron." *J Biol Chem* **277**(47): 44670-44676.
- McIntosh, P. R. and R. B. Freedman (1980). "Characteristics of a copper-dependent cross-linking reaction between two forms of cytochrome P-450 in rabbit-liver microsomal membranes." *Biochem J* **187**(1): 227-237.
- Menkes, J. H., M. Alter, et al. (1962). "A sex-linked recessive disorder with retardation of growth, peculiar hair, and focal cerebral and cerebellar degeneration." *Pediatrics* **29**: 764-779.
- Michikawa, M. (2004). "Neurodegenerative disorders and cholesterol." *Curr Alzheimer Res* **1**(4): 271-275.
- Mukherjee, A. and L. B. Hersh (2002). "Regulation of amyloid beta-peptide levels by enzymatic degradation." *J Alzheimers Dis* **4**(5): 341-348.
- Mullan, M., F. Crawford, et al. (1992). "A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid." *Nat Genet* **1**(5): 345-347.

- Multhaup, G., A. Schlicksupp, et al. (1996). "The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease in the reduction of copper(II) to copper(I)." *Science* **271**(5254): 1406-1409.
- Munter, L. M., P. Voigt, et al. (2007). "GxxxG motifs within the amyloid precursor protein transmembrane sequence are critical for the etiology of Abeta42." *EMBO J* **26**(6): 1702-1712.
- Murata, K., K. Mitsuoka, et al. (2000). "Structural determinants of water permeation through aquaporin-1." *Nature* **407**(6804): 599-605.
- Murphy, T., A. Yip, et al. (2001). "The BACE gene: genomic structure and candidate gene study in late-onset Alzheimer's disease." *Neuroreport* **12**(3): 631-634.
- Nicholls, A., G. B. McGaughey, et al. (2010). "Molecular shape and medicinal chemistry: a perspective." *J Med Chem* **53**(10): 3862-3886.
- Northrop, D. B. (2001). "Follow the protons: a low-barrier hydrogen bond unifies the mechanisms of the aspartic proteases." *Acc Chem Res* **34**(10): 790-797.
- O'Connor, T., K. R. Sadleir, et al. (2008). "Phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha increases BACE1 levels and promotes amyloidogenesis." *Neuron* **60**(6): 988-1009.
- O'Halloran, T. V. and V. C. Culotta (2000). "Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions." *J Biol Chem* **275**(33): 25057-25060.
- Ohgami, R. S., D. R. Campagna, et al. (2006). "The Steap proteins are metalloreductases." *Blood* **108**(4): 1388-1394.
- Panegyres, P. K., K. Zafiris-Toufexis, et al. (2000). "Amyloid precursor protein gene isoforms in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders." *J Neurol Sci* **173**(2): 81-92.
- Pearson, R. G. (1963). "Hard and Soft Acids and Bases." *Journal of the American Chemical Society* **85**(22): 3533-&.
- Postina, R., A. Schroeder, et al. (2004). "A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model." *J Clin Invest* **113**(10): 1456-1464.
- Puig, S., J. Lee, et al. (2002). "Biochemical and genetic analyses of yeast and human high affinity copper transporters suggest a conserved mechanism for copper uptake." *J Biol Chem* **277**(29): 26021-26030.
- Qi-Takahara, Y., M. Morishima-Kawashima, et al. (2005). "Longer forms of amyloid beta protein: implications for the mechanism of intramembrane cleavage by gamma-secretase." *J Neurosci* **25**(2): 436-445.
- Rahimi, F. and G. Bitan (2010). "Selection of Aptamers for Amyloid β-Protein, the Causative Agent of Alzheimer's Disease." *J Vis Exp*(39).
- Riddell, D. R., G. Christie, et al. (2001). "Compartmentalization of beta-secretase (Asp2) into low-buoyant density, noncaveolar lipid rafts." *Curr Biol* **11**(16): 1288-1293.
- Robberecht, W. (2000). "Oxidative stress in amyotrophic lateral sclerosis." *J Neurol* **247 Suppl 1**: I1-6.
- Rogers, S. L. and L. T. Friedhoff (1996). "The efficacy and safety of donepezil in patients with Alzheimer's disease: results of a US Multicentre, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. The Donepezil Study Group." *Dementia* **7**(6): 293-303.
- Rosen, W. G., R. C. Mohs, et al. (1984). "A new rating scale for Alzheimer's disease." *Am J Psychiatry* **141**(11): 1356-1364.
- Russ, W. P. and D. M. Engelman (2000). "The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association." *J Mol Biol* **296**(3): 911-919.
- Scheuermann, S., B. Hamsch, et al. (2001). "Homodimerization of amyloid precursor protein and its implication in the amyloidogenic pathway of Alzheimer's disease." *J Biol Chem* **276**(36): 33923-33929.

- Schmechel, A., M. Strauss, et al. (2004). "Human BACE forms dimers and colocalizes with APP." *J Biol Chem* **279**(38): 39710-39717.
- Schmidt, P. J., T. D. Rae, et al. (1999). "Multiple protein domains contribute to the action of the copper chaperone for superoxide dismutase." *J Biol Chem* **274**(34): 23719-23725.
- Scolari, S., S. Engel, et al. (2009). "Lateral distribution of the transmembrane domain of influenza virus hemagglutinin revealed by time-resolved fluorescence imaging." *J Biol Chem* **284**(23): 15708-15716.
- Selkoe, D. J. (2008). "Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior." *Behav Brain Res* **192**(1): 106-113.
- Selvaraj, A., K. Balamurugan, et al. (2005). "Metal-responsive transcription factor (MTF-1) handles both extremes, copper load and copper starvation, by activating different genes." *Genes Dev* **19**(8): 891-896.
- Senes, A., D. E. Engel, et al. (2004). "Folding of helical membrane proteins: the role of polar, GxxxG-like and proline motifs." *Curr Opin Struct Biol* **14**(4): 465-479.
- Senes, A., M. Gerstein, et al. (2000). "Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: the GxxxG motif occurs frequently and in association with beta-branched residues at neighboring positions." *J Mol Biol* **296**(3): 921-936.
- Senes, A., I. Ubarretxena-Belandia, et al. (2001). "The Calpha ---H...O hydrogen bond: a determinant of stability and specificity in transmembrane helix interactions." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(16): 9056-9061.
- Shah-Reddy, I., P. Khilanani, et al. (1980). "Serum copper levels in non-Hodgkin's lymphoma." *Cancer* **45**(8): 2156-2159.
- Shankar, G. M., B. L. Bloodgood, et al. (2007). "Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway." *J Neurosci* **27**(11): 2866-2875.
- Shannon, R. D. (1976). "Revised Effective Ionic-Radii and Systematic Studies of Interatomic Distances in Halides and Chalcogenides." *Acta Crystallographica Section A* **32**(Sep1): 751-767.
- Shi, X. P., E. Chen, et al. (2001). "The pro domain of beta-secretase does not confer strict zymogen-like properties but does assist proper folding of the protease domain." *J Biol Chem* **276**(13): 10366-10373.
- Shi, X. P., K. Tugusheva, et al. (2003). "Beta-secretase cleavage at amino acid residue 34 in the amyloid beta peptide is dependent upon gamma-secretase activity." *J Biol Chem* **278**(23): 21286-21294.
- Shiba, T., S. Kametaka, et al. (2004). "Insights into the phosphoregulation of beta-secretase sorting signal by the VHS domain of GGA1." *Traffic* **5**(6): 437-448.
- Shibata, N., A. Hirano, et al. (2000). "Superoxide dismutase-1 mutation-related neurotoxicity in familial amyotrophic lateral sclerosis." *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* **1**(3): 143-161.
- Sidera, C., C. Liu, et al. (2002). "Pro-domain removal in ASP-2 and the cleavage of the amyloid precursor are influenced by pH." *BMC Biochem* **3**: 25.
- Simons, K. and E. Ikonen (1997). "Functional rafts in cell membranes." *Nature* **387**(6633): 569-572.
- Sinha, S., J. P. Anderson, et al. (1999). "Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain." *Nature* **402**(6761): 537-540.
- Sisodia, S. S. (1999). "Alzheimer's disease: perspectives for the new millennium." *J Clin Invest* **104**(9): 1169-1170.
- Small, D. H., V. Nurcombe, et al. (1994). "A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth." *J Neurosci* **14**(4): 2117-2127.

- Smith, D. P., G. D. Ciccotosto, et al. (2007). "Concentration dependent Cu²⁺ induced aggregation and dityrosine formation of the Alzheimer's disease amyloid-beta peptide." *Biochemistry* **46**(10): 2881-2891.
- Soba, P., S. Eggert, et al. (2005). "Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion." *EMBO J* **24**(20): 3624-3634.
- Sorbi, S., P. Forleo, et al. (2001). "Genetic risk factors in familial Alzheimer's disease." *Mech Ageing Dev* **122**(16): 1951-1960.
- Soskine, M., S. Steiner-Mordoch, et al. (2002). "Crosslinking of membrane-embedded cysteines reveals contact points in the EmrE oligomer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(19): 12043-12048.
- Soto, C., E. M. Castano, et al. (1995). "The alpha-helical to beta-strand transition in the amino-terminal fragment of the amyloid beta-peptide modulates amyloid formation." *J Biol Chem* **270**(7): 3063-3067.
- Southon, A., A. Farlow, et al. (2008). "Malvolio is a copper transporter in Drosophila melanogaster." *J Exp Biol* **211**(Pt 5): 709-716.
- Sturchler-Pierrat, C., D. Abramowski, et al. (1997). "Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(24): 13287-13292.
- Takami, M., Y. Nagashima, et al. (2009). "gamma-Secretase: successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of beta-carboxyl terminal fragment." *J Neurosci* **29**(41): 13042-13052.
- Tamagno, E., P. Bardini, et al. (2002). "Oxidative stress increases expression and activity of BACE in NT2 neurons." *Neurobiol Dis* **10**(3): 279-288.
- Tamagno, E., M. Guglielmotto, et al. (2008). "Oxidative stress activates a positive feedback between the gamma- and beta-secretase cleavages of the beta-amyloid precursor protein." *J Neurochem* **104**(3): 683-695.
- Tanahashi, H. and T. Tabira (2001). "Three novel alternatively spliced isoforms of the human beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme (BACE) and their effect on amyloid beta-peptide production." *Neurosci Lett* **307**(1): 9-12.
- Tanzi, R. E., A. I. McClatchey, et al. (1988). "Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease." *Nature* **331**(6156): 528-530.
- Tesco, G., Y. H. Koh, et al. (2007). "Depletion of GGA3 stabilizes BACE and enhances beta-secretase activity." *Neuron* **54**(5): 721-737.
- Thomas, R. S., J. E. Liddell, et al. (2006). "An antibody to the beta-secretase cleavage site on amyloid-beta-protein precursor inhibits amyloid-beta production." *J Alzheimers Dis* **10**(4): 379-390.
- Thompson, H. M. and M. A. McNiven (2006). "Discovery of a new 'dynasore'." *Nat Chem Biol* **2**(7): 355-356.
- Thorpe, H. M. and M. C. Smith (1998). "In vitro site-specific integration of bacteriophage DNA catalyzed by a recombinase of the resolvase/invertase family." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(10): 5505-5510.
- Tuerk, C. and L. Gold (1990). "Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase." *Science* **249**(4968): 505-510.
- Tun, H., L. Marlow, et al. (2002). "Lipid rafts play an important role in A beta biogenesis by regulating the beta-secretase pathway." *J Mol Neurosci* **19**(1-2): 31-35.
- Valko, M., H. Morris, et al. (2005). "Metals, toxicity and oxidative stress." *Curr Med Chem* **12**(10): 1161-1208.
- Van Der Spoel, D., E. Lindahl, et al. (2005). "GROMACS: fast, flexible, and free." *J Comput Chem* **26**(16): 1701-1718.

- Vassar, R., B. D. Bennett, et al. (1999). "Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE." *Science* **286**(5440): 735-741.
- Vetrivel, K. S., X. Meckler, et al. (2009). "Alzheimer disease A β production in the absence of S-palmitoylation-dependent targeting of BACE1 to lipid rafts." *J Biol Chem* **284**(6): 3793-3803.
- Vilar, M., I. Charalampopoulos, et al. (2009). "Activation of the p75 neurotrophin receptor through conformational rearrangement of disulphide-linked receptor dimers." *Neuron* **62**(1): 72-83.
- Voigt, P., C. Brock, et al. (2005). "Assigning functional domains within the p101 regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase gamma." *J Biol Chem* **280**(6): 5121-5127.
- von Arnim, C. A., M. M. Tangredi, et al. (2004). "Demonstration of BACE (beta-secretase) phosphorylation and its interaction with GGA1 in cells by fluorescence-lifetime imaging microscopy." *J Cell Sci* **117**(Pt 22): 5437-5445.
- Wahle, T., K. Prager, et al. (2005). "GGA proteins regulate retrograde transport of BACE1 from endosomes to the trans-Golgi network." *Mol Cell Neurosci* **29**(3): 453-461.
- Walsh, D. M., I. Klyubin, et al. (2002). "Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo." *Nature* **416**(6880): 535-539.
- Walter, J., R. Fluhrer, et al. (2001). "Phosphorylation regulates intracellular trafficking of beta-secretase." *J Biol Chem* **276**(18): 14634-14641.
- Walters, R. F. and W. F. DeGrado (2006). "Helix-packing motifs in membrane proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(37): 13658-13663.
- Weidemann, A., S. Eggert, et al. (2002). "A novel epsilon-cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing." *Biochemistry* **41**(8): 2825-2835.
- Westmeyer, G. G., M. Willem, et al. (2004). "Dimerization of beta-site beta-amyloid precursor protein-cleaving enzyme." *J Biol Chem* **279**(51): 53205-53212.
- Willem, M., A. N. Garratt, et al. (2006). "Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1." *Science* **314**(5799): 664-666.
- Williams, R. J. P. (1983a). "Inorganic elements in biological space and time." *Pure Appl. Chem.* **55**(1089).
- Williams, R. J. P. (1983b). "The Symbiosis of Metal-Ion and Protein Chemistry." *Pure and Applied Chemistry* **55**(1): 35-46.
- Williams, R. J. P. (1990). "Bio-inorganic chemistry: Its conceptual evolution." *Coord. Chem. Rev.* **100**: 573.
- Wilson, R. S., C. F. Mendes De Leon, et al. (2002). "Participation in cognitively stimulating activities and risk of incident Alzheimer disease." *JAMA* **287**(6): 742-748.
- Wilson, S. A. K. (1912). "Progressive lenticular degeneratio. A familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver." *Brain (Ph.D. thesis), Oxford*: 295-507.
- Wolfe, M. S. (2008). "Gamma-secretase inhibition and modulation for Alzheimer's disease." *Curr Alzheimer Res* **5**(2): 158-164.
- Wong, H. K., T. Sakurai, et al. (2005). "beta Subunits of voltage-gated sodium channels are novel substrates of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme (BACE1) and gamma-secretase." *J Biol Chem* **280**(24): 23009-23017.
- Xue, Y., A. V. Davis, et al. (2008). "Cu(I) recognition via cation-pi and methionine interactions in CusF." *Nat Chem Biol* **4**(2): 107-109.
- Yan, R., M. J. Bienkowski, et al. (1999). "Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity." *Nature* **402**(6761): 533-537.
- Yang, L. B., K. Lindholm, et al. (2003). "Elevated beta-secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease." *Nat Med* **9**(1): 3-4.

- Zacharias, D. A., J. D. Violin, et al. (2002). "Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells." *Science* **296**(5569): 913-916.
- Zak, B. (1958). "Simple procedure for the single sample determination of serum copper and iron." *Clin Chim Acta* **3**(4): 328-334.
- Zhao, G., G. Mao, et al. (2004). "Identification of a new presenilin-dependent zeta-cleavage site within the transmembrane domain of amyloid precursor protein." *J Biol Chem* **279**(49): 50647-50650.
- Zhao, J., Y. Fu, et al. (2007). "Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 levels become elevated in neurons around amyloid plaques: implications for Alzheimer's disease pathogenesis." *J Neurosci* **27**(14): 3639-3649.
- Zhou, H., K. M. Cadigan, et al. (2003). "A copper-regulated transporter required for copper acquisition, pigmentation, and specific stages of development in *Drosophila melanogaster*." *J Biol Chem* **278**(48): 48210-48218.
- Zhou, Y. and W. Chen (2007). "Novel neutral octanuclear copper(I) complexes stabilized by pyridine linked bis(pyrazolate) ligands." *Dalton Transactions*(44): 5123-5125.

7 ANHANG

7.1 Abkürzungsverzeichnis

6H	hexa-His tag
Ac	Acetat
AD	<i>Alzheimer's Disease</i>
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i>
ADAM	<i>A Disintegrin and Metalloprotease</i>
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäurerest(e)
BACE1	<i>β-Site APP-Cleaving Enzyme 1</i>
BACE1-NT	lösliche Ektodomäne von BACE1
BBS	<i>Bis-Tris-Buffered Saline</i> (Bis-Tris-gepufferte Salzlösung)
Bis-Tris	2,2-Bis-(Hydroxyethyl)-(iminotris)-(hydroxymethyl)methan
bp	Basenpaare
BCS	Bathocuproindisulfonsäure
β MCE	β -Mercaptoethanol
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
°C	Grad Celsius
CFP	<i>Cyan Fluorescent Protein</i>
CCS	<i>Copper Chaperone of the SOD1</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N',N'-tetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FAD	<i>Familial Alzheimer's Disease</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> (Fötales Kälberserum)
FLIM	<i>Fluorescence Life-Time Imaging Microscopy</i>
FPLC	<i>Fast Pressure Liquid Chromatography</i>
FRET	<i>Förster (Fluorescence) Resonance Energy Transfer</i>
g	Erdbeschleunigung
GGA	<i>Golgi-Localized, γ-Ear-Containing, ARF-Binding Protein</i>
GPI	Glycosylphosphatidylinositol

h	Stunde
HA	Hemagglutinin
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
Ig	Immunglobulin
IRF	<i>Instrument Response Function</i>
IMAC	Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie
Kana	Kanamycin
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LTP	<i>Long-Term Potentiation</i>
M	Molar (Mol pro Liter)
mA	Milliampere
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight</i>
mAb	<i>Monoclonal Antibody</i> (Monoklonaler Antikörper)
MG	Molekulargewicht
mRNA	<i>Messenger RNA</i> (Boten-RNA)
MS	Massenspektrometrie
NC	Nitrocellulose
nm	Nanometer
ns	Nanosekunde(n)
pAb	<i>Polyclonal Antibody</i> (Polyklonaler Antikörper)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PEI	Polyethylenimin
PP	Probenpuffer
RFU	<i>Relative Fluorescence Units</i>
RT	Raumtemperatur
RU	<i>Response Units</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
SOD1	Superoxid Dismutase 1 (Cu, Zn-SOD1)
TACE	<i>Tumor Necrosis Factor α Converting Enzyme</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TM	Transmembran
TMH	Transmembranhelix
TMS	Transmembransequenz

Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TOF	<i>Time of Flight</i>
Tween-20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	<i>Unit(s)</i> (Einheit(en))
(v/v)	Volumenanteil am Gesamtvolumen
(w/v)	Gewichtsanteil am Gesamtvolumen
YFP	<i>Yellow Fluorescent Protein</i>

7.2 Kodierung von Nukleinsäuren und Aminosäuren

7.2.1 Ein-Buchstabencode für die vier Basen der Desoxyribonukleinsäure

DNA-Base	Abkürzung
Adenin	A
Thymin	T
Cytosin	C
Guanin	G

Eine komplementäre Watson-Crick-Paarung besteht aus jeweils 2 Wasserstoffbrückenbindungen zwischen A und T bzw. 3 Wasserstoffbrückenbindungen zwischen G und C in einem DNA-Doppelstrang.

7.2.2 Ein- und Drei-Buchstabencode der proteinogenen Aminosäuren

Name	3-Buchstaben-Code	1-Buchstaben-Code	Eigenschaft der Seitenkette	Molmasse in g/mol	Isoelektrischer Punkt
Alanin	Ala	A	hydrophob	89,09	6,11
Glycin	Gly	G	hydrophil	75,07	6,06
Valin	Val	V	hydrophob	117,15	6,00
Leucin	Leu	L	hydrophob	131,17	6,01
Isoleucin	Ile	I	hydrophob	131,17	6,05
Phenylalanin	Phe	F	hydrophob, aromatisch	165,19	5,49
Tyrosin	Tyr	Y	hydrophil,	181,19	5,64
Tryptophan	Trp	W	hydrophob,	204,23	5,89
Aspartat	Asp	D	sauer	133,10	2,85
Glutamat	Glu	E	sauer	147,13	3,15
Asparagin	Asn	N	hydrophil	132,12	5,41
Glutamin	Gln	Q	hydrophil	146,15	5,65
Serin	Ser	S	hydrophil	105,09	5,68
Threonin	Thr	T	hydrophil	119,12	5,60
Cystein	Cys	C	hydrophil	121,16	5,05
Methionin	Met	M	hydrophob	149,21	5,74
Histidin	His	H	basisch	155,16	7,60
Arginin	Arg	R	basisch	174,20	10,76
Lysin	Lys	K	basisch	146,19	9,60
Prolin	Pro	P	hydrophob	115,13	6,30

Quelle: Modifiziert nach de.wikipedia.org

7.3 Verwendete Primer für Klonierungen und Mutagenesereaktionen

Name (Mutationen)	Primersequenzen 5'->3'
Y460A fw	CATGACCATAGCCGCTGTCATGGCTGCCATC
Y460A rev	GATGGCAGCCATGACAGCGGCTATGGTCATG
M462A fw	CATAGCCTATGTCGCAGCTGCCATCTGC
M462A rev	GCAGATGGCAGCTGCGACATAGGCTATG
C466A fw	CATGGCTGCCATCGCAGCCCTCTTCATG
C466A rev	CATGAAGAGGGCTGCGATGGCAGCCATG
M470A fw	CTGCGCCCTCTTCGCCCTGCCACTCTGC
M470A rev	GCAGAGTGGCAGGGCGAAGAGGGCGCAG
C474A fw	CATGCTGCCACTCGCCCTCATGGTGTGTC
C474A rev	GACACACCATGAGGGCGAGTGGCAGCATG
M462C / C466A fw	CATAGCCTATGTCTGCGCTGCCATCGCAGCCCTCTTCATG
M462C / C466A rev	CATGAAGAGGGCTGCGATGGCAGCGCAGACATAGGCTATG
A463C / C466A fw	GCCTATGTCATGTGCGCCATCGCAGCCCTCTTCATG
A463C / C466A rev	CATGAAGAGGGCTGCGATGGCGCACATGACATAGGC
A464C / C466A fw	CTATGTCATGGCTTGCATCGCAGCCCTCTTCATG
A464C / C466A rev	CATGAAGAGGGCTGCGATGCAAGCCATGACATAG
I465C fw	CTATGTCATGGCTGCCTGCGCAGCCCTCTTCATG
I465C rev	CATGAAGAGGGCTGCGCAGGCAGCCATGACATAG
C466I fw	CATGGCTGCCATCATCGCCCTCTTCATG
C466I rev	CATGAAGAGGGCGATGATGGCAGCCATG
A467C / C466A fw	CATGGCTGCCATCGCATGCTCTTCATGCTG
A467C / C466A rev	CAGCATGAAGAGGCATGCGATGGCAGCCATG
L468C / C466A fw	CATGGCTGCCATCGCAGCCTGCTTCATGCTGCC
L468C / C466A rev	GGCAGCATGAAGCAGGCTGCGATGGCAGCCATG
F469C / C466A fw	CATGGCTGCCATCGCAGCCCTCTGCATGCTGCCACTC
F469C / C466A rev	GAGTGGCAGCATGCAGAGGGCTGCGATGGCAGCCATG
M470C / C466A fw	CATGGCTGCCATCGCAGCCCTCTTCTGCCTGCCACTCTG
M470 / C466A rev	CAGAGTGGCAGGCAGAAGAGGGCTGCGATGGCAGCCATG
attB2 BACEwt hexa-His tag rev (Primer1)	TGATGGTGATGATGGCCCTGAAAATAAAGATTCTCCTTCAGCAGGGAGATGTCATCAG
attB2 BACEwt hexa-His tag rev (Primer2)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCAGTGGTGATGGTGATGATGGCCCTG
attB1 BACEwt fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCAGGAATTCATGGCCCAAGCC
attB2 BACEwt nostop rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACTTCAGCAGGGAGATGTCATC

7.4 Veröffentlichungen

7.4.1 Artikel

Wirhth O, **Bethge T**, Marcello A, Harmeier A, Jawhar S, Lucassen PJ, Multhaup G, Brody DL, Esparza T, Ingelsson M, Kalimo H, Lannfelt L, Bayer TA: "Pyroglutamate Abeta pathology in APP/PS1KI mice, sporadic and familial Alzheimer's disease cases", *J Neural Transm* (2010) 117: 85–96.

Kaden D, Munter LM, Joshi M, Treiber C, Weise C, **Bethge T**, Voigt P, Schaefer M, Beyermann M, Reif B, Gerd Multhaup: "Homophilic Interactions of the Amyloid Precursor Protein (APP) Ectodomain Are Regulated by the Loop Region and Affect β -Secretase Cleavage of APP", *JBC* (2008) 283(11): 7271–7279.

Bethge T, Scolari S, Hildebrand PW, Barucker C, Harmeier A, Herrmann A, Multhaup G: "Oligomerization of BACE1 demonstrated by a novel copper-driven crosslink within the TMS and by FLIM-FRET in living cells increases APP cleavage" (in Vorbereitung).

7.4.2 Konferenzbeiträge

Vortrag bei der NEURAD Summer School 2009 in Lille, Frankreich: "Strangers in the membrane—The role of transmembrane cysteines for BACE1oligomerization".

Posterbeitrag beim Fabisch Symposium 2009 in Berlin, Deutschland: "The role of transmembrane cysteines and copper for BACE1oligomerization".

Posterbeitrag beim International Copper Meeting 2008 in Alghero, Italien: "BACE1 binds copper and dimerizes upon copper exposure: A link between altered copper metabolism and Alzheimer's disease?".

Posterbeitrag bei der NEURAD Summer School 2008 in Leuven, Belgien: "BACE1 binds copper: A putative link for altered copper levels in Alzheimer's disease?".

7.5 Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel verfasst habe.

Ich versichere, dass diese Arbeit noch keiner anderen Universität vorgelegt wurde.

Berlin, 20.09.2010

Tobias Bethge

8 DANKSAGUNG

Mein erster großer Dank gebührt Prof. Dr. Gerd Multhaup für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe unter optimalen Bedingungen an einem spannenden Thema zu forschen. Die Offenheit für konstruktive Diskussionen und die Freiheit, neue Ideen ausprobieren zu können, habe ich sehr genossen.

Weiterhin möchte ich Prof. Dr. Ferdinand Hucho für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Meinen aktuellen und ehemaligen Arbeitskollegen der AG Multhaup Veit Althoff, Hermann Bayer, Gerhard Buchlow, Christian Barucker, Anne Botev, Paul Dembny, Vivienne Engelschalt, Susanne Fehse, Boas Felmy, Dr. Anja Harmeier, Dr. Daniela Kaden, Dr. Matthias Kaup, Magnus Mayer, Dr. Lisa Münter, Luise Richter, Clara Schäfer, Andrea Senge, Dr. Christoph Weise und Thomas Wons möchte ich für eine angenehme, freundschaftliche und oft humorvolle Arbeitsatmosphäre danken. Ein besonders dickes Dankeschön für unschätzbare Hilfe beim Korrekturlesen dieser Arbeit geht an Dr. Anja Harmeier und Christian Barucker, ohne deren Hilfe ich noch eine Weile länger im Buchstaben- und Kommadickicht stecken geblieben wäre. Aber auch Dr. Lisa Münter und Dr. Chris Weise zeichneten sich stets durch Diskussions- und Hilfsbereitschaft aus. Vielen Dank dafür. Bei Andrea Senge möchte ich mich für unzählige Gele, literweise Puffer und zahlreiche Zellkultur-Hilfseinsätze bedanken. Eine große Hilfe waren außerdem meine Mitarbeitsstudenten Aaron Hahn, Benno Kuroпка, Johanna Dörsing und Katharina Grauel. Vielen Dank auch an Jan Börgermann und Daniel Horbelt, die mich arbeitsgruppenübergreifend mit Rat, Tat, Feierabendbier und Kicker begleitet haben.

Zu besonderem Dank bin ich meinen Kooperationspartnern verpflichtet, die der Arbeit Interdisziplinarität und somit eine höhere Qualität verliehen haben. Allen voran sind hier Prof. Dr. Walter Schaffner und seine Mitarbeiter Dr. Haiqing Hua und Dr. Oleg Georgiev zu nennen, bei denen ich eine tolle und lehrreiche Zeit in Zürich verbringen und die Vorzüge von *Drosophila melanogaster* und Schneeschuhwandern kennenlernen durfte. Darüber hinaus möchte ich Prof. Dr. Andreas Herrmann und Dr. Silvia Scolari danken, die mir mit viel Geduld und einem Schuss italienischem Temperament einen Einstieg in die Welt der Biophysik ermöglicht haben. Dr. Peter Hildebrand möchte ich für die enthusiastische und offene Zusammenarbeit bei der Erstellung eines Computermodells und für eine unermüdliche Diskussionsbereitschaft danken. Prof. Dr. Thomas Bayer danke ich für ein fruchtbares Seitenprojekt und die freundliche Aufnahme und Betreuung im Rahmen des NEURAD-Programms. Außerdem möchte ich Prof. Dr. Ulrich Abram für seine Hilfestellung bei Fragen der anorganischen Chemie danken.

Last but not least möchte ich mich bei meiner Familie und meiner Partnerin Birte für die bedingungslose Unterstützung, Hilfsbereitschaft, Großzügigkeit und Nachsicht bedanken.