

**" Untersuchungen zur Charakterisierung von Bindungseigenschaften  
kompetitiver Inhibitoren tierischer Glutaminylzyklasen"**

K u m u l a t i v e   D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Dipl.-Ing. (FH) Birgit Koch

geb. am: 10. 04. 1980 in Merseburg

Gutachter

1. Prof. Dr. Hans-Ulrich Demuth

2. Prof. Dr. Markus Pietzsch

3. Prof. Dr. Dietmar Schomburg

Halle (Saale), 02. 02. 2015

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis .....	3
Tabellenverzeichnis.....	4
Abbildungsverzeichnis .....	5
1 Einleitung .....	6
1.1 QCs - Biokatalysatoren der N-terminalen Pyroglutamatbildung .....	10
1.2 QCs - Zielenzyme der Wirkstoffentwicklung .....	15
1.2.1 Rolle von QC bei der Reifung von Chemokinen .....	15
1.2.2 Hemmung von QC als Konzept zur Behandlung der Alzheimer-Krankheit.....	19
2 Stand der Forschung und Zielstellung der Arbeit .....	24
3 Tertiärstruktur der humanen QC sowie der homologen Enzyme aus <i>D. melanogaster</i> ....	27
3.1 Tierische QCs und Zn-abhängige bakterielle Aminopeptidasen: Vergleich von Topologie und Struktur der aktiven Zentren.....	27
3.2 Posttranslationale Modifikationen und deren Rolle für Struktur und Funktion der QCs aus Mensch und <i>D. melanogaster</i> .....	37
4 Evaluierung der Bindung des kompetitiven QC-Inhibitors PBD150 in Kristallstrukturen von QCs .....	42
5 Zusammenfassung .....	52
Literatur.....	55
Wissenschaftliche Publikationen.....	65
Erstautorenschaft .....	65
Koautorenschaft.....	66
Anhang .....	69
Eidesstattliche Erklärung.....	80
Lebenslauf .....	81
Danksagung.....	82
Angefügte Publikationen.....	83

## Abkürzungsverzeichnis

AK	Alzheimer-Krankheit ( <i>Alzheimer's disease</i> )
A $\beta$ , ABri, ADan	Amyloidpeptide der Alzheimer-Krankheit, der Britischen ~, Dänischen Demenz
ApP	Aminopeptidase P
ApS	Aminopeptidase S aus <i>Streptomyces griseus</i> (UniProt-Eintrag P80561)
CCL2/7/8/13	C-C-Motiv Ligand 2 / 7 / 8 / 13
CD	Circulardichroismus
C-Terminus / -terminal	Carboxyterminus einer Polypeptidkette bzw. dort befindlich
CX3C1	Fraktalkin (C-X3-C-Motiv Ligand 1)
DP4	Dipeptidylpeptidase 4
EC	Enzymklasse ( <i>enzyme class</i> )
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GnRH	Gonadoliberin
$k_{cat}$ *	Wechselzahl, Geschwindigkeitskonstante des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts der Reaktion
$K_i$ *	Inhibitor-konstante, Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes
$K_M$ *	Michaelis-Menten-Konstante, Substratkonzentration bei halbmaximaler Umsatzgeschwindigkeit
LAp	Leucyl-Amino-peptidase aus <i>Aeromonas proteolytica</i> (UniProt-Eintrag Q01693)
MALDI-TOF MS	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation Massenspektrometrie mit Flugzeitanalyse ( <i>matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight</i> )
Man	Mannose
N-Terminus / -terminal	Aminoterminus einer Polypeptidkette bzw. dort befindlich
PBD150	1-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-3-(3-imidazol-1-yl-propyl)-thioharnstoff
pE	Pyroglutamat
pK <sub>a</sub>	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante K <sub>a</sub>
PTM	posttranslationale Modifikation
QC, pl. QCs;	Glutaminylylzyklase,
DromeQC, hQC, mQC	<i>Drosophila melanogaster</i> QC, humane ~, murine ~, sekretierte Enzymspezies
isoQC; isoDromeQC,	intrazellulär lokalisierte Isoenzyme der jeweiligen
isohQC	Glutaminylylzyklase
QPCT	QC-Gen ( <i>glutaminylyl-peptide cyclotransferase</i> )
QPCTL	isoQC-Gen ( <i>glutaminylyl-peptide cyclotransferase like</i> )
TRH	Thyreoliberin

\* zur Erläuterung siehe Enzymkinetische Grundlagen, Seite 69

Aminosäuren werden im Einbuchstabencode gemäß den Empfehlungen zur Nomenklatur und Symbolik für Aminosäuren und Peptide der internationalen Kommission für biochemische Nomenklatur (JCBN, 1984) bezeichnet. Die Position innerhalb der unmodifizierten Primärsequenz der jeweiligen Aminosäurekette wird durch die hochgestellte Ziffer rechts des Symbols angegeben.

Die vierstelligen Bezeichnungen der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Protein-Röntgenkristallstrukturen, wie z.B. 3SIO oder 4F9U, sind der Proteindatenbank (PDB) der Forschungsgemeinschaft für strukturelle Bioinformatik (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics – RCSB) entnommen (www.pdb.org) (Berman et al., 2000).

Bei der farbigen Darstellung chemischer Strukturformeln wurde folgende Kodierung für Heteroatome verwendet: Sauerstoff – rot, Schwefel – gelb, Stickstoff – blau.

Zitate mit Eigenanteil sind kursiv hervorgehoben.

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Beispiele humaner, N-terminal pE-modifizierter Peptide und Proteine .....	8
Tabelle 2	Position der Aminosäuren des Zink-bindenden Motivs in der Primärsequenz.....	32
Tabelle 3	Dissoziationskonstante $K_i$ von PBD150 und verschiedenen tierischen QCs.....	47
Tabelle 4	Einfluss der hQC-Varianten auf $K_i$ kompetitiver Inhibitoren .....	50
Tabelle A1	Pflanzliche Proteine mit N-terminaler pE-Modifikation.....	71
Tabelle A2	Beispiele im Tierreich vorkommender pE-modifizierter Peptide und Proteine....	72
Tabelle A3	Chemische Bezeichnung und Strukturformeln der verwendeten kompetitiven hQC-Inhibitoren. ....	79

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Schematische Darstellung der Zyklisierung von Glutamin / Glutaminsäure am N-Terminus von Peptiden .....	10
Abbildung 2	Schematische Darstellung der Lokalisation von QCs, deren potentiellen Substraten und Katalyseprodukten .....	14
Abbildung 3	Schematische Darstellung der zur Arteriosklerose führenden Prozesse und einer möglichen Therapie mittels QC-Inhibitoren .....	16
Abbildung 4	Rolle der QC bei der Bildung von pE-A $\beta$ in der AK und vorgeschlagener therapeutischer Wirkmechanismus durch Hemmung der QC-Aktivität.....	22
Abbildung 5	Strukturmodell des QC-Inhibitors PBD150 .....	24
Abbildung 6*	Vergleich der Tertiärstruktur von hQC, DromeQC und isoDromeQC.....	28

Abbildung 7	Topologiediagramme von LAp, hQC, DromeQC und isoDromeQC .....	29
Abbildung 8*	Vergleich des Zn-bindenden Motivs von LAp, hQC, DromeQC und isoDromeQC .....	31
Abbildung 9*	Vergleich der <i>elec</i> -His-Zn Motive von hQC und LAp.....	32
Abbildung 10*	Schematische Darstellung der mutmaßlichen Enzym-Substrat-Interaktion und vorgeschlagener Katalysemechanismus der QCs vom Typ 2.....	33
Abbildung 11	Vergleich der Primärstruktur des C-terminalen Bereichs von hQC, isohQC, mQC, DromeQC und isoDromeQC.....	34
Abbildung 12*	Vergleich der Orientierungen von W <sup>207</sup> <sub>hQC</sub> in verschiedenen Kristallstrukturen .....	36
Abbildung 13*	Detailldarstellung der intramolekularen Disulfidbrücke der sekretierten hQC, mQC, DromeQC .....	37
Abbildung 14*	Schematische Darstellung der Glykosylierung der DromeQC.....	41
Abbildung 15*	Schematische Darstellung der potentiellen Interaktionsbereiche von hQC und kompetitiven Inhibitoren. ....	44
Abbildung 16*	Darstellung der Bindungsmodi des kompetitiven Inhibitors PBD150 in Röntgenkristallstrukturen verschiedener tierischer QCs .....	46
Abbildung 17	Darstellung der Interaktion des QC-Inhibitors PBD150 mit hQC und mQC....	48
Abbildung A1	Vergleich der Primärstrukturen von hQC, isohQC, mQC, DromeQC, isoDromeQC, sowie ApS .....	74
Abbildung A2	Graphische Darstellung der thermischen Strukturstabilität von hQC, DromeQC und isoDromeQC .....	75
Abbildung A3	Graphische Darstellung der Strukturstabilität gegenüber Guanidinhydrochlorid von hQC, DromeQC und isoDromeQC .....	76
Abbildung A4	Darstellung der SDS-PAGE–Analyse der Glykosylierung von DromeQC.....	77
Abbildung A5	Beitrag der Pharmakophoren zur Enzyminteraktion von PBD150 und abgeleiteten Strukturen .....	78

\* Darstellungen von Röntgenkristallstrukturen wurden mit dem Computerprogramm UCSF Chimera, Version 1.8.1 erzeugt und analysiert. Sekundärstrukturelemente wurden anhand des Kabsch und Sander Algorithmus zur Definition der Sekundärstruktur von Proteinen (Kabsch und Sander, 1983) mit den empfohlenen Parametern: 3 Aminosäuren als minimale Anzahl zur Bildung einer  $\alpha$ -Helix oder eines  $\beta$ -Faltblatts und einer maximalen Bindungsenergie von  $\leq -0,5 \text{ kcal/mol}$ ; definiert. Das Programm Chimera wurde von der Abteilung für die Berechnung biologischer Strukturen (Biocomputing), Visualisierung und Informatik der Universität von Kalifornien, San Francisco entwickelt (gefördert von NIGMS P41-GM103311).

## 1 Einleitung

Etwa 5% des Genoms höherer Eukaryonten kodieren Enzyme, die Proteine während oder nach deren Translation modifizieren (Walsh et al., 2005). Dies schließt unter anderem proteolytische Spaltungen (Abspalten von Signal-/Prosequenzen) oder die kovalente Verknüpfung mit nicht-proteinogenen Bestandteilen (Saccharide, Phosphatgruppen) ein. Derartige Veränderungen an Proteinen werden als posttranslationale Modifikationen (PTM) bezeichnet, von denen über 200 Formen bekannt sind. PTM beeinflussen die Proteinlokalisierung (z.B. Membrananker, Signalsequenzen, Glykosylierungen), die Proteininteraktion (z.B. Ligand – Rezeptor), die Aktivität (z.B. Phosphorylierung, Abspaltung von Prosequenzen) und die proteolytische/biologische Stabilität (z.B. C-terminale Amidierung, N-terminale Pyroglutamatbildung). Sie stellen dadurch einen wesentlichen Faktor für die Ausprägung von Funktion oder Pathofunktion von Proteinen und Peptiden dar. Eine dieser posttranslationalen Modifikationen ist die intramolekulare Zyklisierung eines Glutamins (Q) oder einer Glutaminsäure (E) unter Bildung von Pyroglutamat (pE) (Schilling et al., 2004). Pyroglutamat ist am N-Terminus von Peptiden und Proteinen vorzufinden. Die Bildungsreaktion wird durch das Enzym Glutaminylzyklase (QC, EC 2.3.2.5) katalysiert. QC-Aktivität wurde im Tier- (Busby et al., 1987; Fischer et al., 1987), Pflanzen- (Messer, 1963) und Bakterienreich (Carrillo et al., 2010; Huang et al., 2010) nachgewiesen. Die Bedeutung der QC für Prokaryonten konnte bislang nicht aufgeklärt werden. Bei den Enzymen pflanzlichen Ursprungs wird eine Beteiligung an Abwehrmechanismen vermutet (El Moussaoui et al., 2001; Azarkan et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass der bei der Zyklisierung von N-terminalem Glutamin freigesetzte Ammoniak das Mikroorganismenwachstum hemmt (Bañuelos et al., 2000). Auch an der pflanzlichen Pathogenabwehr beteiligte Proteine weisen eine N-terminale Modifikation mit Pyroglutamat auf (Tabelle A1, Seite 71). Die Rolle des pE-Restes ist bisher jedoch nicht untersucht worden.

Im Gegensatz zu den pflanzlichen QCs ist die Funktion der tierischen, speziell der humanen QC, eingehend erforscht und besser verstanden. Zu ihren Substraten zählen Strukturproteine (z. B. Kollagen Typ I/III, Fibronectin), Enzyme (z.B.  $\alpha$ -Amylase, Ribonuklease), Chemokine (z.B. CCL2, CX3CL1) und Neuropeptide (z.B. Thyreoliberin - TRH, Gonadoliberin - GnRH) (Tabelle 1, Seite 8). Für GnRH konnte gezeigt werden, dass ein N-terminaler Pyroglutamatrest die Rezeptorinteraktion beeinflusst (Sealfon et al., 1997). Gleichzeitig wird durch die pE-Bildung das Peptidhormon gegenüber einem Abbau durch Aminopeptidasen

stabilisiert (Morty et al., 2006). Dem entsprechend weist auch das GnRH-Analogen Leuprorelin, ein antiandrogener Arzneistoff, pE in seiner Struktur auf.

Eine Bildung von pE am Peptid-N-Terminus von TRH ist für dessen Rezeptorbindung und -aktivierung ebenfalls essentiell (Goren et al., 1977; Abraham und Podell, 1981). Gleichzeitig wird das Peptidhormon gegenüber einem Abbau durch kolokalisierte Aminopeptidasen stabilisiert (Morty et al., 2006).

Die Untersuchung des Chemokins CCL2 ergab, dass der N-terminale pE-Rest sowohl eine Verlängerung der biologischen Halbwertszeit (*in vitro* / *vivo*) als auch eine Steigerung der biologischen Aktivität bewirkt (Cynis et al., 2011). In jener Arbeit konnten Cynis und Mitarbeiter mittels MALDI-TOF MS *in vitro* zeigen, dass eine pE-Modifikation CCL2 und auch die verwandten Chemokine CCL7/8/13 vor dem Abbau durch die *in vivo* kolokalisierten Enzyme Aminopeptidase P (ApP, Prolylaminopeptidase) oder Dipeptidylpeptidase 4 (DP4) schützt. Mit Hilfe von Monozyten-Migrationsversuchen wurde nachgewiesen, dass pE-modifizierte Chemokine (CCL2/7/8/13) verglichen mit der „unreifen“ Form (Q<sup>1</sup>-CCL2/7/8/13) oder dem DP4-Abbauprodukt (D<sup>3</sup>-CCL2/8/13 bzw. V<sup>3</sup>-CCL7) verstärkt Chemotaxis auslösen.

Die pE-Modifikation von Peptiden/Proteinen spielt offenbar auch bei pathophysiologischen Prozessen eine Rolle. So konnte für amyloide Peptide (A $\beta$ , ABri, ADan) gezeigt werden, dass ein N-terminaler Pyroglutamatrest gegenüber dem Abbau durch Aminopeptidasen stabilisiert und deren Aggregationsneigung und Toxizität steigert (Schilling et al., 2006; Schlenzig et al., 2009; Wirths et al., 2009; Schlenzig et al., 2012). Eine Bildung derartig modifizierter Amyloidpeptide wird durch QC vermittelt (Schilling et al., 2008a, b). Die Expression des Enzyms ist bei AK-Patienten erhöht und korreliert mit der Anreicherung von pE-A $\beta$  im Hirn (Schilling et al., 2008a).

Vor dem Hintergrund der klinischen Entwicklung von QC-Inhibitoren befasst sich die vorliegende Arbeit mit der Aufklärung der Tertiärstruktur verschiedener tierischer QCs, um Bindungsmodi von Wirkstoffen zu untersuchen.

**Tabelle 1** Beispiele humaner, N-terminal pE-modifizierter Peptide und Proteine sowie deren Funktion und Rolle der pE-Modifikation. Unterhalb der generischen Bezeichnung ist die Nummer des jeweiligen UniProt-Datenbankeintrages (<http://www.uniprot.org>) aufgeführt. Da für die Modifikation des Peptids/Proteins durch QC-Aktivität nur der N-Terminus von Bedeutung ist, wurde lediglich ein kurzer N-terminaler Abschnitt der Aminosäuresequenz aufgeführt. Die der pE-Bildung zugrunde liegende Aminosäure (Q oder E) ist in eckigen Klammern angegeben (z.B. pE[Q]...). Die Ziffer rechts der Sequenz gibt die Gesamtlänge der Aminosäuresequenz des Proteins an.

Gruppe	Peptid/ Protein	Funktion/Eigenschaft des Peptids/Proteins	Sequenz	Rolle der pE-Modifikation*
Strukturproteine	Kollagen $\alpha$ -1(I) P02452	Fibrillen formendes Kollagen des Bindegewebes (Haut, Knochen, Sehnen)	pE[Q]LSYGYDEKS-1218 (Click und Bornstein, 1970)	Stabilisierung gegen den Abbau durch Aminopeptidasen
	Fibronektin P02751	Bindung verschiedener Zelloberflächenproteine (Kollagen, Fibrin, Heparin); involviert in die Zelladhäsion, Motilität, Opsonisierung, Wundheilung, Formgebung	pE[Q]AQQMVQPQS-2386 (Garcia-Pardo et al., 1983)	Stabilisierung gegen den Abbau durch Aminopeptidasen
	Fibromodulin Q06828	Bindet an Kollagen des Typs I und II; trägt zur Fibrillenbildung bei	pE[Q]YEDDPHWWF-376 (Önnerfjord et al., 2004)	Stabilisierung gegen den Abbau durch Aminopeptidasen
Enzyme	$\alpha$ -Amylase 1 P04745	Endohydrolyse von $\alpha$ (1-4)-Glykosidbindungen EC 3.2.1.1	pE[Q]YSSNTQQGR-511 (Ramasubbu et al., 1996)	Stabilisierung gegen den Abbau durch Aminopeptidasen
	Ribonuklease 4 P34096	Hydrolyse von Ribonukleinsäuren EC 3.1.27.-	pE[Q]DGMVQRFLR-147 (Zhou und Strydom, 1993)	Stabilisierung gegen den Abbau durch Aminopeptidasen; Enzymatische Aktivität (Boix et al., 1996)
Chemokine	CCL2 P13500	Attractant von Monozyten; mögliche Rolle bei durch Monozyteninfiltration gekennzeichneten Krankheiten (Psoriasis, rheumatoide Arthritis, Arteriosklerose)	pE[Q]PDAINAPVTCC-99 (Yoshimura und Leonard, 1991)	Stabilisierung gegen den Abbau durch Aminopeptidasen, z.B. ApP, DP4; Biologische Aktivität (Cynis et al., 2011)
	Fraktalkin CX3CL1 P78423	Löslich: Attractant von Monozyten, T-Lymphozyten; Membrangebunden: Adhäsion und Migration von Leukozyten entlang des Endothels	pE[Q]HHGVTKCNITC-397 (Haegle, 2012, Dissertation)	Stabilisierung gegen den Abbau durch Aminopeptidasen, z.B. ApP, DP4; Biologische Aktivität (Haegle, 2012, Dissertation)

Gruppe	Peptid/ Protein	Funktion/Eigenschaft des Peptids/Proteins	Sequenz	Rolle der pE-Modifikation*
Neuropeptide / Peptidhormone	Gonadoliberin GnRH P01148	Stimuliert hypophysäre Sekretion von Gonadotropinen	pE[Q]HWSYGLRPG-NH <sub>2</sub> (Tan und Rousseau, 1982)	Stabilisierung gegen den Abbau durch Aminopeptidasen (Schilling et al., 2011); Biologische Aktivität / Rezeptorinteraktion (Saelfon et al., 1997)
	Leuprorelin	Synthetisches GnRH-Analogon	pEHWSYdLLRP-NH-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	
	Thyreoliberin TRH <sup>~</sup> P20396	Stimuliert die hypophysäre Sekretion von Thyreotropin und Prolaktin	pE[Q]HP-NH <sub>2</sub> (Scharfmann et al., 1989)	Stabilisierung gegen den Abbau durch Aminopeptidasen; Biologische Aktivität / Rezeptorinteraktion (Goren et al., 1977; Abraham und Podell, 1981)
Amyloide Peptide	Aβ P05067	Amyloidpeptid, Ablagerung im Hirngewebe bei der Alzheimer-Krankheit (Amyloidplaques)	pE[E]FRHDSGYEV-40/42 (Saïdo et al., 1995)	Stabilisierung gegen den Abbau durch Aminopeptidasen; Steigerung der Aggregationsneigung (Schlenzig et al. 2009); und der Zytotoxizität (Wirths et al., 2009)
	ABri <sup>§</sup> Q9Y287 ADan <sup>§</sup> Q9Y287	Amyloidpeptide der Familiären Britischen bzw. Dänischen Demenz, Ablagerung im Hirngewebe und zerebralen Blutgefäßen	<sup>§</sup> pE[E]ASNCF-34 (Saul et al., 2013)	Stabilisierung gegen den Abbau durch Aminopeptidasen; Gesteigerte Aggregationsneigung (Schlenzig et al. 2009);
	Semenogelin P04279	Abgelagertes Protein der senilen seminal- vesikulären Amyloidose (SSVA) (Linke et al., 2005)	pE[Q]KGGSKGRLP-462 (pE-Modifikation durch Kokalisation mit QC- Aktivität wahrscheinlich)	Stabilisierung gegen den Abbau durch Aminopeptidasen
	β <sub>2</sub> -Mikroglobulin P61769	Abgelagertes Protein der Hämodialyse-assoziierten Amyloidose (HAA)	pE[Q]RTPKIQVYS-119 (Momoi et al., 1995)	Stabilisierung gegen den Abbau durch Aminopeptidasen

Fortsetzung von **Tabelle 1**

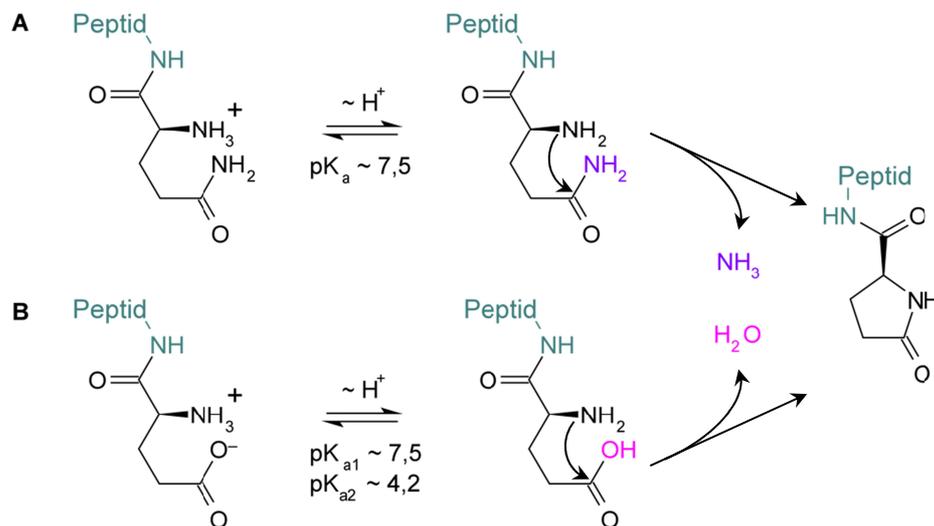
\* Der N-terminale pE-Rest kann durch Pyroglutamylaminopeptidase 1 (Q9NXJ5) abgespalten werden (Awadé et al., 1994; Cummins und O'Connor, 1998), was das Peptid/Protein dem Abbau durch Aminopeptidasen zugänglich macht.

<sup>~</sup>Spezifisch durch Pyroglutamylpeptidase 2 (Q9UKU6) inaktiviert (Schomburg et al., 1999)

<sup>§</sup> Beide Peptide gehen aus aus C-terminal verlängerten Varianten des integralen Membranproteins B2 hervor. Ihr N-Terminus ist identisch.

## 1.1 QCs - Biokatalysatoren der N-terminalen Pyroglutamatbildung

Pyroglutamat (pE) wird am N-Terminus von Peptiden oder Proteinen durch intramolekulare Zyklisierung von Glutamin (Q) oder Glutaminsäure (E) gebildet. Dabei greift die  $\alpha$ -Aminogruppe nukleophil am  $\gamma$ -Carboxykohlenstoff an. Es kommt zur Bildung eines Laktamrings, was unter Freisetzung von Ammoniak (Q) beziehungsweise Wasser (E) verläuft (Abbildung 1). Die Reaktion ist vom Protonierungszustand der reaktiven Gruppen und damit vom pH-Wert der wässrigen Lösung abhängig. Essentiell ist eine unprotonierte, das heißt nukleophile,  $\alpha$ -Aminogruppe ( $pK_a \approx 7,5$ ). Für die Umwandlung von Glutaminsäure ist zudem eine protonierte  $\gamma$ -Carboxygruppe notwendig ( $pK_{a2} \approx 4,2$ ) (Schilling et al., 2004) (Abbildung 1).



**Abbildung 1** Schematische Darstellung der Zyklisierung von Glutamin (A) beziehungsweise Glutaminsäure (B) am N-Terminus von Peptiden. Für den nukleophilen Angriff der  $\alpha$ -Aminogruppe am  $\gamma$ -Carboxykohlenstoff muss diese in unprotonierter Form vorliegen ( $pK_a \approx 7,5$ ). Die Zyklisierung von Glutaminsäure setzt zusätzlich eine protonierte  $\gamma$ -Carboxygruppe voraus ( $pK_{a2} \approx 4,2$ ). Als Produkte dieser Reaktion entstehen Pyroglutamat sowie Ammoniak (Q) oder Wasser (E). (Abbildung modifiziert, Seifert et al., 2009).

Im Bereich zwischen pH 6 und pH 8 beträgt die Halbwertszeit von Glutaminylpeptiden wenige Tage, von Glutamylpeptiden Jahrzehnte bei nicht katalysierter Reaktion (Arii et al., 1999; Seifert et al., 2009). Daher scheint die spontane pE-Bildung bei *in vivo* schnell ablaufenden Stoffwechselprozessen von untergeordneter Bedeutung zu sein. Die Reaktion wird durch Glutaminylzyklasen (QCs) um etwa das  $2 \cdot 10^7$ fache für Glutaminylsubstrate (QFRH:  $k_{cat} = 30s^{-1}$ ,  $K_M = 300 \mu M$  bei pH 6,5) beziehungsweise das  $2 \cdot 10^5$ fache für

Glutamylsubstrate (EFRH:  $k_{\text{cat}} = 2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ,  $K_M = 5000 \text{ } \mu\text{M}$  bei pH 6,5) beschleunigt (Seifert *et al.*, 2009).

Innerhalb der verschiedenen Reiche der Lebewesen bildeten sich zwei strukturell unterschiedliche Enzymgruppen gleicher Wirkungsspezifität aus (konvergente Entwicklung). QCs vom Typ 1 (Pflanzen-, Bakterienreich) entwickelten sich als eigenständige Enzymfamilie (Dahl *et al.*, 2000). Sie weisen keine strukturelle Homologie zu tierischen QCs oder anderen Enzymen auf. Die tierischen QCs sind dem QC-Typ 2 zuzuordnen, und zeigen eine strukturelle Ähnlichkeit zu den bakteriellen, zinkabhängigen Aminopeptidasen des Klans MH (Familie M28) (Rawlings *et al.*, 2012).

Durch Pyroglutamat modifizierte Peptide/Proteine sind im gesamten Tierreich vertreten (Tabelle A2, Seite 72). Die überwiegende Mehrheit dieser pE-modifizierten Peptide/Proteine unterliegt einer Translokation in den extrazellulären Raum. Während ihrer Sekretion durchlaufen diese Peptide/Proteine eine limitierte Proteolyse, in deren Folge der pE-Präkursor gebildet wird. In einigen Fällen ist allein die kotranslationale Spaltung durch Signalpeptidasen dafür verantwortlich. Dies ist zum Beispiel bei den humanen Proteinen Fibronectin, CCL2 und  $\alpha$ -Amylase der Fall (Tabelle 1, Seite 8). Bei anderen Peptiden/Proteinen (überwiegend Neuropeptide/Peptidhormone, z.B. TRH) ist eine weitere N-terminale Prozessierung der Präkursoren durch Prohormon-/Proproteinkonvertasen notwendig, um ein QC-Substrat zu generieren. Dies erfolgt im sekretorischen Weg der Zelle (Cynis *et al.*, 2011).

Säuger besitzen zwei homologe QCs (Busby *et al.*, 1987; Cynis *et al.*, 2008a). Während eine Enzymspezies ein Signalpeptid zum kotranslationalen Transport ins endoplasmatische Retikulum verbunden mit anschließender Sekretion aufweist (QC; Mensch: Gen QPCT, Chromosom 2), gehört das Isoenzym (isohQC; Mensch: Gen QPCTL, Chromosom 19) der Gruppe der Transmembranproteine der Klasse 2 an (Stephan *et al.*, 2009). Ein N-terminaler Signalanker vermittelt den kotranslationalen Transport ins endoplasmatische Retikulum und fixiert das Enzym in der Organellmembran, wobei der Protein-N-Terminus ins Zytosol ragt (globulärer Proteinteil luminal). Durch eine von Linkerproteinen vermittelte Kopplung des zytosolischen N-terminalen Proteinteils an Aktinfilamente des Zytoskeletts wird die isoQC im Golgi-Apparat der Zelle zurückgehalten (Abbildung 2, Seite 14) (Schilling, persönliche Mitteilung).

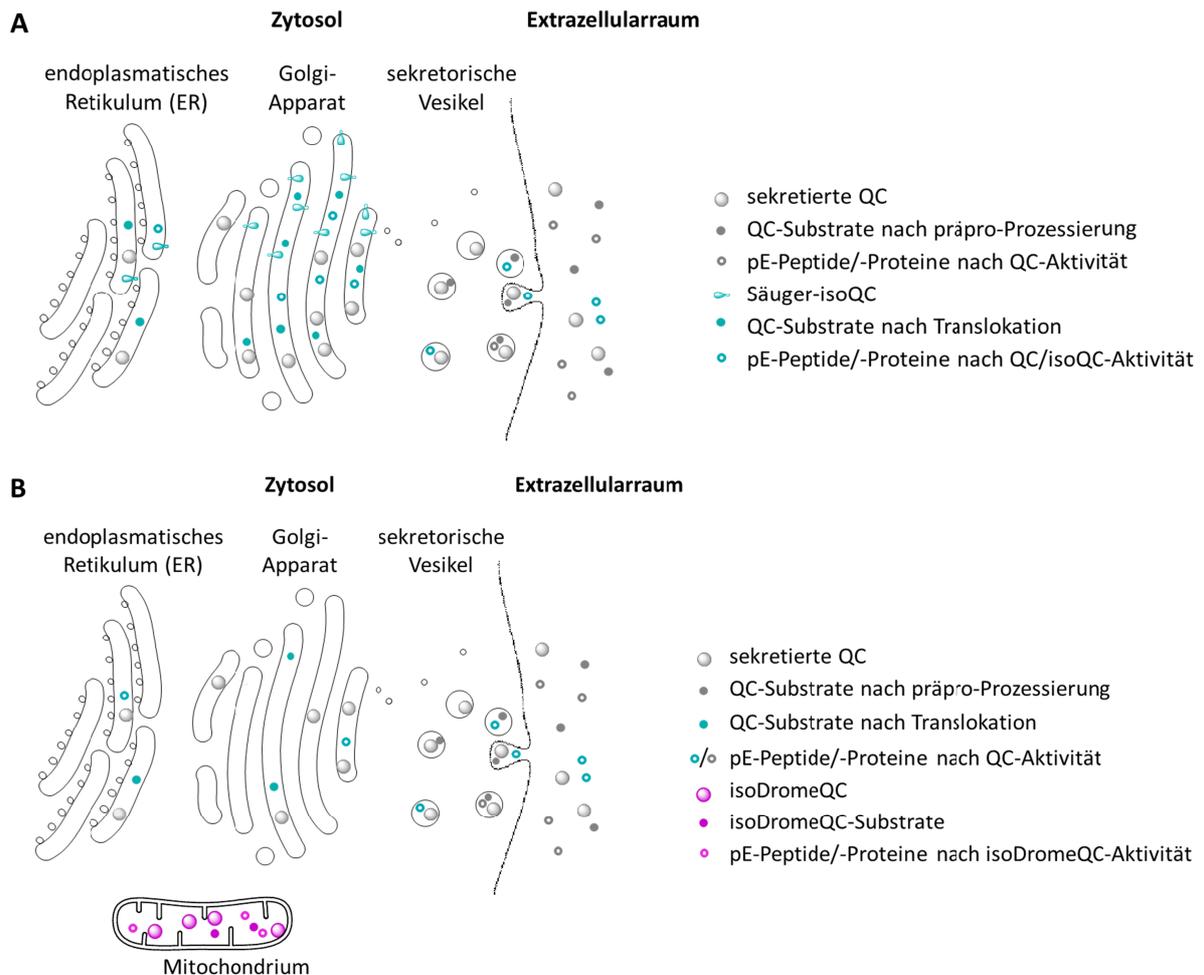
Diese Lokalisation der isoQC sowie deren ubiquitäre Verbreitung weisen auf eine Rolle bei der Reifung konstitutiv sekretierter Proteine (z.B.  $\alpha$ -Amylase) (Cynis *et al.*, 2008a) hin. Aufgrund der Lokalisation des Enzyms innerhalb der Zelle müssen durch isoQC modifizierte

Peptide/Proteine bereits im Golgi-Apparat als QC-Substrate vorliegen, das heißt, sie weisen dort einen freien N-terminalen Glutam(in)ylrest auf. Dies trifft z.B. auf die Chemokine CCL2 und CX3CL1 zu. In Übereinstimmung damit konnte gezeigt werden, dass CCL2 im Organismus überwiegend durch isoQC prozessiert wird (Cynis et al., 2011).

Hingegen deutet das Vorkommen der QC in sekretorischen Vesikeln auf eine Funktion bei der posttranslationalen Modifikation von Peptiden und Proteinen hin, welche der stimulierten Sekretion unterliegen (z.B. TRH, GnRH). Dem entsprechend wurde eine Expression des QC-Gens vorwiegend in neuronalem Gewebe (Hypophyse, Striatum, Cortex, Hypothalamus, Cerebellum, Hippocampus) nachgewiesen (Pohl et al., 1991). Ergebnisse der Charakterisierung von QC-*Knockout* Mäusen weisen darauf hin, dass Thyreoliberin durch QC prozessiert wird. Der Phänotyp homozygoter QC-*Knockout* Tiere entspricht dem von TRH-*Knockout* Mäusen, ist jedoch viel schwächer ausgeprägt. Aufgrund der geringen Halbwertszeit von TRH *in vivo* ( $T_{1/2} \leq 10\text{min}$ , Morty et al., 2006), ist es nicht möglich, die TRH-Konzentration im Blut der Tiere zu bestimmen. QC-*Knockout* Mäuse weisen eine reduzierte Serumkonzentration von Thyroxin ( $T_4$ ), einem im thyreotropen Regelkreis dem TRH nachgeschalteten Hormon, auf. Ebenso ist die QC-Aktivität im Hirngewebe, besonders im Hypothalamus (Ort der TRH-Ausschüttung), und im Blut der QC-*Knockout* Tiere stark reduziert. In peripheren Organen wie Leber oder Milz von QC-*Knockout* Mäusen, war keine Veränderung der QC-Aktivität zu detektieren, was zeigt, dass hier überwiegend isoQC synthetisiert wird. Ein Einfluss des QC-*Knockouts* auf die Serumkonzentration von GnRH (QC-Substrat) und Testosteron, beides Hormone des gonadotropen Regelkreises, wurde nicht festgestellt. Ebenfalls konnte keine Beeinflussung der Fertilität sowie eine pränatale Letalität durch einen QC-*Knockout* beobachtet werden. Die untersuchten QC-*Knockout* Mäuse unterscheiden sich nicht von Wildtyptieren in Bezug auf Motorik, Kognition, Aktivität und Nahrungsaufnahme (Schilling et al., 2011). So kann anscheinend ein Defizit an QC teilweise durch das Isoenzym kompensiert werden.

Dennoch kann aufgrund ähnlicher katalytischer Eigenschaften beider Enzyme, das heißt breite Substratspezifität, ähnliche Substratpräferenzen und pH-Abhängigkeit (Stephan et al., 2009), keine grundsätzliche Einteilung in QC- und isoQC-Substrate getroffen werden. Lediglich basierend auf ihrer Lokalisation im Organismus und innerhalb des sekretorischen Weges existieren offensichtlich Präferenzen für die Modifikation durch eines der beiden Isoenzyme (Cynis et al., 2011; Schilling et al., 2011).

Ähnlich zu den QCs der Säuger treten auch in Invertebraten verschiedene Formen von QCs auf. Für die Schwarzbäuchige Taufliege *Drosophila melanogaster* wurde eine – analog zur QC der Säuger – sekretierte Form (DromeQC; Gen CG32412, UniProt-Eintrag Q9VRQ9) identifiziert (Schilling *et al.*, 2007). Für ein Isoenzym (isoDromeQC; Gen CG5976) existieren zwei Spleißvarianten der mRNA, welche zur Sekretion des reifen Enzyms (CG5976, Isoform A, UniProt-Eintrag Q7KTY3) oder zur Translokation ins Mitochondrium (CG5976, Isoform B, UniProt-Eintrag Q86PD7) führen. Schilling und Mitarbeiter zeigten 2007, dass die ins Mitochondrium transportierte Variante der isoDromeQC dominiert (Abbildung 2, Seite 14). Eine vergleichbar lokalisierte QC existiert in Säugern offenbar nicht. Dem gegenüber besitzt *D. melanogaster* (allgemein *Drosophila species*) offensichtlich keine im Golgi-Apparat verankerte QC. Der Nachweis der pE-Modifikation mitochondrialer Peptide/Proteine aus *D. melanogaster* wurde bislang nicht erbracht. Potentielle Substrate der isoDromeQC könnten unter anderem das mitochondriale ribosomale Protein L21 (UniProt-Eintrag Q9VVX4), Rhomboid-7 (eine membrangebundene Serinprotease, PARL-Homolog, UniProt-Eintrag A1Z8R8) sowie eine Aldehyddehydrogenase (UniProt-Eintrag Q9VLC5) sein (Koch, Kolenko *et al.*, 2012a).



**Abbildung 2** Schematische Darstellung der Lokalisation von QCs, deren potentiellen Substraten und Katalyseprodukten in Säugern (A) und *D. melanogaster* (B). Sowohl die humane QC als auch die QC aus *D. melanogaster* (graue Kugeln) werden sekretiert und modifizieren währenddessen (sowie anschließend im Extrazellularraum) die kolokalisierten Substrate (graue Punkte).

(A) Das humane Isoenzym (blaue Hantel) wird im Golgi-Apparat zurückgehalten. Bei den Säugern können demzufolge durch Signalpeptidaseaktivität freigesetzte QC-Substrate sowohl durch die membrangebundene QC (isoQC) als auch durch die sekretierte Enzymform (QC) umgewandelt werden. Die unterschiedliche Expression der entsprechenden QC-Gene stellt hierbei einen Regelmechanismus für die Umsetzung der Substrate dar. Die Produkte der QC-Aktivität (Kreise) bei Säugern sind in den Organellen des sekretorischen Weges sowie im Extrazellularraum zu finden.

(B) Die isoDromeQC (magentafarbene Kugeln) wird ins Mitochondrium transportiert. Eine derartig lokalisierte QC konnte bislang nur für *D. melanogaster* (*Drosophila sp.*) nachgewiesen werden. Bei *D. melanogaster* existiert anscheinend lediglich eine QC-Form (QC), die in den Organellen des sekretorischen Weges bzw. im Extrazellularraum lokalisierte QC-Substrate modifizieren kann. Die Produkte der *D. melanogaster* QC-Aktivität sind sowohl in den Organellen des sekretorischen Weges und im Extrazellularraum als auch intrazellulär im Mitochondrium lokalisiert.

## 1.2 QCs - Zielenzyme der Wirkstoffentwicklung

### 1.2.1 Rolle von QC bei der Reifung von Chemokinen

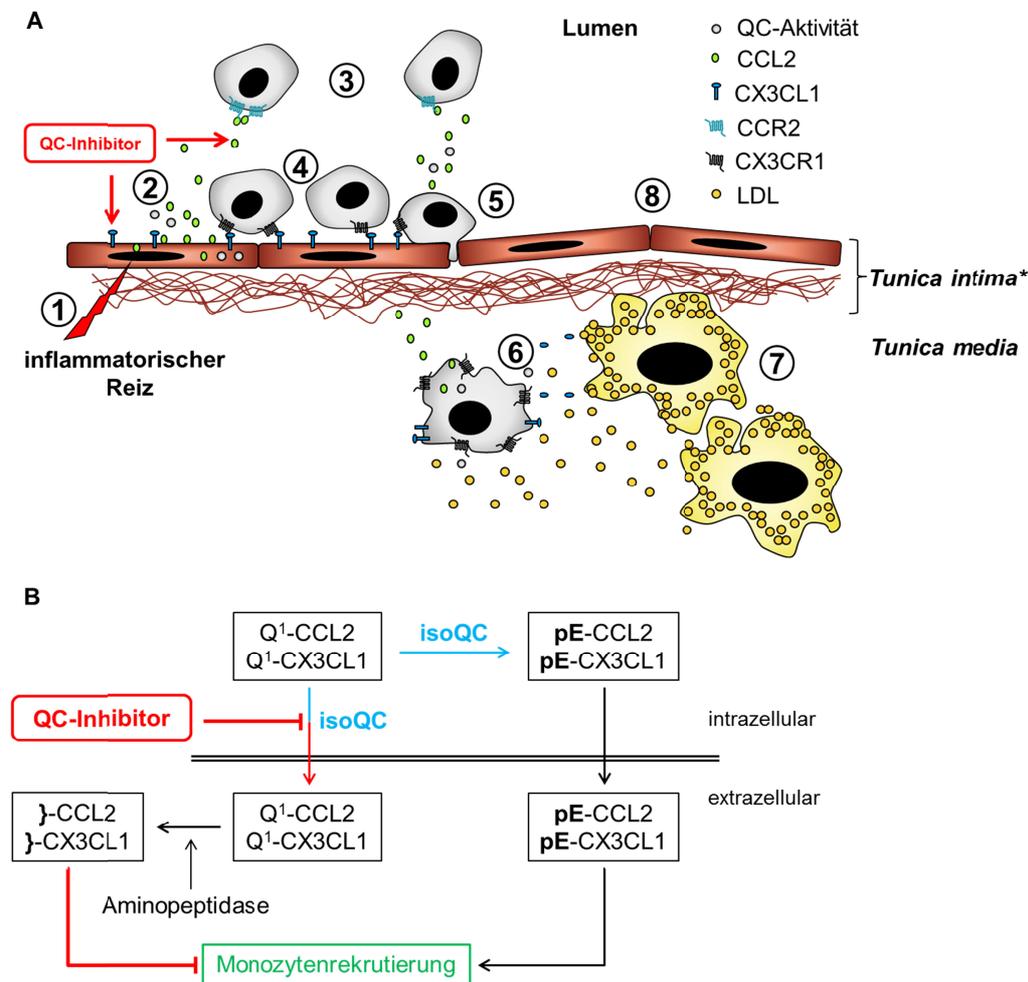
Einige der zuvor beschriebenen pE-Peptide/-Proteine (Tabelle 1, Seite 8) spielen in pathophysiologischen Prozessen eine Rolle. So scheinen die Chemokine CCL2 und CX3CL1 entscheidend am Krankheitsbild der Arteriosklerose beteiligt zu sein. Ebenfalls ist die Ablagerung pE-modifizierter Peptide ein charakteristisches Merkmal neurodegenerativer Erkrankungen wie der Alzheimer-Krankheit.

Aufgrund der mutmaßlichen Schlüsselfunktion von pE-Peptiden bei diesen Krankheitsbildern ist die Unterdrückung der pE-Modifikation ein sich derzeit in der Entwicklung befindliches therapeutisches Konzept. Im Folgenden soll auf die genannten Indikationen eingegangen und der Wirkmechanismus der Hemmung von QC dargestellt werden.

Zytokine wie die CC-Chemokine CCL2/7/8/13 oder das CX3C-Chemokin CX3CL1 bewirken die Rekrutierung von Zellen des Immunsystems (vor allem Monozyten) bei inflammatorischen Prozessen (Charo und Taubman, 2004). Bei Erkrankungen, die eine (überschießende oder chronische) Inflammation als zentrales Element des Krankheitsverlaufs aufweisen, ist die Reduktion an biologisch aktivem Chemokin, und somit des chemotaktischen Stimulus, ein therapeutisches Ziel.

Eine mögliche Indikation für den Einsatz derartiger Wirkstoffe wäre unter anderem die Arteriosklerose. Hier kommt es in Folge eines inflammatorischen Reizes auf die *Tunica intima* der Arterie [z.B. durch Verletzung des Gefäßendothels (Ross, 1976), Infektion (Kol und Libby, 1999), kontinuierliche mechanische Beanspruchung wie Bluthochdruck (Hollander, 1976), langfristige Störung der Cholesterinhomöostase (Stemme et al., 1995)], zur Expression proinflammatorischer Chemokine, wie unter anderem CCL2 und CX3CL1 (Charo und Taubman, 2004) (Abbildung 3A-1 u. 3A-2, Seite 16). Dadurch wird eine Chemotaxis von Monozyten entlang eines CCL2/CX3CL1-Gradienten ausgelöst (Abbildung 3A-3, Seite 16) (Jiang et al., 1992). Im weiteren Verlauf kommt es zur Adhäsion der Monozyten an die Gefäßwand (Abbildung 3A-4, Seite 16) und einer anschließenden Migration in den subendothelialen Raum (Abbildung 3A-5, Seite 16). Dort differenzieren die Monozyten zu Makrophagen (Abbildung 3A-6, Seite 16) und entwickeln sich zu Schaumzellen durch Aufnahme von Lipoprotein geringer Dichte (LDL) (Abbildung 3A-7, Seite 16). Die Ansammlung dieser Zellen bewirkt eine lokale Verringerung des Gefäßdurchmessers sowie den Verlust der Elastizität der Gefäßwand (Abbildung 3A-8, Seite 16). Ein weiteres Übergreifen der Entzündungsreaktion auf die Gefäßwand induziert den bindegewebsartigen Einschluss der Schaumzellansammlung, die

Bildung arteriosklerotischer Plaques. Deren Aufbrechen führt zu Blutgerinnungsreaktionen, die den Gefäßdurchmesser weiter reduzieren. Die Ausbildung einer arteriellen Thrombose kann am Ort der Thrombenbildung oder durch Wandern des Thrombus in Form einer Embolie zum vollständigen Gefäßverschluss führen. Ein Sauerstoffmangel in den versorgten Gewebsabschnitten/Organen (Ischämie) ist die Folge (z.B. Herz- oder Gehirnfarkt).



**Abbildung 3** Schematische Darstellung der zur Arteriosklerose führenden Prozesse (A) und einer möglichen Therapie mittels QC-Inhibitoren (B).

(A) Schematische Darstellung der zur Arteriosklerose führenden Prozesse: 1 – inflammatorischer Reiz, 2 – Chemokinexpression, 3 – Chemotaxis von Monozyten, 4 – Adhäsion, 5 – Transmigration, 6 – Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen, 7 – Schaumzellbildung durch LDL-Endozytose, 8 – Stenose. Die Applikation eines QC-Inhibitors reduziert die Konzentration an biologisch aktivem CCL2/CX3CL1 und vermindert so die Chemotaxis von Monozyten (Cynis et al., 2013). CCR2 – CCL2-Rezeptor, CX3CR1 – CX3CL1-Rezeptor, \**Tunica intima*: Endothel, Basalmembran, *Membrana elastica interna*

(B) Vorgeschlagene Wirkungsweise eines QC-Inhibitors bei der Behandlung von Arteriosklerose. Ohne Inhibitorgabe wandelt primär die isoQC Q<sup>1</sup>-CCL2 und Q<sup>1</sup>-CX3CL1 in eine pE-modifizierte Form um (pE-CCL2, pE-CX3CL1), die Monozyten rekrutiert. Wird die isoQC-Aktivität inhibiert, erfolgt keine pE-Modifikation der Chemokine. Durch den nicht geschützten N-Terminus sind sie anfällig gegenüber einem Abbau durch Aminopeptidasen. Die verkürzten Chemokine (}-CCL2, }-CX3CL1) lösen keine Rekrutierung von Monozyten aus (Abbildung modifiziert, Cynis et al., 2011).

Es konnte gezeigt werden, dass die Neigung zur Restenose nach einer Ballondilatation mit der Expression von CCL2 korreliert (Mori et al., 2002). Daher wurde eine Reduzierung der CCL2-Aktivität als mögliche Strategie zur Vermeidung von Restenosen vorgeschlagen.

Für CCL2 ist bekannt, dass eine Modifizierung des Chemokin-N-Terminus mit Pyroglutamat sowohl zur biologischen Stabilität beiträgt als auch für die Rezeptoraktivierung essentiell ist (Zhang et al., 1994; Proost et al., 1998; Hemmerich et al., 1999). Eine N-terminale Verkürzung führt zum Verlust der chemotaktischen Aktivität. Über eine Regulierung der QC-Aktivität mittels kompetitiver Inhibitoren könnte somit in diesen Prozess eingegriffen werden. Die Hemmung der isoQC führt dabei zur Sekretion von „unreifem“ CCL2, welches durch Aminopeptidasen wie Aminopeptidase P (ApP) oder Dipeptidylpeptidase 4 (DP4) abgebaut wird. In Folge dessen wird der chemotaktische Stimulus unterbunden und eine Invasion von Monozyten unterbleibt. Die Hemmung von QC/isoQC stellt eine mögliche Strategie zur Unterdrückung der Reifung von CCL2, und möglicherweise ebenfalls CX3CL1, und somit zur Suppression der Bildung arteriosklerotischer Veränderungen der Gefäßwand dar (Abbildung 3B, Seite 16) (Cynis et al., 2011).

Dieses Prinzip konnte bereits in Tiermodellen der Arteriosklerose bestätigt werden (Cynis et al., 2011). Des Weiteren bewirkte die Gabe von QC-Inhibitoren ebenfalls eine Verbesserung der Pathologie in Tiermodellen der Hepatitis (NAFLD – *non-alcoholic fatty liver disease*) (Cynis et al., 2013) sowie der septischen Arthritis (Hellvard et al., 2013). Ursache für die anti-inflammatorische Wirkung bei diesen Indikationen ist offensichtlich primär die Unterdrückung der Generierung von biologisch aktivem CCL2 und der damit verbundenen Einwanderung von Monozyten/Makrophagen, die für eine Gewebsschädigung mitverantwortlich sind.

Obgleich in den erwähnten präklinischen Studien keine Nebenwirkungen auftraten, muss, basierend auf der physiologischen Funktion von Monozyten/Makrophagen, eine mögliche erhöhte Anfälligkeit gegenüber Infektionen berücksichtigt werden. Die physiologische Rolle von Monozyten/Makrophagen besteht primär in der Aufnahme und dem Abbau von einen inflammatorischen Reiz auslösenden Strukturen. Diese können körperfremd sein, wie z.B. Mikroorganismen, oder auch durch pathophysiologische Prozesse vom Körper selbst generiert werden, wie z.B. Aggregate/Ablagerungen amyloider Peptide. Die vorgeschlagene Therapie der Reduzierung einer überschießenden Konzentration an biologisch aktivem Chemokin (CCL2, CX3CL1) durch Inhibierung von QC, dem für die Reifung verantwortlichen Enzym, führt zur Verringerung des inflammatorischen Reizes und der damit verbundenen

Einwanderung von Monozyten. Eine derartige Therapie stellt demnach einen Eingriff in das Immunsystem dar. In Folge der Behandlung mit QC-Inhibitoren könnte eine Immunreaktion auf inflammatorische Reize, beispielsweise mikrobielle Infektionsherde, reduziert oder verzögert werden.

Ein weiterer bei der Therapie mittels QC-Inhibitoren zu beachtender Aspekt ist die Beteiligung von CX3CL1 und CCL2 an Wundheilung und Angiogenese (Mehrad et al., 2007; Raman et al., 2011; Owen und Mohamadzadeh, 2013). Eine Verringerung der Konzentration an „reifem“ pE-modifiziertem Chemokin durch Reduzierung der QC-Aktivität könnte eine Verzögerung dieser Prozesse zur Folge haben.

Mit Hilfe einer entsprechenden medizinischen Betreuung der Therapie (Dosierung des QC-Inhibitors, Kontrolle des Gesundheits-/Infektionszustands/Verlauf der Wundheilung, gegebenenfalls unterstützende Therapien, z.B. Gabe von Antibiotika) ließe sich den potentiellen Nebenwirkungen einer Behandlung mittels QC-Inhibitoren entgegenwirken. Beispielsweise wäre bei bestimmten Indikationen, die keine systemische Therapie erfordern (z.B. Reduzierung der Neigung zur Restenose bei Gefäßaufweitungen), eine lokale Begrenzung der Therapie z.B. durch Wirkstoff-freisetzende Implantate möglich. Dadurch bliebe das Immunsystem in anderen Körperregionen unbeeinflusst. Des Weiteren ließe sich durch Wirkstoffdesign oder Formulierung des Arzneimittels eine Anreicherung des Wirkstoffs in bestimmten Körperregionen erreichen und somit dessen Wirkung lokal begrenzen.

### 1.2.2 Hemmung von QC als Konzept zur Behandlung der Alzheimer-Krankheit

Eine weitere Indikation für die Entwicklung kompetitiver QC-Inhibitoren stellen Erkrankungen des zentralen Nervensystems mit chronischer Neuroinflammation dar, wie zum Beispiel die Alzheimer-Krankheit (AK).

Pathologische Merkmale der AK sind unter anderem die extrazelluläre Ablagerung von A $\beta$ -Peptiden in sogenannten Plaques sowie intrazelluläre Degenerationsfibrillen von hyperphosphoryliertem Protein  $\tau$  (Selkoe, 2001). Obgleich die Entstehung der sporadischen Form der AK noch weitgehend ungeklärt ist, steht die Anreicherung von A $\beta$ -Peptiden vermutlich am Beginn einer Kaskade degenerativer Prozesse, welche in einem Absterben von Neuronen resultieren (Abbildung 4A, Seite 22).

Das A $\beta$ -Peptid geht aus der enzymatisch katalysierten Spaltung des in der Zellmembran integrierten Amyloid-Präkursor-Proteins (APP, „*single pass*“ Typ 1 Transmembranprotein) durch Sekretasen ( $\beta$ -,  $\gamma$ -Sekretase) hervor. Die physiologische Bedeutung von APP konnte bislang noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Es fungiert vermutlich unter anderem als Zelloberflächenrezeptor (Kang et al., 1987) und ist am Wachstum von Neuriten (Qiu et al., 1995) sowie der neuronalen Adhäsion (Schubert et al., 1989) beteiligt. Auch eine mögliche physiologische Rolle von A $\beta$  wird diskutiert (unter anderem Yao und Papadopoulos, 2002; Zou et al., 2002; Abramov et al., 2009; Igbavboa et al., 2009; Soscia et al., 2010; Tabaton et al., 2010; Bailey et al., 2011; Maloney und Lahiri, 2011).

Aufgrund des Abbaus des A $\beta$ -Peptids durch Aminopeptidasen (z.B. DP4) oder durch eine alternative  $\beta$ -Sekretasespaltung kann eine Glutaminsäure den neuen N-terminus bilden, was eine pE-Modifikation in den sekretorischen Vesikeln oder im Extrazellularraum durch QC ermöglicht. Eine Störung der Proteinhomöostase, z.B. durch gesteigerte Bildung von A $\beta$ -Peptiden mit N-terminaler Glutaminsäure, erhöhte QC-Synthese oder reduzierter Degradation von A $\beta$ , kann es jedoch zur Anreicherung von pE-modifiziertem A $\beta$ -Peptid kommen. Im Rahmen der Untersuchung der Pathologie der AK konnte festgestellt werden, dass 15 bis 50% der extrazellulär abgelagerten A $\beta$ -Peptide N-terminal durch Pyroglutamat modifiziert sind (Saido et al., 1995; Kuo et al., 1997; Güntert et al., 2006; Schilling et al., 2008a; Wu et al., 2013). Mittels *in vitro* Untersuchungen wurde gezeigt, dass pE-modifizierte A $\beta$ -Spezies aufgrund des Verlusts N-terminaler Ladung und der damit einhergehenden gesteigerten Hydrophobizität eine erhöhte Aggregationsneigung aufweisen (Schilling et al., 2006; Schlenzig et al., 2009). Ablagerungen der A $\beta$ -Aggregate, aber auch ihre löslichen oligomeren Vorstufen, können zur Auslösung von neuroinflammatorischen

Prozessen beitragen (Abbildung 4A, Seite 22). Bei der Charakterisierung der Bildung löslicher Oligomere riefen pE-modifizierte A $\beta$ -Oligomere *in vitro* eine stärkere neurotoxische Wirkung hervor als Oligomere mit nicht zyklisiertem N-Terminus (Wirhns et al., 2009). Zudem konnte gezeigt werden, dass pE-A $\beta$  mit anderen A $\beta$ -Formen koaggregiert und gemischte Oligomere bildet (Nussbaum et al., 2012). pE-modifizierte A $\beta$ -Peptide fungieren als Bindeglied zwischen A $\beta$ - und Protein  $\tau$ -induzierter Pathologie der Alzheimer-Krankheit (Nussbaum et al., 2012).

Ein Teilaspekt der gesteigerten Neurotoxizität löslicher A $\beta$ -Oligomere mit pE-modifizierten Peptidformen lässt sich wie folgt erläutern: Lösliche A $\beta$ -Oligomere werden durch Neuronen internalisiert und den Lysosomen zugeführt. Eine N-terminale Modifikation mit Pyroglutamat behindert jedoch die Degradation der Peptide, so dass es zur Akkumulation und Aggregation von pE-A $\beta$  in diesen Zellkompartimenten kommt. Ebenfalls beeinflussen A $\beta$ -Spezies (A $\beta_{3(pE)-42}$ ) die lysosomale Membranintegrität, was zur Freisetzung Lysosomen-spezifischer Enzyme führt und zur Neurotoxizität beiträgt (De Kimpe et al., 2012). Die lysosomale Dysfunktion ist ein pathologisches Merkmal der Alzheimer-Krankheit (Nixon et al., 2008).

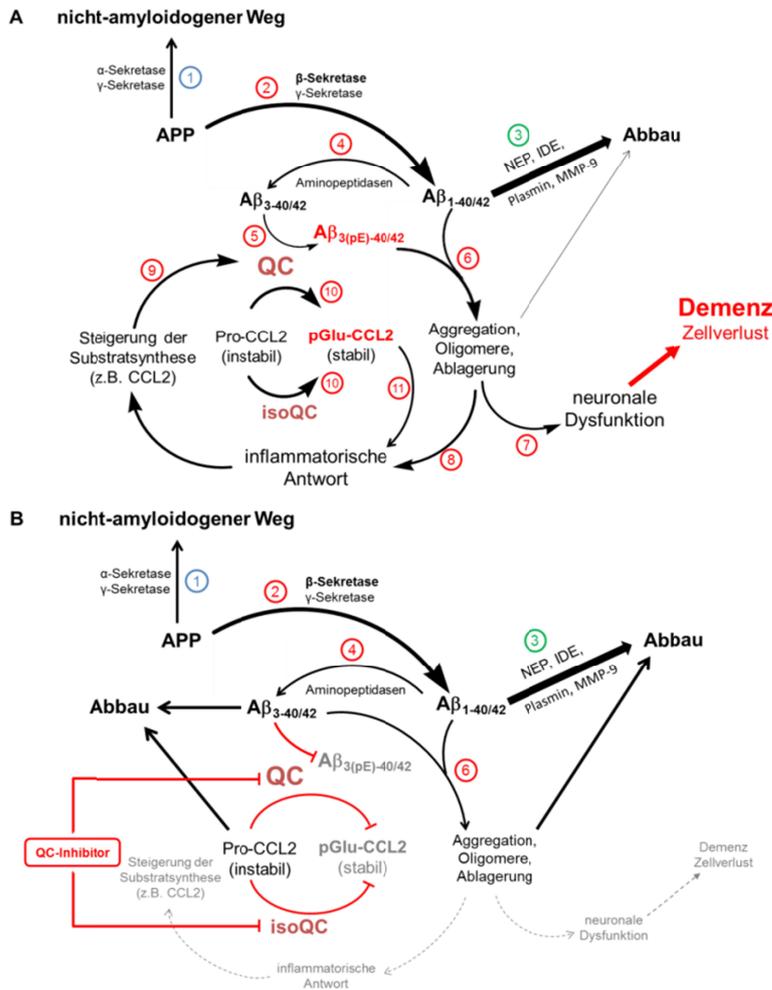
Untersuchungen zur Bildung pE-modifizierter Amyloid  $\beta$ -Peptide *in vitro* und *in vivo* weisen darauf hin, dass QC die Bildung von Pyroglutamat am A $\beta$ -N-Terminus katalysiert (Schilling et al., 2004; Cynis et al., 2008b). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass im Gehirngewebe von AK-Patienten die Expression des QC-Gens (QPCT) erhöht ist. Die Akkumulation von pE-modifizierten A $\beta$ -Spezies (A $\beta_{3(pE)-42}$ ) korreliert mit dem Fortschreiten der Erkrankung, der QPCT-Expression und QC-Synthese (Schilling et al., 2008a; De Kimpe et al., 2012; Morawski et al., 2013). Durch *in vitro* Experimente konnte gezeigt werden, dass QC, A $\beta$  und pE-modifizierte A $\beta$ -Spezies in Vesikeln des regulierten sekretorischen Weges von Neuronen kolokalisiert sind. Eine Hemmung der QC-Aktivität reduziert die Menge an sekretiertem pE-A $\beta$  (Cynis et al., eingereicht). Weitere Untersuchungen deckten auf, dass QC-Aktivität durch unterschiedliche zelluläre Mechanismen sowohl an der Entstehung diffuser als auch fokaler A $\beta$ -Ablagerungen beteiligt sein kann (Hartlage-Rübsamen et al., 2011).

Der Beitrag der QC zum Krankheitsbild der AK konnte anhand verschiedener transgener Tiermodelle aufgezeigt werden. Mäuse, die sowohl das Transgen für das humane APP als auch für die humane QC (hQC) trugen, wiesen im Vergleich zu einfach APP-transgenen Tieren Beeinträchtigungen der Kognition auf. Hingegen konnte bei APP-transgenen Tieren durch einen *Knockout* der endogenen murinen QC (mQC) der Phänotyp einer Wildtyp-Maus

erhalten werden (Jawhar et al. 2011). In einem anderen Model wurde durch *Knockout* der mQC eine Reduktion der Generierung von pE-modifiziertem  $\beta$ -Amyloid verzeichnet (Alexandru et al., 2011). Bei beiden Arbeiten stellte sich heraus, dass allein die Beeinflussung der Konzentration der sekretierten QC einen signifikanten Effekt auslöst. Somit scheint diese QC-Form zum überwiegenden Teil für die posttranslationale pE-Modifikation von A $\beta$ -Peptiden verantwortlich zu sein. Die Kolo-kalisation von QC und  $\beta$ -Amyloid in sekretorischen Vesikeln und im extrazellularen Raum weist ebenfalls darauf hin (Selkoe, 2001; Cynis et al., eingereicht).

Lösliche Oligomere beziehungsweise extrazelluläre Ablagerungen von Amyloid  $\beta$ -Peptiden lösen eine entzündliche Reaktion aus, was in der Expression proinflammatorischer Chemokine (z.B. CCL2) durch Mikroglia und Astrozyten resultiert (Abbildung 4A, Seite 22) (Szczepanik et al., 2001; Streit et al., 2004; Janelins et al., 2005). Es wird eine Chemotaxis weiterer Mikroglia (Rock et al., 2004) sowie, bei permeabler Blut-Hirn-Schranke, aktivierter Monozyten aus der Peripherie induziert (Philip et al., 1994; Ring et al., 1998; Persidsky et al., 1999). Ebenfalls wird durch den inflammatorischen Reiz die QPCT-Expression und QC-Synthese gesteigert, was für AK-Patienten nachgewiesen werden konnte (Schilling et al., 2008a). Dies resultiert in einer weiteren Steigerung der Konzentration an biologisch wirksamen Chemokin (CCL2/CX3CL1) (Abbildung 4, Seite 22) und der Verstärkung des chemotaktischen Reizes. Neben Chemokinen werden durch aktivierte Mikroglia und Astrozyten auch proinflammatorische, neurotoxisch wirkende Botenstoffe wie der Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) oder Interleukin-1 (IL-1) sekretiert (Cacquevel et al., 2004), was zum Untergang lokaler Neuronen führen kann. Eine Inhibierung der QC-Aktivität könnte auch hier die Konzentration an biologisch aktiven Chemokinen (CCL2/CX3CL1) reduzieren.

Es wurde festgestellt, dass Mikroglia, welche durch Phagozytose und Abbau von  $\beta$ -Amyloid eine neuroprotektive Wirkung im Rahmen der AK ausüben, andererseits auch an der Eliminierung von Neuronen beteiligt sind. So konnte in Hirnarealen mit Neuronenverlust eine erhöhte Anzahl sowie eine gesteigerte Migrationsgeschwindigkeit von Mikroglia beobachtet werden. Der *Knockout* des CX3CL1-Rezeptors (CX3CR1) im Tiermodell unterband den Untergang von Neuronen (Fuhrmann et al., 2010). In ähnlicher Weise könnte sich auch die Reduktion der Konzentration des biologisch aktiven CX3CR1-Liganden, CX3CL1, durch Hemmung des Reifungsprozesses mittels QC-Inhibitoren günstig auf den, unter anderem durch Neuronenverlust gekennzeichneten, Krankheitsverlauf der AK auswirken.



**Abbildung 4** Rolle der QC bei der Bildung von pE-Aβ in der Alzheimer-Krankheit (A) und vorgeschlagener therapeutischer Wirkmechanismus durch Hemmung der Enzymaktivität (B).

(A) An der APP-Prozessierung sind hauptsächlich 3 Sekretasen beteiligt. Im Rahmen eines nicht-amyloidogenen Abbauweges wird APP durch α- und γ-Sekretasen gespalten (A-1). Durch β- und γ-Sekretaseaktivität wird aus APP Aβ generiert (A-2). Dieses kann durch verschiedene Proteasen wie Nepriylisin (NEP) (El-Amouri et al., 2008), Insulinprotease (IDE – *insulin-degrading enzyme*) (Bora und Prabhakar, 2010), Plasmin (Tucker et al., 2000) oder Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP-9) (Backstrom et al., 1996; Yan et al., 2006) abgebaut werden (A-3). Erfolgt eine N-terminale Verkürzung des Aβ-Peptids zu Position 3 oder 11 (A-4) wird eine pE-Modifikation durch QC ermöglicht (A-5). Die so prozessierten Peptide sind gegenüber dem weiteren Abbau durch Aminopeptidasen stabilisiert und zeigen aufgrund des Verlustes der N-terminalen Ladung eine gesteigerte Neigung zur Aggregation und Koaggregation mit anderen Aβ-Formen (A-6). Aβ-Aggregate, lösliche Oligomere und Ablagerungen wirken sich negativ auf Vitalität und Funktion von Nervenzellen aus, was sich durch eine neuronale Dysfunktion äußert, die schließlich zum Zellverlust/zur Demenz führt (A-7). Des Weiteren wird ein inflammatorischer Stimulus erzeugt (A-8), der eine Steigerung der Synthese proinflammatorischer Chemokine wie dem iso-/QC-Substrat CCL2 induziert (A-9). Durch QC-Aktivität wird das Pro-Chemokin (Pro-CCL2) in eine biologisch aktive Form überführt (A-10) und trägt wiederum zur Aufrechterhaltung des inflammatorischen Reizes bei (A-11).

(B) Durch Inhibierung der QC-Aktivität könnte sowohl der amyloidogene als auch der neuroinflammatorische Zweig der AK-Pathologie beeinflusst werden. N-terminal verkürzte, nicht pE-modifizierte Aβ-Formen zeigen eine geringere Neigung zur Aggregation und stünden dem Abbau zur Verfügung, was die Konzentration an neurotoxischen Aβ-Aggregaten, -Oligomeren und -Ablagerungen reduzieren würde. Ebenso wäre der inflammatorische Stimulus herabgesetzt. Proinflammatorische Chemokine wie CCL2 würden nicht in ihre biologisch aktive Form überführt sondern abgebaut.

Eine verbesserte Gedächtnisleistung sowie eine Verringerung von pE-A $\beta$  können in Tiermodellen neben dem Eingreifen auf Genebene auch auf Proteinebene durch die Gabe entsprechender QC-Inhibitoren erreicht werden (Abbildung 4B, Seite 22) (Schilling et al., 2008a). Gelingt es, die im Tiermodell gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen zu übertragen, scheint eine medikamentöse Hemmung der QC-Aktivität zur Reduktion von Pyroglutamat-modifizierten A $\beta$ -Peptiden eine möglichen Strategie zur Verringerung der pE-A $\beta$  assoziierten Toxizität zu sein.

Derzeit stehen zur Therapie der AK weder präventive noch kurative Wirkstoffe zur Verfügung. Die Behandlungsmethoden beschränken sich neben der nicht-medikamentösen Therapie durch mentales Training auf die medikamentöse Behandlung der Kernsymptome, wie kognitive Störungen und Beeinträchtigung der Alltagstätigkeiten. Hier kommen die Acetylcholinesterase-Hemmer Donepezil, Galantamin oder Rivastigmin sowie der N-Methyl-D-Aspartat(NMDA)-Rezeptor-Antagonist Memantin zum Einsatz. Parallel zur Behandlung der Kernsymptome kann die Minderung von psychischen und Verhaltenssymptomen, wie z.B. Depressionen, Halluzinationen oder Apathie, durch entsprechende Medikation notwendig sein. Ein Fortschreiten der Erkrankung ist derzeit nicht aufzuhalten.

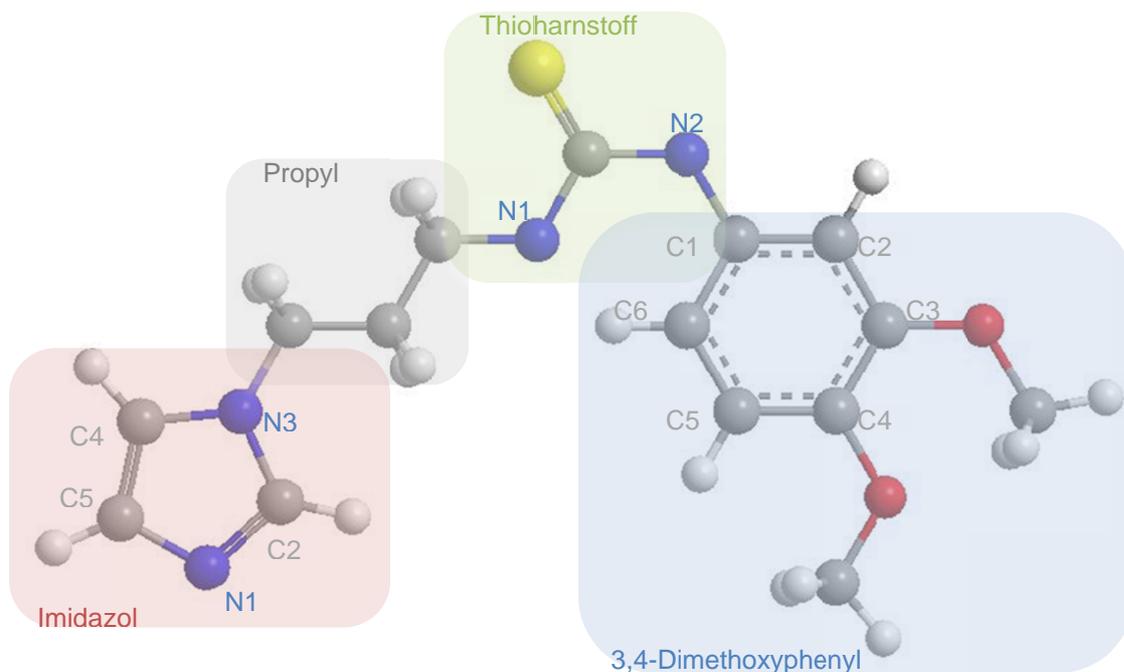
Alternative Therapiekonzepte fokussieren auf die Unterbindung/Reduzierung der Generierung pathogener A $\beta$ -Aggregate (Oligomere, Fibrillen, Plaques) sowie eine Verminderung der Neuroinflammation durch Reduktion der Bildung biologisch aktiver proinflammatorischer Chemokine (CCL2/CX3CL1). Auf beide Schwerpunkte zielt der Einsatz von QC-Inhibitoren als Therapeutikum ab (Abbildung 4, Seite 22). Vor kurzem konnte Phase 1 der klinischen Testung eines derartigen Therapieansatzes erfolgreich beendet werden (Weber et al., Konferenzbeitrag AD/PD2013).

Grundlage für eine gezielte Optimierung/Weiterentwicklung entsprechender QC-Inhibitoren ist die genaue Kenntnis der Struktur des Zielenzyms sowie der Möglichkeiten zur Inhibitorinteraktion. Der diesbezügliche Beitrag der vorliegenden Arbeit wird in den folgenden Abschnitten erläutert.

## 2 Stand der Forschung und Zielstellung der Arbeit

Die Beteiligung pE-modifizierter Peptide/Proteine an verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen im menschlichen Organismus rückt die humane QC (hQC) in den Fokus der Wirkstoffentwicklung. Die Darstellung erster kompetitiver Inhibitoren basierte auf einer Kopplung von *in vitro* Screening-Ansätzen und *in silico*-Berechnungen an Enzymmodellen sowie damit einhergehender medizinal-chemischer Optimierung der Moleküle (Schilling et al., 2003a; Schilling et al., 2005; Buchholz et al., 2006; Buchholz et al., 2009).

Ein Ergebnis dieser Arbeiten war der QC-Inhibitor PBD150 [1-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-3-(3-imidazol-1-yl-propyl)-thioharnstoff] (Abbildung 5), dessen Wechselwirkung mit der hQC im Rahmen der vorliegenden Arbeit mittels Mutationsstudien genauer untersucht werden sollte.



**Abbildung 5** Strukturmodell von PBD150 [1-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-3-(3-imidazol-1-yl-propyl)-thioharnstoff].

Durch die Gruppe um Huang wurden hQC und isohQC bereits kristallisiert und deren Tertiärstruktur durch Analyse der Röntgenbeugungsmuster aufgeklärt (Huang et al., 2005; Huang et al., 2008; Huang et al., 2011). Aufgrund der zytosolischen Synthese des Proteins durch *Escherichia coli* weisen die generierten Strukturen jedoch keine posttranslationalen Modifikationen auf, wie sie für Eukaryonten (Ursprungsspezies, Mensch) typisch sind. So konnte in diesen Strukturen keine Disulfidbrückenbildung detektiert werden.

Untersuchungen der durch die Hefe *Pichia pastoris* synthetisierten und sekretierten hQC zeigten jedoch die Ausbildung dieser intramolekularen Bindung (Schilling et al., 2002). Ein Einfluss der Disulfidbrücke auf die Bildung einer katalytisch aktiven Struktur wurde vermutet (Schilling et al., 2002). Des Weiteren konnte in jener Arbeit gezeigt werden, dass die hQC durch Modifikation im sekretorischen Weg 2 N-Glykosylierungen aufweist (Schilling et al., 2002), die zur besseren Löslichkeit des Makromoleküls beitragen (persönliche Mitteilung Schilling).

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Kristallisation und Aufklärung der Tertiärstruktur mittels Röntgenkristallstrukturanalyse von humaner QC, welche durch *P. pastoris* synthetisiert und im sekretorischen Weg modifiziert wurde. Anhand eines Vergleichs der generierten Struktur, mit der durch die Gruppe um Huang beschriebenen Struktur der hQC (Huang et al., 2005; Huang et al., 2008; Huang et al., 2011), welche nach heterologer Synthese aus *E. coli* isoliert wurde, war ein möglicher Einfluss posttranslationaler Modifikationen (Glykosylierung, Disulfidbrückenbildung) auf die Tertiärstruktur der hQC zu untersuchen (Ruiz-Carrillo, Koch et al., 2011). Des Weiteren sollte anhand von Mutationsstudien der hQC sowie der *D. melanogaster* QCs die Bedeutung der Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke für Katalyse und Enzymstabilität geklärt werden.

Weiterhin wiesen die in den Jahren 2005 und 2008 veröffentlichten Kristallstrukturen der hQC (Huang et al., 2005; Huang et al., 2008) eine in den Konformeren A und B unterschiedliche Ausrichtung einer in den QCs vom Typ 2 konservierten Tryptophanseitenkette ( $W^{207}_{hQC}$ ) auf. Es wurde eine Beteiligung dieser Aminosäure sowohl an der Katalyse (Huang et al., 2008) als auch an der Interaktion mit dem kompetitiven Inhibitor PBD150 (Huang et al., 2011) gezeigt. In der vorliegenden Arbeit sollten diese Ergebnisse durch Mutationsstudien überprüft, der Einfluss von  $W^{207}_{hQC}$  auf die Enzymstabilität analysiert sowie die Bedeutung als Sekundärinteraktionspartner anderer Inhibitoren untersucht werden (Ruiz-Carrillo, Koch et al., 2011). Mit Hilfe der im Rahmen der vorliegenden Arbeit aufgeklärten Tertiärstruktur galt es zu evaluieren, welche der beiden Ausrichtungsvarianten von  $W^{207}_{hQC}$  die Wahrscheinlichste ist.

Da die humanen QC-Isoenzyme die bislang einzigen Vertreter der QCs vom Typ 2 waren, deren Tertiärstruktur beschrieben wurde, sollten in einem weiteren Teil der vorliegenden Arbeit die Röntgenkristallstruktur der sekretierten QC der Maus (mQC) veröffentlicht (Ruiz-Carrillo, Koch et al., 2011) sowie QC und isoQC der *Drosophila melanogaster* rekombinant synthetisiert, isoliert, kristallisiert und deren Tertiärstruktur aufgeklärt werden

(Koch, Kolenko et al., 2012a). Ziel war es, anhand dieser Untersuchungen die Struktur und Wirkungsweise der QCs eines Invertebraten mit der QC aus Mensch und Maus zu vergleichen. Diese Untersuchungen sollten zudem klären, ob QCs des tierischen Modellorganismus *D. melanogaster* als Modellenzyme tierischer QCs angesehen werden können.

Im Vordergrund der Arbeit stand dabei die Kokristallisation der QCs mit dem Inhibitor PBD150. Ziel war es, die Enzym-Inhibitor-Interaktion der verschiedenen QCs zu beschreiben und mit der Interaktion zwischen humaner QC und dem Inhibitor (Huang et al., 2011) zu vergleichen. Im Fokus der Untersuchungen standen die Charakterisierung unterschiedlicher Bindungsmuster und deren Auswirkung auf die Bindungskonstante sowie der Einfluss intermolekularer Wechselwirkungen im Kristallgitter auf die Position des Inhibitors (Ruiz-Carrillo, Koch et al., 2011; Koch, Kolenko et al., 2012a). Die aus den Kristallstrukturen beziehungsweise Modellen abgeleiteten Erkenntnisse zu sekundären Wechselwirkungen zwischen Inhibitor und humaner QC waren mit Hilfe von ortsgerichteter Mutagenese zu bewerten (Koch et al., 2012b).

Die Untersuchungen zur Struktur-Wirkungsbeziehung der verschiedenen Enzyme dienen der Ableitung von Strategien zur Optimierung von Wirkstoffen beziehungsweise zur effizienten Charakterisierung von Bindungseigenschaften anderer Inhibitoren. Die Ergebnisse der Arbeit sollten dadurch einen Beitrag zur Entwicklung von QC-Inhibitoren als Wirkstoffe leisten.

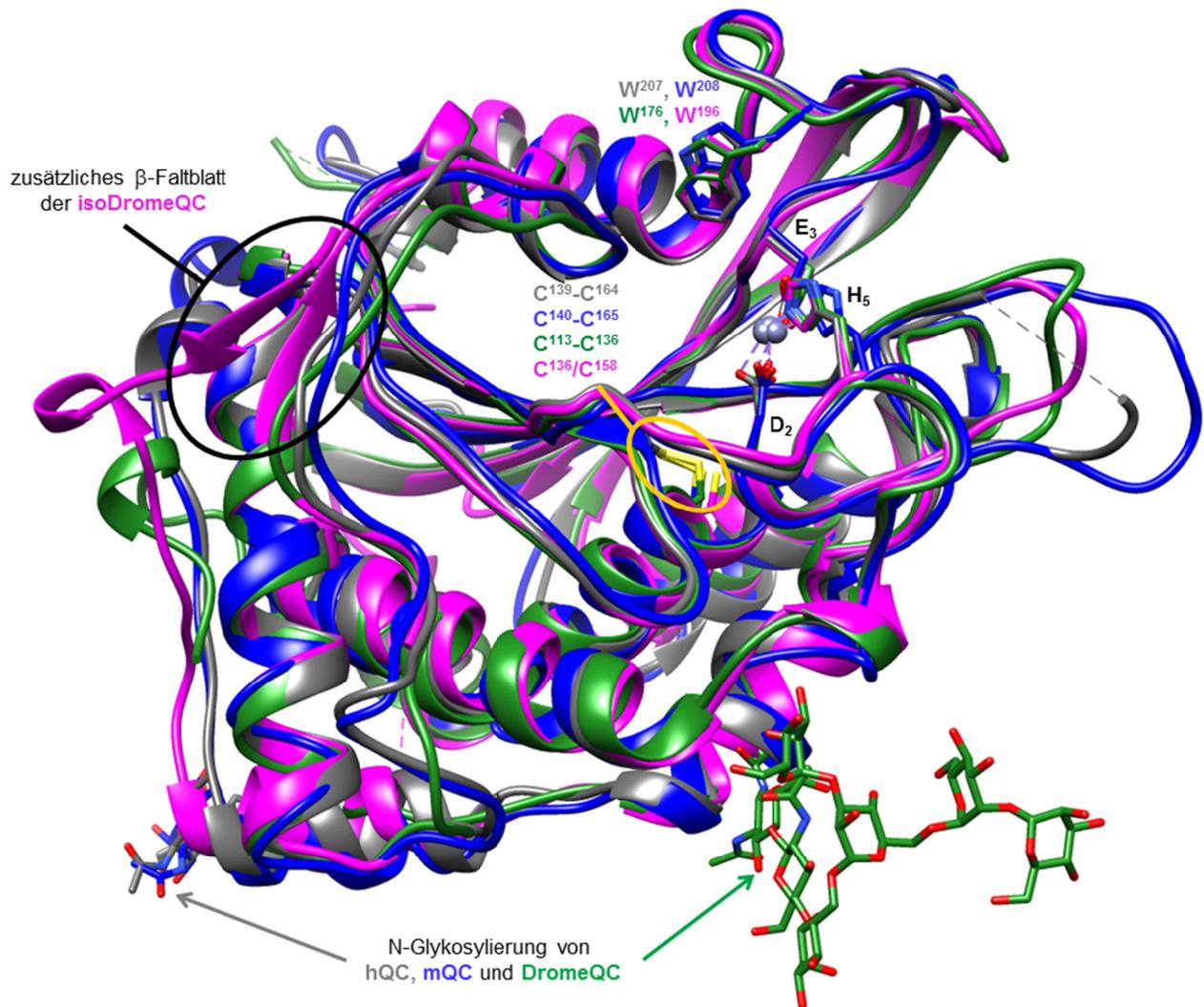
### **3 Tertiärstruktur der humanen QC sowie der homologen Enzyme aus *D. melanogaster***

#### **3.1 Tierische QCs und Zn-abhängige bakterielle Aminopeptidasen: Vergleich von Topologie und Struktur der aktiven Zentren**

Die QCs vom Typ 2 (Tier-, Bakterienreich) sind aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit offenbar aus bakteriellen Zn-abhängigen Aminopeptidasen hervorgegangen (Klan MH, Familie M28) (Booth et al., 2004). Typische Vertreter des Klans MH sind die Leucyl-Aminopeptidase aus *Aeromonas proteolytica* (LAp, UniProt-Eintrag Q01693) sowie die Aminopeptidase S aus *Streptomyces griseus* (ApS, UniProt-Eintrag P80561). Die Tertiärstruktur dieser Enzyme ist mittels röntgenkristallographischer Untersuchungen aufgeklärt worden (Chevrier et al., 1994; Greenblatt et al., 1997).

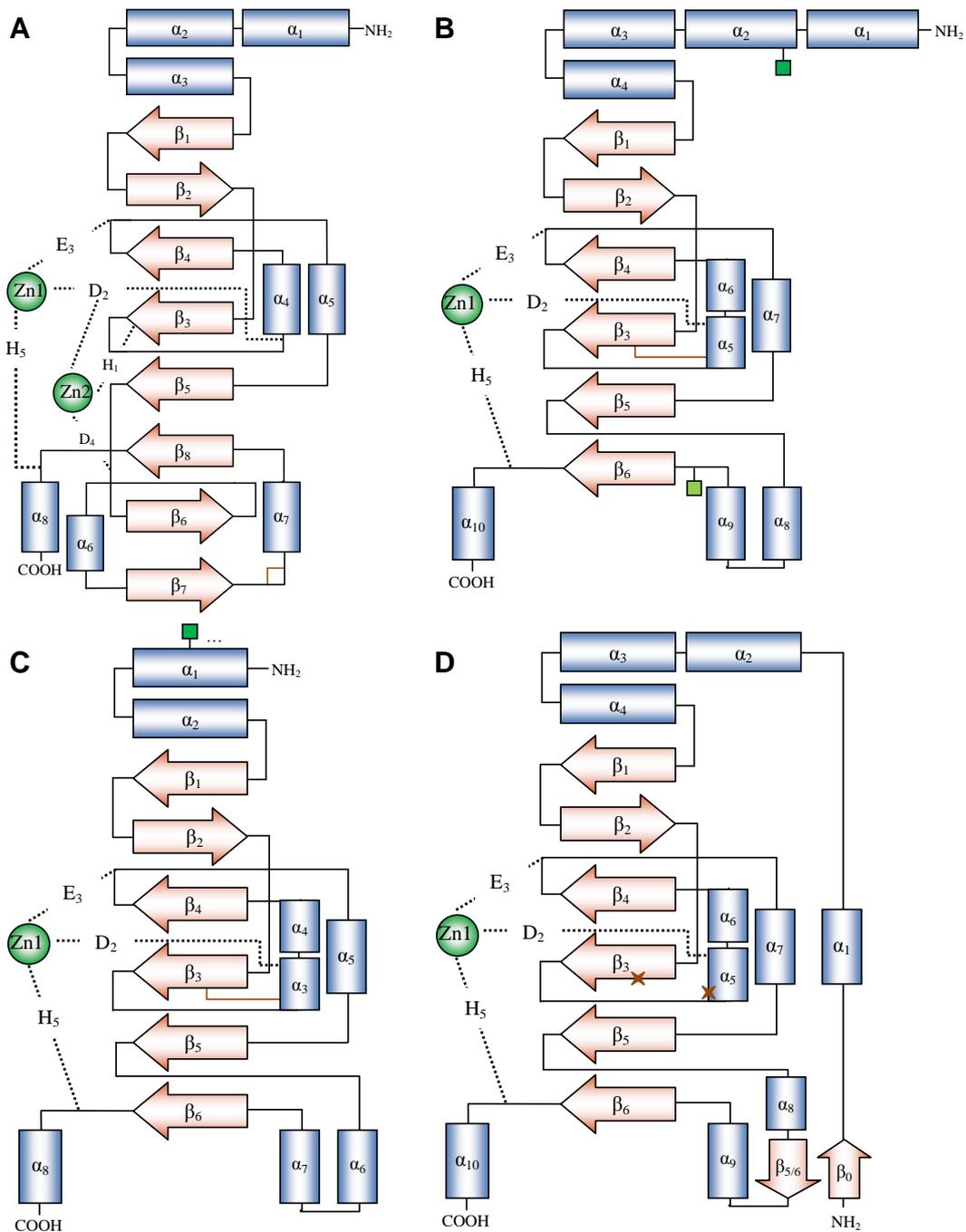
Durch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte Veröffentlichung der Tertiärstruktur einer weiteren sekretierten Säuger-QC (mQC, PDB-Eintrag 3SI1) sowie zweier QCs eines Invertebraten (DromeQC, PDB-Eintrag 4F9U; isoDromeQC, PDB-Eintrag 4FAI), können die zentralen Strukturmerkmale der durch Huang und Mitarbeiter publizierten Kristallstruktur der humanen QCs (Huang et al., 2005; Huang et al., 2008; Huang et al., 2011) bestätigt und allgemein für QCs des Typs 2 formuliert werden.

Auch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit aufgeklärten Tertiärstrukturen von hQC, mQC, DromeQC und isoDromeQC weisen die typische  $\alpha/\beta$ -Hydrolasefaltung der strukturell verwandten Zn-abhängigen bakteriellen Aminopeptidasen (ApS/LAp) auf. Ein zentrales, leicht verdrehtes  $\beta$ -Faltblatt wird von  $\alpha$ -Helices umgeben (Abbildung 6, Seite 28). Bei den bakteriellen Aminopeptidasen setzt sich dieses  $\beta$ -Faltblatt aus 8 Strängen zusammen. Von diesen sind 2 antiparallel ( $\beta_1, \beta_2$ ), 4 parallel ( $\beta_4, \beta_3, \beta_5, \beta_8$ ) und 2 entgegengesetzt parallel ( $\beta_6, \beta_7$ ) ausgerichtet. Im Gegensatz hierzu wurden die entgegengesetzt parallelen Stränge ( $\beta_6, \beta_7$  der Aminopeptidasen) bei den tierischen QCs nicht nachgewiesen (Abbildung 7, Seite 29) (Ruiz-Carrillo, Koch et al., 2011; Koch, Kolenko et al., 2012a).



**Abbildung 6** Vergleich der Tertiärstruktur von hQC (grau, PDB-Eintrag 3SI0), mQC (blau, PDB-Eintrag 3SI1), DromeQC (grün, PDB-Eintrag 4F9U) und isoDromeQC (magenta, PDB-Eintrag 4FAI) durch Überlagerung des Peptidrückgrates („Ribbon-Plot“). Die Strukturen unterscheiden sich nur in wenigen Bereichen (hauptsächlich schwächer konservierte *Loop*-Regionen). Die Zink-bindenden Aminosäureseitenketten des aktiven Zentrums ( $D_2 - E_3 - H_5^*$ ; Zn – graue Kugel),  $W^{207}_{hQC}$  und die homologen Aminosäuren der mQC und *D. melanogaster* QCs sowie die Cysteinseitenketten und die Polysaccharide sind als Stäbchendarstellung gezeigt und entsprechend der Heteroatome eingefärbt. Es ist zu sehen, dass die Cysteine der sekretierten QCs eine Disulfidbindung ausbilden, während sie in der mitochondrial lokalisierten isoDromeQC in reduzierter Form vorliegen (gelbe Umrahmung). Das zusätzliche  $\beta$ -Faltblatt, das den N-Terminus der isoDromeQC fixiert, ist durch einen schwarzen Rahmen hervorgehoben. Die Glykosylierungen von hQC ( $N^{49}_{hQC}$ ), mQC ( $N^{50}_{mQC}$ ) und DromeQC ( $N^{42}_{DromeQC}$ ) sind durch Pfeile markiert. Die dargestellten Tertiärstrukturen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit veröffentlicht (Ruíz-Carrillo, Koch *et al.*, 2011; Koch, Kolenko *et al.*, 2012a).

\*Die tiefgestellten Ziffern bezeichnen die Position innerhalb des Zn-bindenden Motivs. Eine Zuordnung zur jeweiligen Position innerhalb der Primärstruktur des jeweiligen Proteins ist der Tabelle 2, Seite 32 zu entnehmen.



**Abbildung 7** Topologiediagramme der bakteriellen Leucyl-Aminopeptidase (*A. proteolytica*) (A, entsprechend PDB-Eintrag 1AMP), der humanen QC (B, entsprechend PDB-Eintrag 3SI0) sowie der sekretierten (C, entsprechend PDB-Eintrag 4F9U) und mitochondrial lokalisierten QC von *D. melanogaster* (D, entsprechend PDB-Eintrag 4FAI). Blaue Rechtecke stellen  $\alpha$ -Helices dar, braune Pfeile die Stränge des  $\beta$ -Faltblattes. Grüne Kugeln symbolisieren die katalytischen Zinkionen. Die komplexierenden Aminosäurereste sind als Punktlinie gezeigt. Disulfidbrücken sind als orange Linie gekennzeichnet. Die beiden, in der isoDromeQC konservierten, aber reduziert vorliegenden Cysteine sind durch Kreuze markiert (D). Grüne Quadrate repräsentieren das mit dem Asparagin verknüpfte N-Acetylglucosamin der N-Glykosylierung (B und C). Das Topologiediagramm der sekretierten murinen QC (mQC) wäre identisch zu (B), weist aber die in hellgrün dargestellte N-Glykosylierungsstelle in C-terminale Richtung von  $\alpha_9$  nicht auf. Die Struktur von (B), (C) und (D) wurden in der vorliegenden Arbeit analysiert (Ruiz-Carrillo, Koch et al., 2011; Koch, Kolenko et al., 2012a). Sekundärstrukturelemente wurden nach Kabsch und Sander, 1983 definiert.

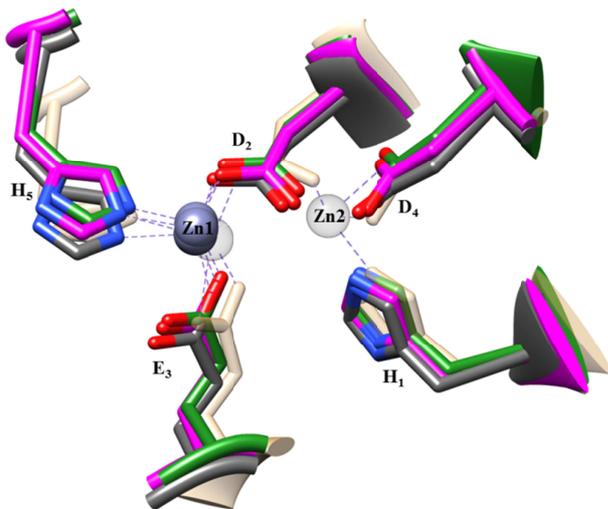
Die humanen QCs sowie die QCs aus *D. melanogaster* und Maus weisen wie ApS/LAp in ihrer Tertiärstruktur eine durch Wasserstoffbrücken stabilisierte, nicht Prolin-assoziierte *cis*-Peptidbindung auf (D<sub>2</sub> des Zn-bindenden Motivs, s. u., - in C-terminaler Richtung folgenden Aminosäure; QC Typ 2: Serin, ApS/LAp: Asparagin/Asparaginsäure).

Des Weiteren besitzen tierische QCs und die bakteriellen Aminopeptidasen ApS/LAp in ihrer Peptidkette jeweils zwei Cysteine. Deren Position ist in der Primärstruktur sowie in der Tertiärstruktur zwischen ApS und LAp nicht konserviert. Der Abstand zwischen den Cysteinen beträgt bei der LAp 3, bei der ApS 4 Aminosäuren. Bei beiden Peptidasen wird eine Disulfidbrücke innerhalb einer *Loop*-Region ausgebildet (vergl. LAp: Abbildung 7A, Seite 29). Demgegenüber ist die Position der Cysteine in Primär- und Tertiärstruktur der tierischen QCs stark konserviert (Abbildung 7B-D, Seite 29; Abbildung A1, Seite 74). Sie befinden sich zentral im Inneren des Moleküls auf dem, vom N-Terminus aus, dritten  $\beta$ -Faltblattstrang und der folgenden  $\alpha$ -Helix. Der Nachweis einer Disulfidbrücke in den Kristallstrukturen der sekretierten humanen, murinen und *D. melanogaster* QC konnte erstmals im Rahmen der vorliegenden Arbeit erbracht werden (Ruiz-Carrillo, Koch et al., 2011; Koch, Kolenko et al., 2012a).

Das aktive Zentrum der bakteriellen Zn-abhängigen Aminopeptidasen und der QCs vom Typ 2 befindet sich oberflächennah. Obwohl das Zink-bindende Motiv der bakteriellen Metalloaminopeptidasen (H<sub>1</sub> – D<sub>2</sub> – E<sub>3</sub> – D<sub>4</sub> – H<sub>5</sub><sup>\*</sup>) sowohl in der Primär- (Abbildung A1, Seite 74) als auch in der Tertiärstruktur in den tierischen QCs konserviert ist, weisen diese nur ein Zinkion (Zn<sub>1</sub>) auf (Schilling et al., 2003a; Schilling et al., 2005; Schilling et al., 2007; Stephan et al., 2009) (Abbildung 8, Seite 31).

---

\*Die tiefgestellten Ziffern bezeichnen die Position innerhalb des Zn-bindenden Motivs. Eine Zuordnung zur jeweiligen Position innerhalb der Primärstruktur des jeweiligen Proteins ist der Tabelle 2, Seite 32 zu entnehmen.



**Abbildung 8** Vergleich des Zn-bindenden Motivs der LAP aus *A. proteolytica* (braun, PDB-Eintrag 1AMP), der hQC (grau, PDB-Eintrag 3SI0) sowie der in der vorliegenden Arbeit in ihrer Tertiärstruktur aufgeklärten *D. melanogaster* QCs (DromeQC: grün, PDB-Eintrag 4F9U; isoDromeQC: magenta, PDB-Eintrag 4FAI). Das Zn-bindende Motiv  $H_1 - D_2 - E_3 - D_4 - H_5$  der bakteriellen Metalloaminopeptidasen ist in den QCs vom Typ 2 konserviert (Aminosäure und räumliche Orientierung). Lediglich bei  $E_3$  und  $D_2$  ist eine geringfügige Verschiebung der Seitenketten zwischen beiden Enzymspezies zu beobachten. Letzteres bedingt offenbar den Verlust von Zn2 bei den QCs. Eine Zuordnung zur jeweiligen Position innerhalb der Primärstruktur des jeweiligen Proteins ist der Tabelle 2, Seite 32 zu entnehmen. Die Tertiärstrukturen 3SI0, 4F9U und 4FAI wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit analysiert (Ruiz-Carrillo, Koch et al., 2011; Koch, Kolenko et al., 2012a).

Dieses katalytisch aktive Zinkion wird analog zum Zn1 der bakteriellen Amino-peptidasen durch die Aminosäuren  $D_2 - E_3 - H_5$  des Bindemotivs komplexiert, wobei  $H_5$  in ein *elec*-His-Zn-Motiv (Alberts et al., 1998) der Form  $H_2O - H_5 - Zn1$  integriert ist (Abbildung 9A, Seite 32).

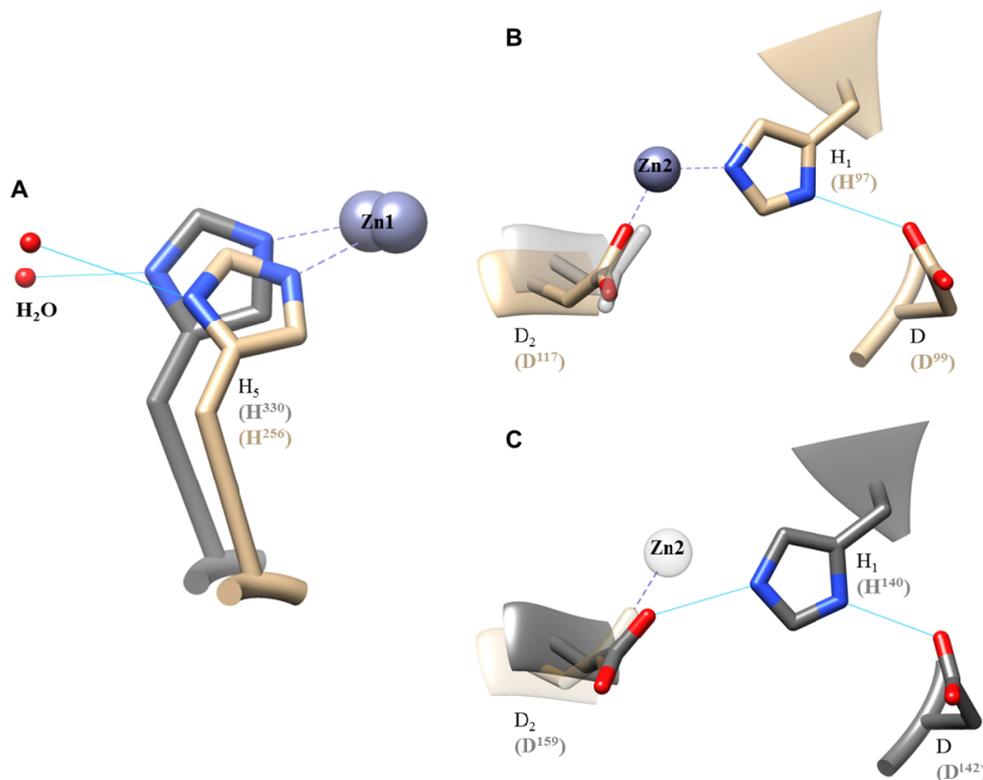
Bei diesem, sowohl an der Fixierung struktureller als auch katalytischer Zinkionen, beteiligten Bindemotiv bildet ein Ringstickstoff einer Histidinseitenkette eine Wasserstoffbrücke zu einem Carbonyl- oder Carboxysauerstoff einer anderen Aminosäureseitenkette beziehungsweise zum Sauerstoffatom eines Wassermoleküls, dem sogenannten *elec*-Atom, aus. In Folge dieser Interaktion wird die Basizität am zweiten Stickstoffatom des Imidazolrings gesteigert und die Ausrichtung der Histidinseitenkette zum Zinkion fixiert.

Während das zweite Zinkion der bakteriellen Amino-peptidasen über ein weiteres *elec*-His-Zn-Motiv der Form  $D - H_1 - Zn2$  komplexiert wird (Abbildung 9B, Seite 32), bildet sich bei den tierischen QCs ein dem *elec*-His-Zn-Motiv komplementäres Motiv der Form  $D - H_1 - D_2$  aus (Abbildung 9C, Seite 32). Dadurch wird  $D_2$  in seiner Position fixiert und für eine Interaktion mit dem katalytischen Zinkion der QCs vom Typ 2 (entspricht Zn1 der strukturverwandten Amino-peptidasen) polarisiert.

Auch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals in ihrer Tertiärstruktur analysierten Invertebraten-QCs (*D. melanogaster*) weisen diese Strukturmerkmale auf.

**Tabelle 2** Position der Aminosäuren des Zink-bindenden Motivs H<sub>1</sub> – D<sub>2</sub> – E<sub>3</sub> – D<sub>4</sub> – H<sub>5</sub>\* in der Primärsequenz bakterieller Aminopeptidasen und ausgewählter tierischer QCs sowie des Aspartats D im *elec*-His-Zn-Motiv (D – H<sub>1</sub> – Zn2) der Aminopeptidasen, welches bei den QCs eine Wasserstoffbrücke zu D<sub>2</sub> ausbildet. H<sub>5</sub> ist in das *elec*-His-Zn-Motiv H<sub>2</sub>O – H<sub>5</sub> – Zn1 eingebunden (vergl. Abbildung 9).

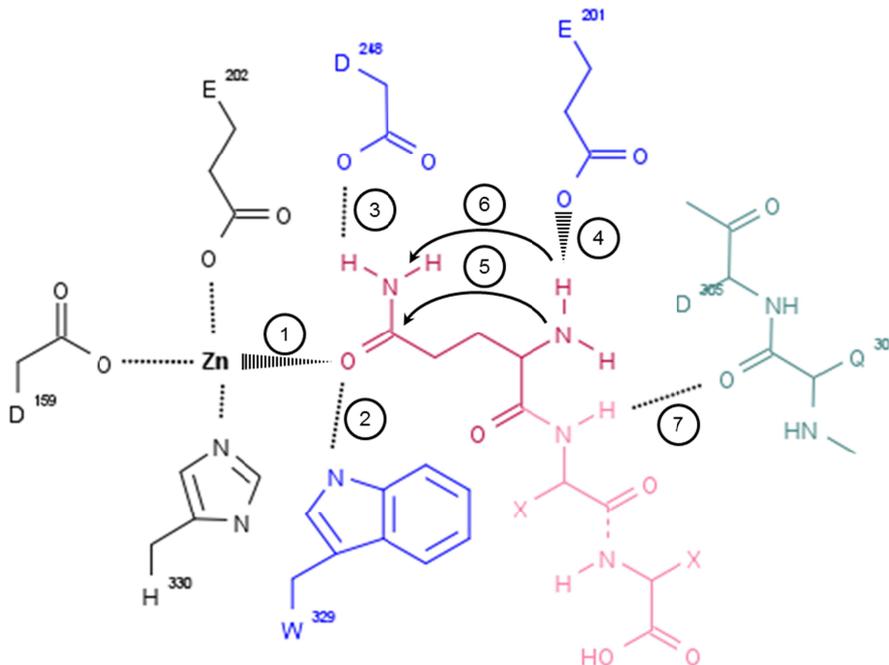
	H <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	E <sub>3</sub>	D <sub>4</sub>	H <sub>5</sub>	D
ApS	H <sup>85</sup>	D <sup>97</sup>	E <sup>132</sup>	D <sup>160</sup>	H <sup>247</sup>	D <sup>87</sup>
LAp	H <sup>97</sup>	D <sup>117</sup>	E <sup>152</sup>	D <sup>179</sup>	H <sup>256</sup>	D <sup>99</sup>
hQC	H <sup>140</sup>	D <sup>159</sup>	E <sup>202</sup>	D <sup>248</sup>	H <sup>330</sup>	D <sup>142</sup>
isohQC	H <sup>168</sup>	D <sup>186</sup>	E <sup>226</sup>	D <sup>269</sup>	H <sup>351</sup>	D <sup>170</sup>
mQC	H <sup>141</sup>	D <sup>160</sup>	E <sup>203</sup>	D <sup>249</sup>	H <sup>331</sup>	D <sup>143</sup>
DromeQC	H <sup>114</sup>	D <sup>131</sup>	E <sup>171</sup>	D <sup>218</sup>	H <sup>297</sup>	D <sup>116</sup>
isoDromeQC	H <sup>137</sup>	D <sup>153</sup>	E <sup>191</sup>	D <sup>228</sup>	H <sup>318</sup>	D <sup>139</sup>



**Abbildung 9** Vergleich der *elec*-His-Zn Motive von hQC (grau, PDB-Eintrag 3SI0) und LAp (braun, PDB-Eintrag 1AMP). Da hQC und die QCs aus *D. melanogaster* eine hohe Strukturhomologie aufweisen (vergl. Abbildung 8, Seite 31), ist aus Gründen der Übersichtlichkeit lediglich die hQC dargestellt. Zur Bindung von Zn1 wird sowohl bei der hQC als auch bei der LAp ein *elec*-His-Zn-Motiv der Form H<sub>2</sub>O – H<sub>5</sub> – Zn1 aufgebaut (A). Während H<sub>1</sub> des Zn-bindenden Motivs bei den bakteriellen Aminopeptidasen an der Fixierung des zweiten Zinkions (Zn2) beteiligt ist (B), bildet es bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten tierischen QCs eine Wasserstoffbrücke (blaue Linie) zu D<sub>2</sub> des Zn-bindenden Motivs (C). Dadurch wird die an der Bindung von Zn1 beteiligte Carboxygruppe polarisiert und in ihrer Orientierung fixiert. D<sub>2</sub> der hQC sowie Zn2 und D<sub>2</sub> der LAp sind in (B) bzw. (C) zur Orientierung leicht schattiert dargestellt.

\* Die tiefgestellten Ziffern bezeichnen die Position innerhalb des Zn-bindenden Motivs.

Obwohl nicht an der Bindung des katalytisch aktiven Zinkions beteiligt, sind die Aminosäurereste H<sub>1</sub> und D<sub>4</sub> essentiell für die katalytische Aktivität der tierischen QCs (Huang et al., 2005; Huang et al., 2008). H<sub>1</sub> trägt zur Positionierung des Zn-bindenden D<sub>2</sub> bei. D<sub>4</sub> stabilisiert die  $\gamma$ -Amidgruppe des Substrates beim Umsatz von Glutamin beziehungsweise die protonierte  $\gamma$ -Carboxygruppe bei der intramolekularen Zyklisierung von Glutaminsäure (Abbildung 10). Ein Austausch von D<sub>4</sub> durch z.B. Alanin führt zu einem katalytisch inaktiven Enzym (Huang et al., 2005).



**Abbildung 10** Schematische Darstellung der mutmaßlichen Enzym-Substrat-Interaktion und des vorgeschlagenen Katalysemechanismus der QCs vom Typ 2 am Beispiel der hQC. Der Sauerstoff der  $\gamma$ -Carbonylgruppe des N-terminalen Q (violett) oder E interagiert mit dem katalytisch aktiven Zinkion (1), wodurch die Elektrophilie des Kohlenstoffs gesteigert wird. Weiterhin wird die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen dem  $\gamma$ -Carbonylsauerstoff und Indolstickstoff eines stark konservierten Tryptophans (W<sup>329</sup><sub>hQC</sub>) vermutet (2), welche die Substrat-Zn-Interaktion stabilisiert (Calvaresi et al., 2008). Die  $\gamma$ -Amidgruppe (Q) bzw. die protonierte  $\gamma$ -Carboxygruppe (E) bildet ebenfalls eine Wasserstoffbrücke zu D<sub>4</sub> (D<sup>248</sup><sub>hQC</sub>) des Zink-bindenden Motivs aus (3). Die Interaktion der unprotonierten  $\alpha$ -Amidgruppe mit der  $\gamma$ -Carboxygruppe einer konservierten Glutaminsäure (E<sup>201</sup><sub>hQC</sub>) steigert die Nucleophilie des Stickstoffs (4), dessen Angriff am elektrophilen  $\gamma$ -Carbonylkohlenstoff (5) zum Ringschluss führt. Ein Proton der  $\alpha$ -Amidgruppe wird auf die  $\gamma$ -Amid/-Carboxygruppe übertragen (6). Ob dies direkt erfolgt (E<sup>201</sup><sub>hQC</sub> → NH<sub>3</sub>) (Calvaresi et al., 2008) oder über eine Protonentransportkette [(E<sup>201</sup> → D<sup>305</sup> → D<sup>248</sup>)<sub>hQC</sub> → NH<sub>3</sub>] (Huang et al., 2008) wurde noch nicht geklärt. Nach Zerfall des tetraedrischen Intermediats werden Pyroglutamat sowie Ammoniak/Wasser freigesetzt. Zur Stabilisierung des Enzym-Substrat-Komplexes trägt die Ausbildung weiterer Wasserstoffbrücken bei. So schlägt die Gruppe um Calvaresi eine Wechselwirkung zwischen C $\alpha$ -Stickstoff der dem N-terminalen Q/E folgenden Aminosäure des Peptidsubstrates und dem C $\alpha$ -Sauerstoff von Q<sup>304</sup><sub>hQC</sub> vor (7). Die Zn-bindenden Aminosäuren sind in schwarz, die mit dem N-terminalen Q (violett) oder E interagierenden Seitenketten in blau und die mit weiteren Aminosäuren des Peptidsubstrates (rosa) wechselwirkenden QC-Bereiche in grün dargestellt. (Abbildung modifiziert, Calvaresi et al., 2008)

Zn2 fixiert bei ApS/LAp den  $\alpha$ -Aminostickstoff der N-terminalen Aminosäure des Substrates (Lowther und Matthews, 2002). Wie theoretische Betrachtungen zum Katalysemechanismus vermuten lassen (Calvaresi et al., 2008), wird die  $\alpha$ -Aminogruppe des Substrates bei QCs vom Typ 2 durch eine Glutaminsäureseitenkette (hQC: E<sup>201</sup>) des aktiven Zentrums stabilisiert (Abbildung 10, Seite 33). Der nukleophile Charakter der  $\alpha$ -Aminogruppe wird dabei verstärkt. In Analogie zum Katalysemechanismus der strukturell verwandten bakteriellen Metalloaminopeptidasen (Lowther und Matthews, 2002) würde eine Interaktion mit dem katalytisch aktiven Zinkion (Zn1) die  $\gamma$ -Carbonylgruppe des N-terminalen Q/E polarisieren und so die Elektrophilie des Carbonylkohlenstoffs steigern. In Folge dessen wäre ein nukleophiler Angriff des  $\alpha$ -Aminostickstoffs erleichtert. Dies resultiert in der Ausbildung eines tetraedrischen Intermediats, welches dann in das Pyroglutamat-modifizierte Peptid/Protein und Ammoniak bei der Zyklisierung von Glutamin bzw. Wasser bei der Zyklisierung von Glutaminsäure zerfällt. Ammoniak/Wasser werden über D<sub>4</sub> freigesetzt (Abbildung 10, Seite 33) (Calvaresi et al., 2008). Des Weiteren vermutet die Gruppe um Calvaresi, dass der Indolstickstoff einer in den QCs vom Typ 2 stark konservierten Tryptophanseitenkette (hQC: W<sup>329</sup>; vergl. Abbildung 11) die Substratbindung am katalytisch aktiven Zinkion durch Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zum  $\gamma$ -Carbonylsauerstoff stabilisiert (Abbildung 10, Seite 33). Es konnte durch Mutationsstudien der hQC im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass ein Austausch dieser Aminosäure zu einer Verringerung von  $k_{cat}$  sowie zu einem Anstieg von  $K_M$  führt (Koch et al., 2012b). Dies stützt die von Calvaresi und Mitarbeitern vorgeschlagene Beteiligung von W<sup>329</sup><sub>hQC</sub> an der Katalyse.

hQC	321	IPSPFPEVWHTMDDNEENLDESTIDNLNKILQVVFVLEYLHL-----	361
isohQC	342	ISTPFPAVWHTPADTEVNLHPPTVHNLCRILAVFLAEYLGLE-----	382
mQC	322	IASPFPEVWHTMDDNEENLHASTIDNLNKIIQVVFVLEYLHL-----	362
DromeQC	288	VATPFDPVWHTPRDNAANLHWPSIRNFRNRFVYQYLKRHTSPVNLRFYRT	340
isoDromeQC	309	IPVPFPSVWHTPDDNASVIDYATTDNLALIIRLFALEYLLAGTEAK-----	354
		:.:*** ** ** .: * : : : * : : **	

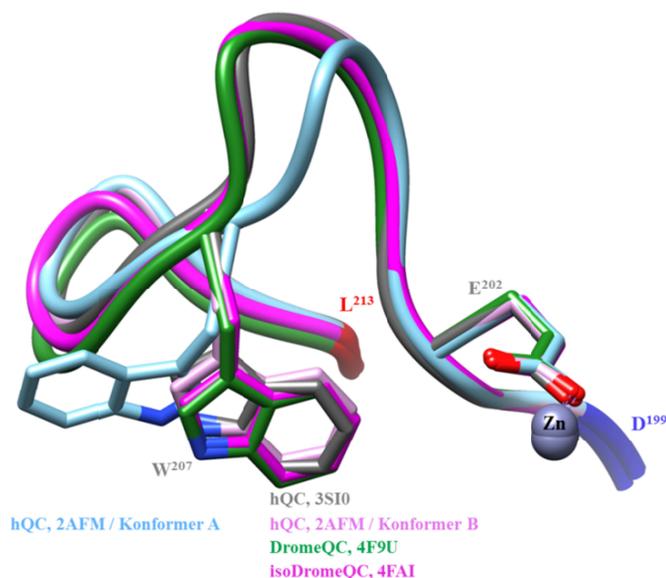
**Abbildung 11** Vergleich der Primärstruktur des C-terminalen Bereichs von humaner QC (hQC, UniProt-Eintrag Q16769), deren Isoenzym (isohQC, UniProt-Eintrag Q9NXS2), muriner QC (mQC, UniProt-Eintrag Q9CYK2) sowie den QCs der *D. melanogaster* (DromeQC, UniProt-Eintrag Q9VRQ9; isoDromeQC, UniProt-Eintrag Q86PD7). Das in den QCs vom Typ 2 konservierte W<sup>329</sup><sub>hQC</sub> ist durch einen Rahmen hervorgehoben. H<sub>5</sub> (H<sup>330</sup><sub>hQC</sub>) des Zink-bindenden Motivs ist grün/fett/unterstrichen markiert. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit in den Mutationsstudien betrachteten Aminosäuren sind in allen QC-Sequenzen fett hervorgehoben und für die Enzyme, von denen Varianten generiert wurden, grau unterlegt. Symbole: \* gleiche Aminosäuren; ;. . ähnliche Aminosäuren

Eine sekundäre Enzym-Substrat-Wechselwirkung erfolgt über eine Wasserstoffbrücke zwischen einem  $\alpha$ -Carbonylsauerstoff des Peptidrückgrates im aktiven Zentrum (hQC: Q<sup>304</sup>; Abbildung A1, Seite 74) und dem  $\alpha$ -Amidstickstoff der zweiten N-terminalen Aminosäure des Substrates (Abbildung 10, Seite 33) (Huang et al., 2005). Diese beschriebenen Enzym-Substrat-Interaktionen bedingen anscheinend die Stereoselektivität der QCs vom Typ 2 gegenüber L-Glutamin bzw. L-Glutaminsäure. Die enzymatisch katalysierte Umwandlung von D-Glutamin zu Pyroglutamat kann nicht beobachtet werden (Fischer und Spieß, 1987).

Weitere Untersuchungen zum Substratumsatz der tierischen QCs zeigten, dass lediglich die vier N-terminalen Aminosäuren des Substrates mit dem Enzym interagieren und so für die Substratspezifität der QC entscheidend sind (Schilling et al., 2003b; *Schilling et al., 2007*).

Ein Unterschied zwischen den im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Kristallstrukturen der sekretierten tierischen QCs (hQC: *Ruiz-Carrillo, Koch et al., 2011*, DromeQC: *Koch, Kolenko et al., 2012a*) sowie der mitochondrialen isoDromeQC (*Koch, Kolenko et al., 2012a; Kolenko et al., 2013*) zu zuvor publizierten Strukturen der humanen QCs (Huang et al., 2005; Huang et al., 2008) ist die einheitliche Ausrichtung einer Tryptophanseitenkette am Eingang des aktiven Zentrums (W<sup>207</sup><sub>hQC</sub>, Abbildung 12, Seite 36). Der Indolring weist stets mit seinem Benzolteil zum katalytisch aktiven Zinkion. Eine Konformationsvariante entsprechend des Konformers A der in den Jahren 2005 und 2008 durch Huang und Mitarbeiter publizierten Röntgenkristallstrukturen der hQC, bei der der Pyrrolring zum Zinkion weist, konnte nicht nachgewiesen werden (Abbildung 12, Seite 36). Aus Abbildung 12, Seite 36 wird eine abweichende räumliche Orientierung der W<sup>207</sup><sub>hQC</sub> einschließenden *Loop*-Region [(D<sup>199</sup>-L<sup>213</sup>)<sub>hQC</sub>] des Konformers A (PDB-Eintrag 2AFM) ersichtlich. Diese Verschiebung sowie die Ausrichtung des Indolrings von W<sup>207</sup><sub>hQC</sub> sind vermutlich auf Einflüsse der kristallographischen Umgebung (intermolekulare Wechselwirkungen) zurückzuführen (*Ruiz-Carrillo, Koch et al., 2011*). Hingegen zeigen die im Jahr 2011 von der Gruppe um Huang veröffentlichten Strukturen der hQC eine einheitliche, dem Konformer B (PDB-Eintrag 2AFM) entsprechende Ausrichtung von W<sup>207</sup><sub>hQC</sub> (Huang et al., 2011). Intermolekulare Wechselwirkungen beeinflussen hier die Orientierung der *Loop*-Region nicht. Dies lässt vermuten, dass eine Ausrichtung des konservierten Tryptophans W<sup>207</sup><sub>hQC</sub> entsprechend den im Rahmen der vorliegenden Arbeit analysierten Röntgenkristallstrukturen von hQC (PDB-Eintrag 3SI0), DromeQC (PDB-Eintrag 4F9U), isoDromeQC (PDB-Eintrag 4FAI) und der von der Gruppe um Huang im Jahr 2011 veröffentlichten hQC-Struktur (Huang et al., 2011) dominiert und die wahrscheinlichste Konformation des physiologisch vorkommenden Proteins widerspiegelt. Untersuchungen zum

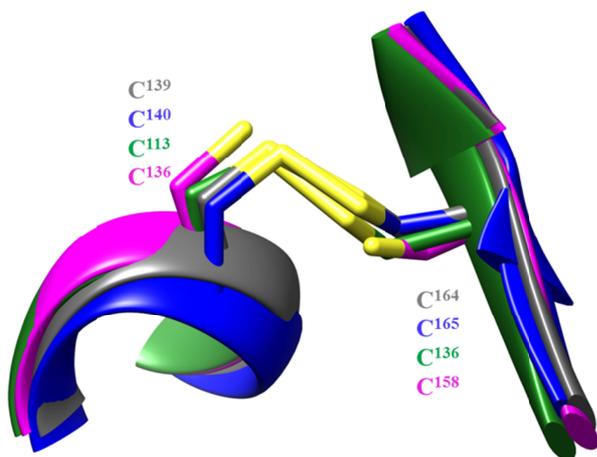
Austausch von  $W^{207}_{hQC}$  in der hQC weisen auf einen Einfluss auf die Katalyse sowie eine Beteiligung als Sekundärinteraktionspartner bei der Ligandenbindung hin (Ruiz-Carrillo, Koch et al., 2011). Es wurden hQC-Varianten generiert, bei denen  $W^{207}_{hQC}$  durch eine Aminosäure mit aromatischer ( $W^{207}_{F_{hQC}}$ ), mit aliphatischer ( $W^{207}_{L_{hQC}}$ ) oder mit polarer Seitenkette ( $W^{207}_{Q_{hQC}}$ ) ersetzt ist. Mittels enzymkinetischer Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass dies eine Verringerung der Wechselzahl  $k_{cat}$  zur Folge hat. Ebenfalls konnte ein Anstieg von  $K_M$  in Abhängigkeit von Größe und Polarität der eingeführten Seitenkette beobachtet werden. Während sich ein Austausch von  $W^{207}_{hQC}$  durch Phenylalanin nur schwach auswirkte ( $K_M W^{207F} \leq 3K_M WT$ ), wurde für die Varianten  $W^{207}_{L/Q_{hQC}}$  ein im Vergleich zum Wildtyp bis zu 10x höherer  $K_M$ -Wert ermittelt ( $K_M W^{207L/Q} \geq 10K_M WT$ ). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass  $W^{207}_{hQC}$  zur Substratpositionierung und Stabilisierung des Enzym-Substrat-Komplexes beiträgt (Ruiz-Carrillo, Koch et al., 2011). Ähnliches wurde für die Enzym-Inhibitor-Interaktion beobachtet. Auch hier konnte für die Varianten  $W^{207}_{L/Q_{hQC}}$  eine im Vergleich zum Enzymwildtyp bis zu 10x höhere Inhibitor-Konstante  $K_i$  für die Inhibitoren 1-Benzylimidazol, N- $\omega$ -Acetylhistamin oder PBD150 detektiert werden ( $K_i W^{207L/Q} \geq 10K_i WT$ ), während sich die Variante  $W^{207}_{F_{hQC}}$  nicht auf die Inhibitorinteraktion auswirkte. Dies deutet auf eine Beteiligung der aromatischen Seitenkette bei der Enzym-Inhibitor-Wechselwirkung hin (Ruiz-Carrillo, Koch et al., 2011). CD-spektroskopische Untersuchungen der  $W^{207}_{hQC}$ -Varianten lassen keinen Einfluss auf die thermische Konformationsstabilität des Enzyms vermuten (Ruiz-Carrillo, Koch et al., 2011).



**Abbildung 12** Vergleich der Orientierungen von  $W^{207}_{hQC}$  in verschiedenen Kristallstrukturen. Verglichen wird die Ausrichtung des Indolrings der im Rahmen der vorliegenden Arbeit analysierten Kristallstrukturen (hQC: PDB-Eintrag 3SI0, grau; DromeQC: PDB-Eintrag 4F9U, grün; isoDromeQC: PDB-Eintrag 4FAI, magenta) mit den durch Huang et al. 2005 publizierten Konformationsvarianten (PDB-Eintrag 2AFM; Konformer A – blau, Konformer B – violett). Dargestellt ist der Loop-Bereich ( $D^{199} - L^{213}$ )<sub>hQC</sub>.

### 3.2 Posttranslationale Modifikationen und deren Rolle für Struktur und Funktion der QCs aus Mensch und *D. melanogaster*

Die von der Gruppe um Huang publizierten Röntgenkristallstrukturen der humanen QCs (Huang et al., 2005; Huang et al., 2008; Huang et al., 2011) weisen aufgrund einer zytosolischen Proteinexpression in *E. coli* keine intramolekulare Disulfidbrücke zwischen  $\beta$ -Faltblattstrang  $\beta_3$  und  $\alpha$ -Helix  $\alpha_5$  auf, einem charakteristischen Merkmal sekretierter tierischer QCs (Abbildung 7, Seite 29) (Schilling et al., 2002). Hingegen lässt sich durch Nutzung eukaryontischer Expressionssysteme eine Ausbildung der Disulfidbindung erreichen (Schilling et al., 2002). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die methylo trope Hefe *Pichia pastoris* zur rekombinanten Proteinsynthese genutzt. Der kotranslationale Transport in das sekretorische Kompartiment ist der Bildung der Zielenzyme (hQC, DromeQC, mQC) in tierischen Zellen analog. Anhand der im Rahmen der vorliegenden Arbeit generierten Röntgenkristallstrukturen sekretierter tierischer QCs [mQC PDB-Einträge 3SI1/3SI2; hQC PDB-Eintrag 3SI0 (Ruiz-Carrillo, Koch et al., 2011); DromeQC, PDB-Eintrag 4F9U (Koch, Kolenko et al., 2012a)] konnte gezeigt werden, dass die in allen tierischen QCs konservierten, Cysteine bei den sekretierten Enzymspezies in oxidiert Form vorliegen und so die beiden Strukturelemente  $\beta$ -Faltblattstrang und  $\alpha$ -Helix, kovalent verbinden (Abbildung 13).



**Abbildung 13** Detaildarstellung der intramolekularen Disulfidbrücke der sekretierten humanen QC (grau), murinen QC (blau) und *D. melanogaster* QC (grün). Für die mitochondrial lokalisierte isoDromeQC (magenta) kann in der Röntgenkristallstruktur keine Verknüpfung der beiden, in den QCs vom Typ 2 konservierten, Cysteine beobachtet werden. Die Tertiärstrukturen 3SI0, 3SI1, 4F9U und 4FAI wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit veröffentlicht (Ruiz-Carrillo, Koch et al., 2011; Koch, Kolenko et al., 2012a).

Die Annahme, dass die Bildung der Disulfidbrücke essentiell für die Ausbildung einer katalytisch aktiven Struktur sei (Schilling et al., 2002), wurde durch Mutationsanalysen an der humanen sowie an den QCs der *D. melanogaster* widerlegt (Ruiz-Carrillo, Koch et al., 2011; Koch, Kolenko et al., 2012a). Vorangegangene Untersuchungen zur Rolle dieser kovalenten Bindung im Enzym basierten auf der Reduktion der Disulfidbrücke mittels Dithiothreitol (DTT). Zum damaligen Zeitpunkt war noch nicht bekannt, dass es sich bei QCs des Typs 2 um Metalloenzyme handelt (Schilling et al., 2003a). Der beobachtete zeitabhängige Aktivitätsverlust bei Koinkubation mit dem Reagenz war somit wahrscheinlich auf dessen metallbindende Wirkung (Krežel et al., 2001) zurückzuführen.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die intermolekulare Disulfidbindung eine stabilisierende Funktion gegenüber Denaturierung durch Guanidinhydrochlorid (GdmCl) oder thermische Einflüsse vermittelt (Ruiz-Carrillo, Koch et al., 2011; Koch et al. 2012a). Hierfür wurde die Konformationsstabilität von hQC und DromeQC sowie deren Cys→Ala Mutanten vergleichend mittels CD- und Fluoreszenzspektroskopie untersucht, entsprechend der von Schmid, 1997 und Pace et al., 1997 beschriebenen Methoden.

Betrachtet man die thermische Konformationsstabilität von hQC und *D. melanogaster* QCs sowie deren Cys→Ala Varianten (Abbildung A2, Seite 75), ist festzustellen, dass ein Fehlen der intramolekularen Disulfidbrücke bei der hQC zu einer Verschiebung des Temperaturübergangsmittelpunktes in Richtung niedrigerer Temperatur führt. Bei der DromeQC wird hingegen ein stärkerer Verlust der Sekundärstruktur bei Temperaturanstieg durch Austausch der Cysteine hervorgerufen, was sich aus einer größeren Änderung des Betrages der mittleren Elliptizität pro Aminosäure  $\Theta_{MRW}$  schließen lässt. Die untersuchten QCs (WT) weisen einen Temperaturübergangsmittelpunkt von circa 50°C auf (Ruiz-Carrillo, Koch et al., 2011; Koch, Kolenko et al., 2012a).

Hinsichtlich einer chemisch durch GdmCl induzierten Denaturierung (Abbildung A3, Seite 76) zeigte sich, dass ein Fehlen der Disulfidbindung sowohl bei der hQC als auch bei der DromeQC zur Reduktion des GdmCl-Konzentrationsübergangsmittelpunktes führt. Es stellte sich ebenfalls heraus, dass die Tertiärstruktur der DromeQC hinsichtlich einer chemisch durch GdmCl induzierten Denaturierung weniger stabil ist als die der hQC.

Demgegenüber zeigt ein Austausch der Cysteine der isoDromeQC keinen Einfluss auf die Konformationsstabilität des Enzyms (Abbildungen A2 und A3, Seiten 75 und 76). Bei diesem mitochondrial lokalisierten Protein wird keine kovalente Bindung zwischen den Cysteinseitenketten ausgebildet, die Cysteine liegen in reduzierter Form vor (isoDromeQC

PDB-Einträge 4FAI/4FWU) (Koch, Kolenko et al., 2012a; Kolenko et al., 2013). Anscheinend wird die Proteinstruktur durch andere intramolekulare Wechselwirkungen stabilisiert. Hierzu könnte beispielsweise ein 2-strängiges, anti-paralleles  $\beta$ -Faltblatt beitragen, das den Protein-N-Terminus fixiert (Abbildungen 6 und 7, Seiten 28 und 29) (Koch, Kolenko et al., 2012a). Dieses Strukturelement wurde bislang nur in der isoDromeQC nachgewiesen.

Die Rückfaltung zu einer katalytisch aktiven Struktur war nach thermisch oder chemisch induzierter Denaturierung bei keiner der untersuchten QC-Spezies zu beobachten (unveröffentlichte Daten).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen weisen somit darauf hin, dass die Disulfidbrücke der sekretierten QCs einen Beitrag zur Stabilisierung der Enzymstruktur leistet. Essentiell für die Ausprägung der katalytisch aktiven Struktur – wie ursprünglich angenommen – ist diese jedoch nicht.

Eine weitere posttranslationale Modifikation tierischer QCs, die in vorangegangenen Arbeiten aufgrund der Proteinsynthese im prokaryontischem System nicht untersucht werden konnte, ist die Glykosylierung. Eine Analyse der Primärstrukturen der sekretierten QCs zeigt zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen für hQC (N<sup>49</sup>, N<sup>296</sup>) und DomeQC (N<sup>42</sup>, N<sup>156</sup>) sowie eine für die mQC (N<sup>50</sup>) (Glykosylierungssequenz N X S/T, X $\neq$ P) (vergl. Abbildung A1, Seite 74). Mittels der Röntgenkristallstrukturanalyse wurde jeweils für das näher am Protein-N-Terminus lokalisierte Asparagin eine Derivatisierung der drei Enzyme nachgewiesen (Ruiz-Carrillo, Koch et al., 2011; Koch, Kolenko et al., 2012a).

Für die hQC konnten durch unvollständige Deglykosylierung von rekombinant synthetisiertem Enzym (*P. pastoris*) mittels Endoglykosidase H<sub>f</sub> (spaltet den Chitobioseteil des Mannose-Oligosaccharids) und anschließender MALDI-TOF MS drei diskrete Molekülmassen detektiert werden, die den möglichen Glykosylierungsmustern: zwei beziehungsweise eine Glykosylierung sowie nicht glykosyliert, entsprechen. Es wurde ein Massenunterschied von ca. 2 kDa je Glykosylierung ermittelt (Schilling et al., 2002). Somit scheint die hQC tatsächlich eine zweite Glykosylierung an Position N<sup>296</sup><sub>hQC</sub> zu besitzen. Das Oligosaccharid konnte durch Röntgenkristallographie jedoch nicht detektiert werden.

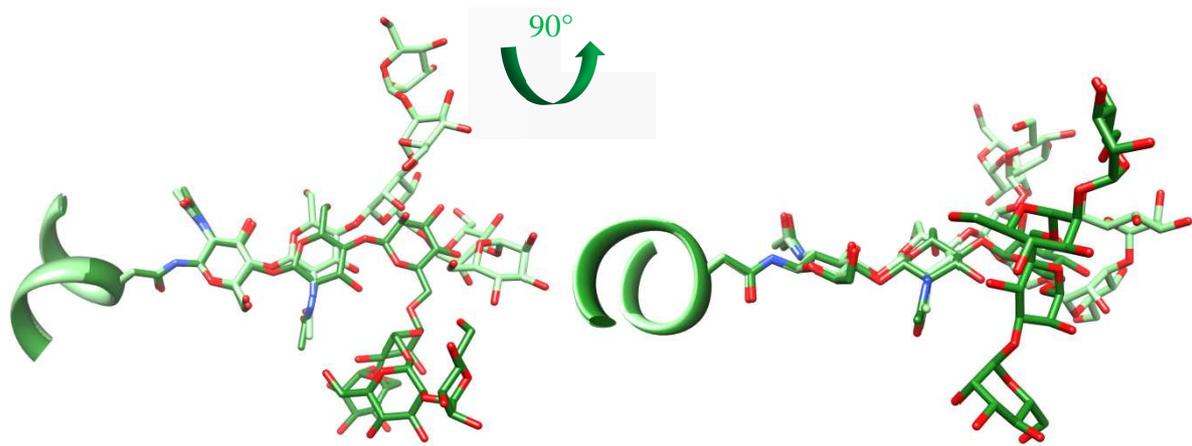
Bei der Analyse des Deglykosylierungsmusters der DromeQC in der SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) unter denaturierenden Bedingungen wurden lediglich zwei Proteinformen getrennt, die einen Migrationsunterschied entsprechend einer Molekülmasse von 2 kDa aufwiesen (Abbildung A4, Seite 77). Somit konnte anhand dieser

Methode für die DromeQC nur die Derivatisierung an einer N-Glykosylierungsstelle aufgezeigt werden. N<sup>156</sup><sub>DromeQC</sub> erfährt bei Synthese durch *P. pastoris* offensichtlich keine Derivatisierung.

Die Derivatisierung von Proteinen mit Sacchariden beeinflusst deren Lokalisation (Sekretionsmerkmal) sowie Löslichkeit. So konnte durch das Einbringen einer Glykosylierungsstelle in die Aminosäuresequenz der humanen isoQC (Abbildung A1, Seite 74) die Ausbeute der Reinigung des funktionalen Enzymteils nach Expression in *P. pastoris* deutlich gesteigert werden (Stephan et al., 2009). Im Rahmen der Charakterisierung der DromeQC wurde die Präzipitation des Proteins nach Deglykosylierung beobachtet. Ein Einfluss auf die katalytische Aktivität wurde nicht nachgewiesen. Auch auf die enzymatische Aktivität der hQC wirkt sich die Glykosylierung nicht aus (Schilling et al., 2002).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden erstmals N-glykosylierte QCs kristallisiert. Das Expressionssystem *P. pastoris* ersetzt die Organismen-spezifische Glykosylierung durch Oligosaccharid-Einheiten der Form N-(GlcNAc)<sub>2</sub>-(Man)<sub>8-14</sub> (Cregg et al., 1993). In den Kristallstrukturen der murinen und humanen QC konnten die ersten beiden Zucker an der, in den Säuger-QCs konservierten, N-Glykosylierungsstelle (hQC: N<sup>49</sup>, mQC: N<sup>50</sup>) strukturell aufgelöst werden. Die N-Glykosylierungsstelle der sekretierten DromeQC (N<sup>42</sup>) befindet sich ebenfalls an der Oberfläche des Makromoleküls (Abbildung 6, Seite 28). Da sich die Glykosylierungen der sekretierten QCs vom Typ 2 an der Enzymoberfläche, abseits des aktiven Zentrums befinden, scheinen diese hauptsächlich zur Proteinlöslichkeit beizutragen, was mit den Untersuchungen zur Enzymaktivität übereinstimmt (siehe oben). Die Beeinflussung der Lokalisation/Sekretion des Enzyms im Ursprungsorganismus wurde bislang nicht untersucht.

In den Kristallstrukturen der DromeQC wurden neben den ersten beiden Acetylglucosaminen der Glykosylierung 5 weitere Mannosemoleküle sowie eine Verzweigung der Oligosaccharidkette nachgewiesen (Abbildung 14, Seite 41) (Koch, Kolenko et al., 2012a).



Man  $\alpha$ 1-3  
 Man  $\alpha$ 1-2 Man  $\alpha$ 1-6 Man  $\alpha$ 1-6 Man  $\beta$ 1-4 GlcNAc  $\beta$ 1-4 GlcNAc  $\beta$ 1- N<sup>42</sup>

Man  $\alpha$ 1-3 Man  $\alpha$ 1-6  
 Man  $\alpha$ 1-2 Man  $\alpha$ 1-3 Man  $\beta$ 1-4 GlcNAc  $\beta$ 1-4 GlcNAc  $\beta$ 1- N<sup>42</sup>

**Abbildung 14** Schematische Darstellung der Glykosylierung der DromeQC Varianten WT (dunkelgrün, PDB-Eintrag 4F9U) und C<sup>113</sup>A/C<sup>136</sup>A (hellgrün, PDB-Eintrag 4F9V) an Position N<sup>42</sup> (Koch, Kolenko et al., 2012a). Neben den beiden N-Acetylglucosaminresten (GlcNAc) der Oligosaccharidkette konnte die Struktur 5 weiterer Mannosemoleküle (Man) einschließlich einer Verzweigung identifiziert werden.

## 4 Evaluierung der Bindung des kompetitiven QC-Inhibitors PBD150 in Kristallstrukturen von QCs

Die kompetitive Hemmung der QC-Aktivität durch Imidazol- und Benzimidazolderivate wurde erstmals durch Mitarbeiter der Probiodrug AG beschrieben (Schilling et al., 2003a; Schilling et al., 2005). Auf dieser Erkenntnis basierend stellten Imidazol und Benzimidazol die Grundlage für die Weiterentwicklung kompetitiver QC-Inhibitoren dar. Der QC-Inhibitor PBD150 [1-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-3-(3-imidazol-1-yl-propyl)-thioharnstoff] ist einer der ersten potenten Inhibitoren, der aus dem Entwicklungsprozess hervorging (Abbildung 5, Seite 24) (Buchholz et al., 2006). Aufgrund ihrer Eigenschaften wurde diese Verbindung in verschiedenen Studien zur Prüfung einer pharmakologischen Wirkung in zellulären Modellen und in Tierversuchen appliziert (Cynis et al., 2006; Schilling et al., 2008a; Schilling et al., 2008b). Die Interaktion von PBD150 mit der hQC sollte in der vorliegenden Arbeit analysiert werden.

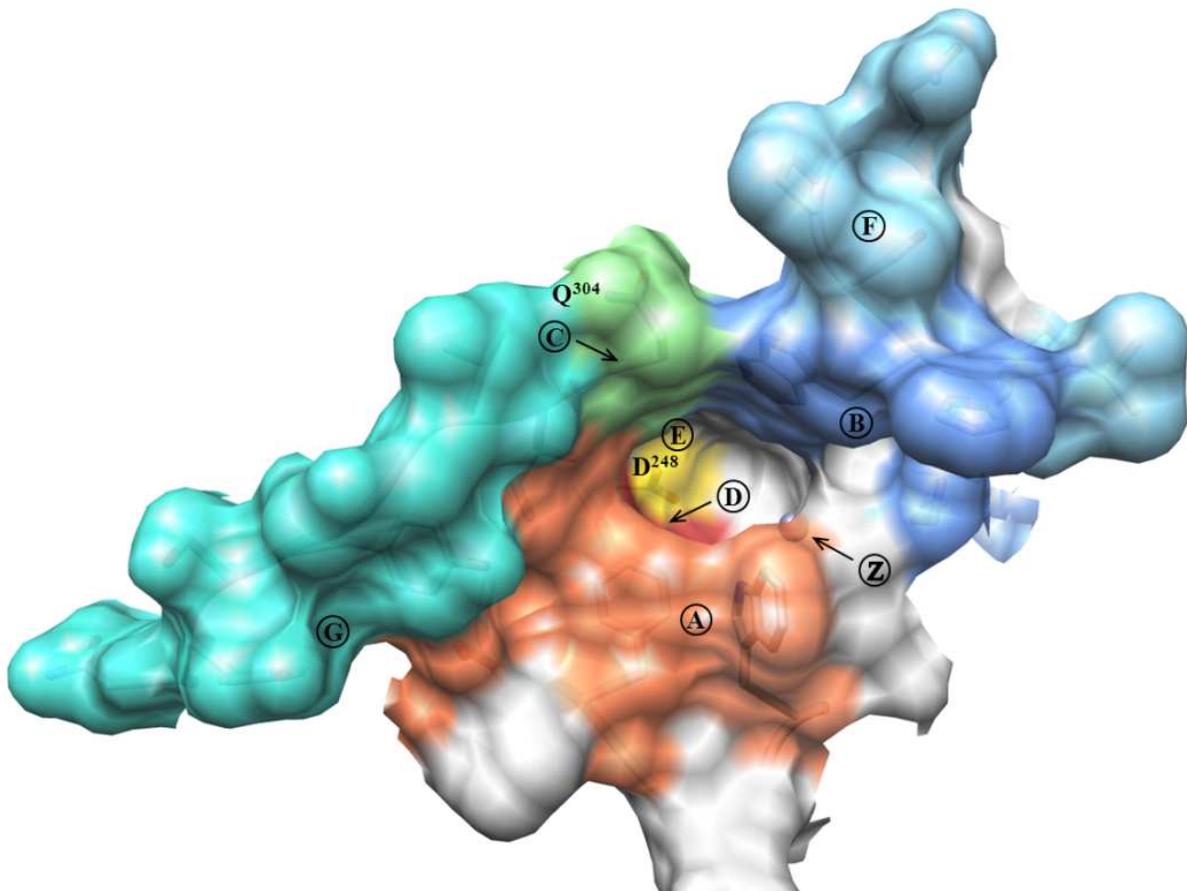
Bereits 1997 beschrieben Lee und Mitarbeiter die Entwicklung eines Carboxypeptidase A Inhibitors auf Basis von Imidazol als Zink-koordinierendem Liganden (Lee et al., 1997). Eine Wechselwirkung zwischen dem basischen Stickstoff des Imidazolrings und dem katalytischen Zinkion wurde auch als primäre Enzym-Liganden-Interaktion durch Kokristallisation von hQC mit Imidazol und verschiedenen Imidazolderivaten bestätigt (Huang et al., 2005; Ruiz-Carrillo, Koch et al., 2011). Mit Hilfe einer Analyse der quantitativen Struktur-Wirkungsbeziehung konnte festgestellt werden, dass Derivatisierungen an Position 1 und Position 4/5 des Imidazols sowie an Position 5/6 des Benzimidazols die Ligandeninteraktion verbessern können (Abbildung A5, Seite 78) (Buchholz et al., 2006; Buchholz et al., 2009; Ramsbeck et al., 2013). Durch die folgende systematische Modifikation der Imidazolderivate unter Auswertung der Struktur-Wirkungsbeziehung wurden Imidazol-1-alkylthioharnstoffe als eine Leitstruktur der Wirkstoffentwicklung selektiert. Aus diesem Entwicklungsprozess gingen die Struktur PBD150 und ähnliche Inhibitoren (z.B. PQ0352, Tabelle A3, Seite 79) hervor. Ein „flexible alignment“ mit einem Tripeptidsubstrat (QFA) zeigte eine Übereinstimmung der pharmakophoren Merkmale des Moleküls mit essentiellen Eigenschaften des Substrates (Buchholz et al., 2006):

- Die primäre Interaktion zum katalytischen Zinkion erfolgt beim Substrat mit hoher Wahrscheinlichkeit über den  $\gamma$ -Carbonylsauerstoff, bzw. über den basischen Stickstoff des Imidazolrings des Inhibitors.
- Der  $\alpha$ -Amidstickstoff der zweiten N-terminalen Aminosäure bzw. der Stickstoff 1 der Thioharnstoffgruppe können als Protonendonatoren zur Ausbildung einer Wasserstoffbrücke wirken.
- Es zeigte sich, dass eine Propylgruppe als Imidazol-Thioharnstoff-Linker eine optimale räumliche Ausdehnung besitzt und Flexibilität vermittelt.
- Mittels der 3,4-Dimethoxyphenylgruppe ist eine hydrophobe Enzym-Liganden-Interaktion möglich, die beim Substrat durch die Seitenkette des Phenylalanins erfolgt.
- Über die Methoxygruppen können weitere Wechselwirkungen (hydrophob oder polar) aufgebaut werden.

Der Einfluss dieser Pharmakophorpunkte auf die Struktur-Wirkungsbeziehung ist in Abbildung A5, Seite 78 zusammengefasst (*Ruiz-Carrillo, Koch et al., 2011*).

Parallel zu diesen Arbeiten gelang der Gruppe um Huang die Aufklärung der Röntgenkristallstruktur der ersten tierischen QC (hQC) in Interaktion mit verschiedenen, auf Imidazol basierenden Liganden (Huang et al., 2005), deren inhibitorische Potenz gegenüber der hQC zuvor durch Mitarbeiter der Probiobdrug AG nachgewiesen wurde (Schilling et al. 2003a). Durch diese und die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse (*Ruiz-Carrillo, Koch et al., 2011; Koch et al., 2012b*) konnten folgende, für eine Enzym-Liganden/Inhibitor-Interaktion bedeutsamen Bereiche identifiziert werden (Abbildung 15, Seite 44):

- Z)** katalytisch aktives Zinkion (Primärinteraktion mit metallbindender Gruppe),
- A)** hydrophober Bereich am Eingang des aktiven Zentrums (hQC: I<sup>303</sup> – F<sup>325</sup> – W<sup>329</sup> – S<sup>323</sup>),
- B)** polarer Bereich am Eingang des aktiven Zentrums (hQC: K<sup>144</sup> – H<sup>206</sup> – W<sup>207</sup>),
- C)** Protonenakzeptor/-donator am Eingang des aktiven Zentrums (hQC: Q<sup>304</sup>  $\alpha$ -Amid),
- D)** hydrophober Bereich im aktiven Zentrum (hQC: L<sup>249</sup> – I<sup>321</sup>),
- E)** Protonenakzeptor im aktiven Zentrum (hQC: D<sup>248</sup>  $\beta$ -Carboxygruppe).



**Abbildung 15** Schematische Darstellung der potentielle Interaktionsbereiche von hQC (PDB-Eintrag 3SI0) und kompetitiven Inhibitoren. Zur Erläuterung der Bereiche A bis E und Z siehe Textpassage oberhalb der Abbildung. Die Bereiche F (L<sup>205</sup> – Q<sup>210</sup>)<sub>hQC</sub> und G (N<sup>296</sup> – Q<sup>304</sup>)<sub>hQC</sub> sind weniger stark konservierte *Loop*-Regionen der tierischen QCs und könnten für die Entwicklung selektiver Inhibitoren genutzt werden.

Diese potentiellen Interaktionsstellen sind in allen untersuchten QCs stark konserviert (Abbildung A1, Seite 74), so dass ähnliche Bindungsmodi und Bindungskonstanten von PBD150 zu verschiedenen QCs, z.B. hQC und isohQC, zu erwarten waren.

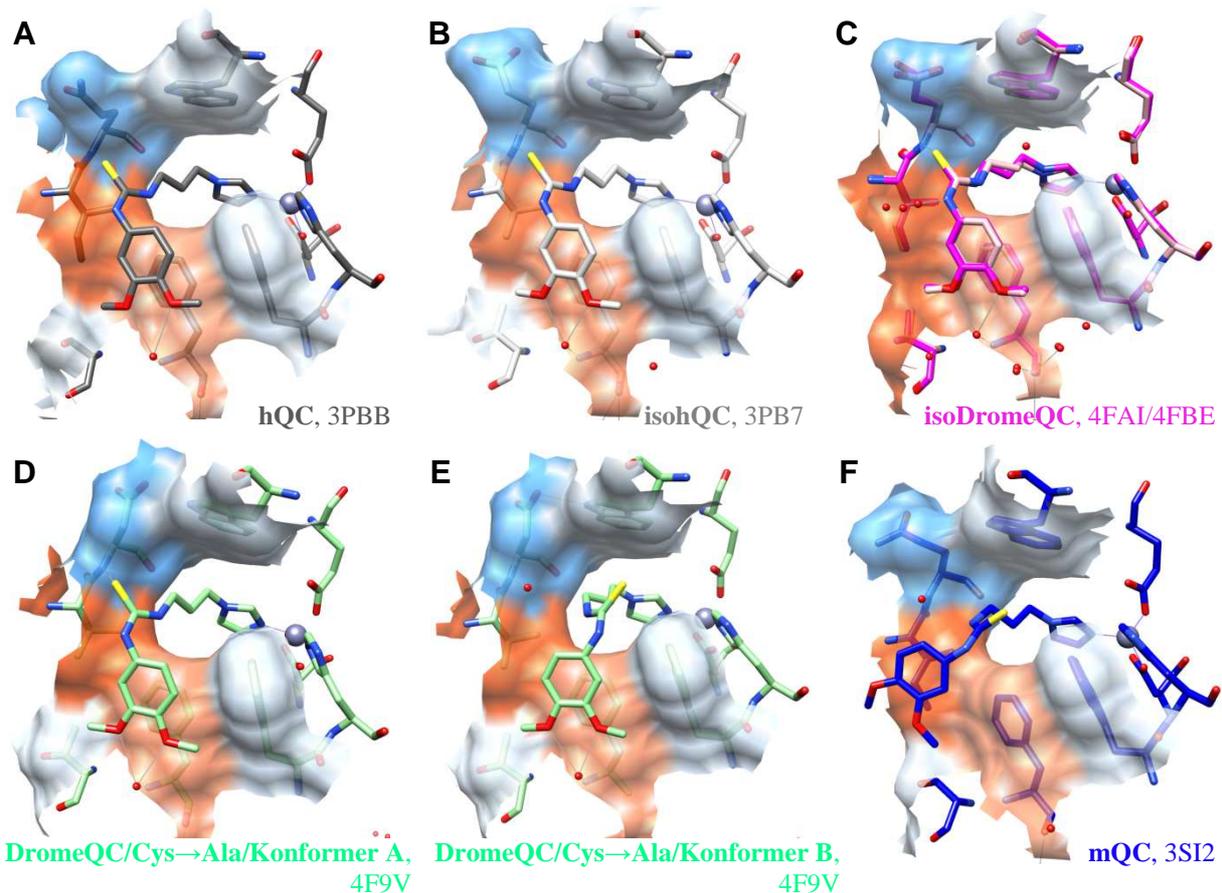
Interessanterweise ergab der Vergleich der Kristallstrukturen mit PBD150 Unterschiede in der Ausrichtung der Verbindung im aktiven Zentrum. Anhand der Strukturanalysen wurden die

im Folgenden dargelegten Wechselwirkungen identifiziert (Huang et al., 2011; Ruiz-Carrillo, Koch et al., 2011; Koch et al., 2012b).

Die zu erwartende primäre Enzym-Liganden-Interaktion des basischen Imidazolstickstoffs mit dem Zinkion (Interaktion mit **Z**) konnte durch die Röntgenkristallstrukturen bestätigt werden. Jedoch wurden drei verschiedene Ausrichtungen des Phenylthioharnstoffrests ersichtlich (Abbildung 16, Seite 46):

- I** Bei den Röntgenkristallstrukturen der hQC (PDB-Eintrag 3PBB), isohQC (PDB-Eintrag 3PB7), isoDromeQC (PDB-Einträge 4FAI/4FBE) sowie des Konformers A der DromeQC/Cys→Ala Variante (PDB-Eintrag 4F9V) ist die Bildung einer Wasserstoffbrücke zwischen dem Schwefel der Thioharnstoffgruppe und einem Protonenakzeptor/-donator am Eingang des aktiven Zentrums (**C**) festzustellen. Es tritt eine Wechselwirkung der 3,4-Dimethoxyphenylgruppe mit dem hydrophoben Bereich am Eingang des aktiven Zentrums (**A**) auf. Des Weiteren bildet sich ein Wasserstoffbrückennetzwerk zwischen den Sauerstoffatomen der Methoxygruppen und dem  $\alpha$ -Amid des Phenylalanins im hydrophoben Interaktionsbereich **A** (Abbildung 16A-D, Seite 46).
- II** Im Fall des Konformers B der DromeQC/Cys→Ala Variante ist durch eine Rotation der Thioharnstoffgruppe keine Wechselwirkung mit dem Protonenakzeptor/-donator am Eingang des aktiven Zentrums (**C**) möglich. Stattdessen erfolgt eine Interaktion dieser Bindungsregion des Enzyms mit einem Lösungsmittelmolekül (Wasser). Die zum hydrophoben Bereich am Eingang des aktiven Zentrums (**A**) beschriebenen Wechselwirkungen bleiben erhalten (Abbildung 16E, Seite 46) (Koch et al., 2012b).
- III** In der Kristallstruktur der mQC (PDB-Eintrag 3SI2) ermöglicht eine stärkere Rotation der Thioharnstoffgruppe des Inhibitors PBD150 die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen N1 der Thioharnstoffgruppe und dem Protonenakzeptor/-donator am Eingang des aktiven Zentrums (**C**). Ebenso ist eine Neupositionierung der 3,4-Dimethoxyphenylgruppe zu beobachten. Für die Interaktion mit dem hydrophoben Bereich am Eingang des aktiven Zentrums (**A**) scheint der Beitrag des Isoleucins verstärkt. Die Ausbildung eines Wasserstoffbrückennetzwerkes zum Phenylalanin findet nicht statt (Abbildung 16F, Seite 46).

Im Gegensatz zur gut definierten Position von PBD150 in den beschriebenen Kristallstrukturen ist die Lage des Inhibitors bei der Kokristallisation mit der DromeQC/Wildtyp (PDB-Eintrag 4F9U) weniger exakt zu bestimmen. Eine Interaktion der Thioharnstoffgruppe mit C ist zu beobachten. Die 3,4-Dimethoxyphenylgruppe zeigt jedoch ein hohes Maß an Flexibilität, was aus einer geringen Elektronendichte geschlussfolgert wird (Koch *et al.*, 2012b).



**Abbildung 16** Darstellung der Bindungsmodi des kompetitiven Inhibitors PBD150 in Röntgenkristallstrukturen verschiedener tierischer QCs. A) hQC (WT, PDB-Eintrag 3PBB): Huang *et al.*, 2011; B) isohQC (WT, PDB-Eintrag 3PB7): Huang *et al.*, 2011; C) isoDromeQC (WT, PDB-Eintrag 4FAI; Cys→Ala, PDB-Eintrag 4FBE): Koch *et al.*, 2012b; D) u. E) DromeQC (Cys→Ala, PDB-Eintrag 4F9V): Koch *et al.*, 2012b; F) mQC (WT, PDB-Eintrag 3SI2): Ruiz-Carrillo, Koch *et al.*, 2011 Ausrichtungsvariante des Phenylthioharnstoffrests: **I**: A) - D); **II**: E); **III**: F)

Die Ausrichtung des Inhibitors in den Röntgenkristallstrukturen korreliert nicht klar mit einer Abstufung der  $K_i$ -Werte, welche für die verschiedenen QCs und PBD150 mittels enzymkinetischer Methoden ermittelt wurden. Zum Beispiel weist PBD150 in den Kristallstrukturen von hQC und isohQC einen annähernd gleichen Bindungsmodus auf, die Inhibitorkonstante  $K_i$  unterscheidet sich gegenüber beiden Enzymen jedoch um den

Faktor 2 bzw. 19 (Tabelle 3) (Cynis et al., 2011; Huang et al., 2011). Der  $K_i$ -Wert gegenüber der DromeQC, bei der die Interaktion der 3,4-Dimethoxyphenylgruppe in der Kristallstruktur nicht definiert ist, weist einen um den Faktor 10 höheren Wert als gegenüber der hQC auf. Dies trifft auch auf die DromeQC/Cys→Ala Variante zu, die in ihrer Kristallstruktur eine Flexibilität der Thioharnstoffgruppe zeigt (Koch et al., 2012b). Dementsprechend konnte ein hoher  $K_i$ -Wert ermittelt werden, was auf eine schwache Interaktion des Phenylrings schließen lässt.

Der Bindungsmodus von PBD150 ist in der Röntgenkristallstruktur von hQC (3PBB) und isoDromeQC (4FAI/4FBE) annähernd identisch (Ausrichtung **I** des Phenylthioharnstoffs; Abbildung 16A und C, Seite 46). Es wurden ähnliche Inhibitorkonstanten bestimmt (Tabelle 3). Hingegen unterscheidet sich die Konformation von PBD150 in der Kristallstruktur von hQC und mQC (Ausrichtungen **I** und **III**, Abbildung 16A und F, Seite 46). Die enzymkinetisch ermittelten  $K_i$ -Werte zeigen aber keinen Unterschied (Tabelle 3).

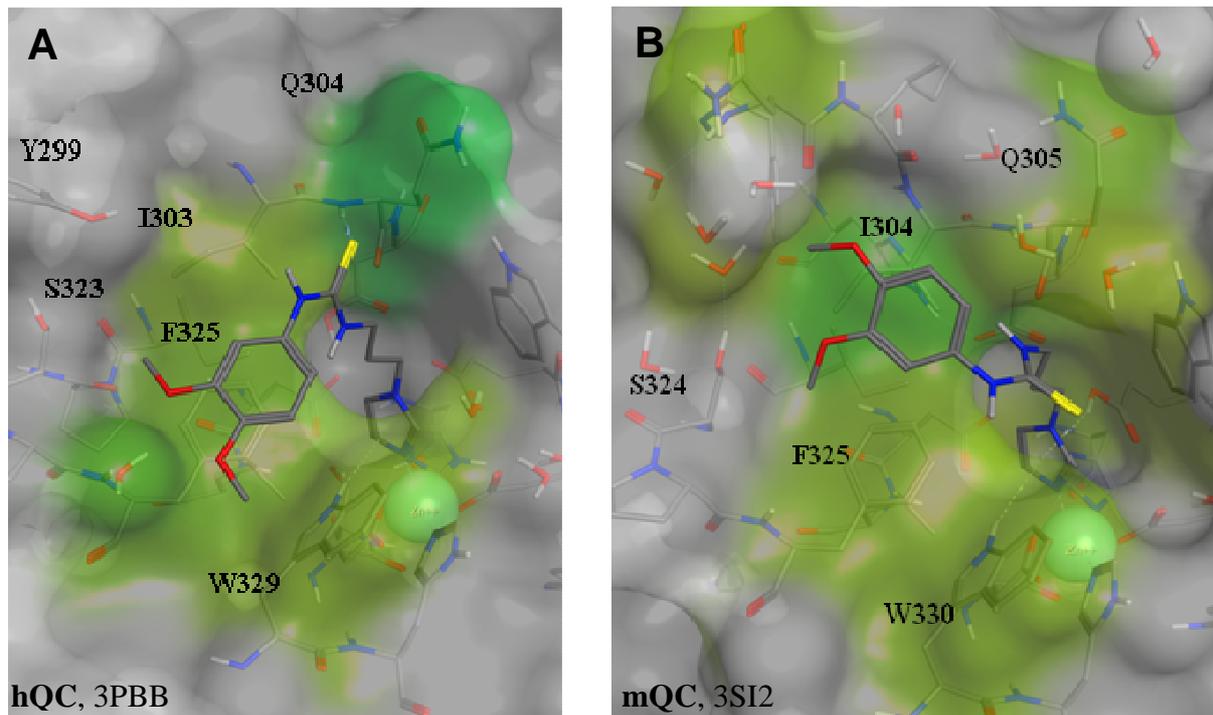
**Tabelle 3** Dissoziationskonstante  $K_i$  von PBD150 und verschiedenen tierischen QCs.

	hQC <sup>1)</sup>	isohQC	isoDromeQC <sup>4)</sup>	DromeQC <sup>4)*</sup>	mQC <sup>1)</sup>
$K_i$ [nM]	100 ±10	236 <sup>2)</sup>	97 ±5	940 ±93	114 ±11
		1.817 ±154 <sup>3)</sup>			

<sup>1)</sup> (Ruiz-Carrillo, Koch et al., 2011); <sup>2)</sup> (Cynis et al., 2011); <sup>3)</sup> (Huang et al., 2011) <sup>4)</sup> (Schilling et al., 2007); \* pH 7, alle übrigen pH 8

Dieser Widerspruch sollte durch eine semiempirische Berechnung<sup>†</sup> der Bindungsenergie von PBD150 auf Basis der Kokristallisationsstrukturen von hQC und mQC untersucht werden. Es zeigte sich, dass die Affinität von PBD150 gegenüber der QC bei einer Interaktion entsprechend des in der mQC-Struktur 3SI2 gezeigten Bindungsmodus *circa* 4-10x höher sein sollte, als bei einem Bindungsmodus, wie er sich in der hQC-Kristallstruktur 3PBB darstellt. Der  $K_i$ -Wert von PBD150 müsste demzufolge gegenüber der mQC deutlich geringer sein als gegenüber der hQC (Abbildung 17, Seite 48) (Koch et al., 2012b). Diese Diskrepanz (Tabelle 3) deutet darauf hin, dass die durch die Röntgenkristallstrukturen abgebildeten Interaktionen vom Enzym-Inhibitor-Interaktionsmechanismus in einer wässrigen Lösung abweichen können.

<sup>†</sup> Darstellung und Berechnung mittels der Software MOE/DivCon (Molecular Operating Environment, vers. 2010.10, Chemical Computing Group, Montreal, QC, Kanada mit integrierter DivCon Discovery Suite, build 438; QuantumBio Inc., State College, PA, USA)



**Abbildung 17** Darstellung der durch Kokristallisation ermittelte Interaktion des QC-Inhibitors PBD150 mit der humanen (A) bzw. murinen QC (B). Die Aminosäuren der Interaktionsbereiche A (hQC: I<sup>303</sup>, F<sup>325</sup>, W<sup>329</sup>, S<sup>323</sup>) und C (hQC: Q<sup>304</sup>) (vergl. Abbildung 15, Seite 44) sind entsprechend des jeweiligen „Attractionsterms“  $E_{AB}$  eingefärbt, wobei ein dunklerer Farbton eine höhere Bindungsenergie symbolisiert. (Koch *et al.*, 2012b)

Eine weitere Analyse der Röntgenkristallstrukturen zeigte, dass in allen abgebildeten Konformationen eine Beeinflussung des Enzym-Inhibitor-Komplexes durch intermolekulare Wechselwirkungen stattfindet (Koch, Kolenko *et al.*, 2012a; Koch *et al.*, 2012b). Bedingt dadurch spiegeln die Kristallstrukturen eine scheinbare Flexibilität der Interaktion wider. Vermutlich entsprechen die beobachteten Konformationen jedoch alle nicht vollständig der vorherrschenden Bindung von PBD150 – insbesondere des Phenylthioharnstoffrests – in wässriger Lösung.

Ein geeignetes Mittel, um den jeweiligen Beitrag bestimmter Aminosäuren oder Enzymbereiche zur Interaktion mit dem Liganden/Inhibitor zu beurteilen, ist die Mutationsanalyse. Hierbei werden bestimmte Aminosäuren ausgetauscht, und der Einfluss auf die katalytischen Parameter ermittelt. Anhand der Röntgenkristallstrukturen konnten die potentiell an der Wechselwirkung mit PBD150 beteiligten, und somit für Mutationsuntersuchungen interessanten Aminosäurereste identifiziert werden.

Die vorliegende Arbeit fokussiert auf den, für eine Wechselwirkung mit PBD150 zentralen, Interaktionsbereich A ( $I^{303} - F^{325} - W^{329} - S^{323}$ )<sub>hQC</sub>.

Um den Einfluss der ausgetauschten Aminosäuren sowohl auf die Katalyse als auch auf die Inhibitorinteraktion zu beurteilen, wurden die enzymkinetischen Parameter  $K_M$ ,  $k_{cat}$  sowie  $K_i$  für die jeweilige hQC-Variante ermittelt und mit den Kennwerten der nicht modifizierten hQC/Wildtyp verglichen. Als Kenngröße wurde der Faktor Wildtyp/Variante berechnet. Einen Überblick über die Auswirkungen der in der vorliegenden Arbeit diskutierten hQC-Varianten auf  $K_i$  von kompetitiven Inhibitorgrundstrukturen sowie PBD150 bietet Tabelle 4, Seite 50.

Anhand unveränderter  $K_i$ -Werte kleiner Inhibitor-moleküle (Imidazol, Benzimidazol, Cysteamin), konnte nachgewiesen werden, dass eine Variation der Aminosäuren des betrachteten potentiellen Interaktionsbereichs eine Wechselwirkung mit dem katalytischen Zentrum nicht beeinträchtigt (Bindung überwiegend Primärinteraktion - **Z**).

Die Aktivität der hQC wurde durch Mutation von  $F^{325}$  und  $W^{329}$  beeinflusst, was eine Beteiligung der Aminosäuren bei der Substratbindung bzw. bei der Umsetzung impliziert (*Koch et al., 2012b*).

Der Austausch von  $W^{329}$ <sub>hQC</sub> führt zur Reduktion von  $k_{cat}$  und zum Anstieg von  $K_M$ . Lediglich Enzymvarianten, bei denen der Indolring des Tryptophans durch einen Benzolring (Phenylalanin, Tyrosin) ersetzt wurde, zeigten eine ausreichende katalytische Aktivität für die Ermittlung von  $K_i$ -Werten. Im Fall der Enzymvariante  $W^{329}F$ <sub>hQC</sub> sanken die  $K_i$ -Werte der kleinen Inhibitor-moleküle, welche hauptsächlich über die Primärinteraktion (**Z**) mit dem Enzym in Wechselwirkung treten. Dies deutet auf eine verbesserte Interaktion mit dem katalytischen Zinkion hin. Auch auf die Enzym-Inhibitor-Interaktion zu Vertretern anderer Inhibitor-klassen scheint sich dieser Austausch nicht oder leicht begünstigend auszuwirken (Tabelle 4, Seite 50) (*Koch et al., 2012b; Ramsbeck et al. 2013*).

Während der Tyrosin-Austausch ( $W^{329}Y$ <sub>hQC</sub>) die Potenz von PBD150 nicht beeinflusst, steigt der  $K_i$ -Wert von Vertretern anderer Inhibitor-klassen, wie zum Beispiel PQ1025 oder PQ1050 an (Tabelle 4, Seite 50). Bei diesen Liganden leistet die Wechselwirkung zu  $W^{329}$ <sub>hQC</sub> offenbar einen größeren Beitrag zur Enzym-Inhibitor-Interaktion als bei der Bindung von PBD150 (*Ramsbeck et al. 2013*).

**Tabelle 4** Zusammenfassung zum Einfluss der im Rahmen der vorliegenden Arbeit beschriebenen hQC-Varianten auf die Dissoziationskonstante  $K_i$  von kompetitiven Inhibitoren. **keine Bedeutung**, **mäßige Bedeutung**, **grosse Bedeutung** der betrachteten Aminosäure für die Enzym-Inhibitor-Interaktion, Angegeben ist das Verhältnis  $X = K_{i \text{ hQC-Variante}}/K_{i \text{ WT}}$ . **0,02  $\leq$  X < 0,1**; **0,1  $\leq$  X  $\leq$  10**; **10 < X  $\leq$  50**; **50 < X**

hQC-Variante		Inhibitor	PBD150	PQ0352	PQ1025	PQ1050	Imidazol	Benzimidazol	1-Methylimidazol	1-Benzylimidazol	Cysteamin
W <sup>329</sup>	F		1	0,4	1	1	0,2	0,3	0,3	0,2	1
	Y		1	2	32	83	1	4	1	4	1
F <sup>325</sup>	A		190	111	45	31	4	11	5	7	1
	N		815	337	19	29	4	7	6	7	1
	Y		381	209	32	31	3	6	3	4	1
I <sup>303</sup>	A		66	14	2	1	2	1	10	9	1
	N		112	37	2	1	2	1	9	7	1
	F		6	2	1	2	2	2	3	3	1
	V		2	1	1	1	1	1	1	1	1
S <sup>323</sup>	A		0,2	0,1	0,4	1	1	1	1	1	1
	V		0,1	0,04	1	1	1	1	1	1	1
	T		0,2	0,1	0,5	1	1	1	1	1	1

Die chemische Bezeichnung und Strukturformel der Inhibitoren sind in Tabelle A3, Seite 79 zu entnehmen.

Der Austausch von I<sup>303</sup><sub>hQC</sub> oder F<sup>325</sup><sub>hQC</sub> lässt auf einen annähernd gleichwertigen Beitrag beider Aminosäureseitenketten zur Bindung von PBD150 schließen (Tabelle 4). Dies würde einer Interaktion entsprechen, wie sie sich in der Röntgenkristallstruktur mQC-PBD150 darstellt (Abbildung 16, Seite 46) (PDB-Eintrag 3SI2). Eine derartige Positionierung der 3,4-Dimethoxyphenylgruppe würde des Weiteren die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen Interaktionsbereich C (Q<sup>304</sup><sub>hQC</sub>  $\alpha$ -Amid, vergleiche Abbildung 15, Seite 44) und dem Stickstoff 1 (N1) der Thioharnstoffgruppe von PBD150 ermöglichen. Wie Buchholz und Mitarbeiter 2006 zeigen konnten, vermittelt dieser Stickstoff einen wesentlichen Beitrag zur Interaktion von PBD150 und hQC (Abbildung A5, Seite 78). Im Falle einer Interaktion des Schwefels der Thioharnstoffgruppe mit Interaktionsbereich C (Q<sup>304</sup><sub>hQC</sub>  $\alpha$ -Amid) wäre die Bedeutung von N1 für die Enzym-Inhibitor-Interaktion nicht widerspiegelt.

Die Aminosäuren I<sup>303</sup><sub>hQC</sub>, F<sup>325</sup><sub>hQC</sub> und W<sup>329</sup><sub>hQC</sub> des Interaktionsbereiches A sind stark konserviert. Es tritt aber eine Variation des hydrophoben Charakters eines Aminosäurerests am Rand dieses Bereiches auf. So befindet sich an Position 323 in der Struktur der humanen QC ein Serin. Die isoQC sowie die DromeQC weisen in dieser Position ein Threonin auf. Bei der isoDromeQC befindet sich an dieser Stelle ein Valin, das den hydrophoben Interaktionsbereich A ausdehnt (Abbildungen 16C und A1, Seiten 46 und 74). Die Ergebnisse

der Mutationsanalyse von  $S^{323}_{hQC}$  weisen darauf hin, dass eine Ausweitung der hydrophoben Region zur verbesserten Wechselwirkung mit Inhibitoren, die stark mit  $F^{325}_{hQC}$  oder den Aminosäuren  $(I^{303}/F^{325})_{hQC}$  interagieren, führt (Tabelle 4, Seite 50). Besonders deutlich wird dies für die hQC-Variante  $S^{323}V_{hQC}$ . Der  $K_i$ -Wert von PBD150 reduziert sich gegenüber der Mutante auf *circa*  $1/10$  der Inhibitorkonstante gegenüber dem hQC-Wildtyp (Koch *et al.*, 2012b). Für den Inhibitor PQ0352, einem Derivat von PBD150 mit Methylierung an Position 5 des Imidazolrings, reduziert sich der  $K_i$ -Wert gegenüber dieser hQC-Variante sogar auf  $1/25$ . Auf die Bindung von Inhibitoren, die stärker mit den Aminosäuren  $(F^{325}/W^{329})_{hQC}$  interagieren (PQ1025, PQ1050), wirkt sich ein Austausch von  $S^{323}_{hQC}$  hingegen kaum aus (Tabelle 4, Seite 50) (Ramsbeck *et al.* 2013).

Zusammenfassend ergaben die Untersuchungen, dass eine hydrophobe Interaktion mit Aminosäureseitenketten am Eingang des aktiven Zentrums der hQC [Interaktionsbereich **A**:  $(I^{303} - F^{325} - W^{329} - S^{323})_{hQC}$ , Abbildung 15, Seite 44] wesentlich an der Bindung von PBD150 beteiligt ist, wobei die Aminosäuren  $(I^{303}$  und  $F^{325})_{hQC}$  den größeren Beitrag zur Interaktion leisten. Eine Ausweitung des hydrophoben Charakters der Region  $(I^{303} - F^{325})_{hQC}$  durch Austausch von  $S^{323}V_{hQC}$  verbesserte die Bindung von PBD150 deutlich. Diese Ergebnisse der Mutationsuntersuchungen bestärken die durch semiempirische Berechnung der Bindungsenergien zwischen PBD150 – hQC und PBD150 – mQC (Koch *et al.*, 2012b) aufgestellte Vermutung, dass die in der Röntgenkristallstruktur 3PBB (PBD150 – hQC) dargestellte Interaktion (Ausrichtungsvariante **I**, Abbildung 16A, Seite 46) nicht der in Lösung vorherrschenden Konformation des Inhibitors entspricht. Diese scheint eher mit der, aus der Kristallstruktur 3SI2 (PBD150 – mQC) ersichtlichen Ausrichtung der 3,4-Dimethoxyphenylgruppe von PBD150 übereinzustimmen (Ausrichtungsvariante **III**, Abbildung 16F, Seite 46).

Der ortsgerichtete Austausch von Aminosäuren im Bereich des aktiven Zentrums der hQC leistete somit einen Beitrag zur Entschlüsselung des Bindungsmodus von PBD150, insbesondere der 3,4-Dimethoxyphenylgruppe. Darüber hinaus wurden die generierten hQC-Varianten auch zur Charakterisierung anderer QC-Inhibitoren verwendet und ergänzen somit die Untersuchungen zur Entwicklung neuer Inhibitoren anderer Substanzklassen.

## 5 Zusammenfassung

Glutaminylzyklasen (QCs; EC 2.3.2.5) katalysieren die intramolekulare Zyklisierung von N-terminalen Glutaminyl- und Glutamylresten zu Pyroglutamat (pE). Bei dieser Reaktion wird Ammoniak bzw. Wasser freigesetzt.

Substrate der humanen QC sind Strukturproteine (z.B. Fibronectin, Kollagen), Enzyme (u.a.  $\alpha$ -Amylase, Ribonuklease 4), Chemokine (z.B. CCL2, CX3CL1) oder Peptidhormone wie Gonadoliberin (GnRH) oder Thyreoliberin (TRH). Die N-terminale pE-Modifikation vermittelt die Interaktion mit Rezeptoren und verleiht Stabilität gegenüber dem Abbau durch Aminopeptidasen. Für verschiedene Amyloidosen, wie z.B. der Alzheimer-Krankheit, ist eine Ablagerung von pE-Peptiden charakteristisch. Die N-terminale Modifikation verstärkt die Aggregationsneigung und Toxizität der Amyloidpeptide.

Aufgrund der Rolle von QC bei der Bildung von pE-Amyloidpeptiden und pE-modifizierten Chemokinen ist ein derzeitiges Ziel der Wirkstoffforschung die Entwicklung und Prüfung der therapeutischen Wirksamkeit von Inhibitoren der QC. Indikationen für eine Anwendung der Substanzen sind die Alzheimer-Krankheit und Arteriosklerose. Vor kurzem wurde Phase 1 der klinischen Testung erster Wirkstoffe abgeschlossen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung von Enzym-Inhibitor-Interaktionen verschiedener QCs. Im Vordergrund stand dabei die Untersuchung des Bindungsmusters des kompetitiven Inhibitors PBD150. Die Substanz stellt eine Leitstruktur für die Entwicklung von Inhibitoren dar und wurde in verschiedenen Tierstudien appliziert.

Im Rahmen der Arbeit wurden erstmals die QCs aus *Drosophila melanogaster* (DromeQC und isoDromeQC), einem bei der Erforschung der Alzheimer-Krankheit eingesetzten Modellorganismus, kristallisiert und deren Struktur aufgeklärt. Zudem wurden die humane QC und eine DromeQC nach Expression in einem eukaryontischen Organismus, der Hefe *Pichia pastoris*, kristallisiert. Anhand der erhaltenen Tertiärstrukturen konnte nachgewiesen werden, dass diese Enzyme die für sekretierte Proteine typischen posttranslationalen Modifikationen N-Glykosylierung und Disulfidbrücke aufweisen.

Aus den Untersuchungen gingen die folgenden wesentlichen Ergebnisse hervor:

1. Durch Generierung von Cystein-freien Varianten von hQC, DromeQC und isoDromeQC mittels Austausch der in den QCs vom Typ 2 konservierten Cysteine gegen Alanine konnte nachgewiesen werden, dass eine Disulfidverknüpfung in den QCs nicht für die Ausbildung einer katalytisch aktiven Enzymstruktur essentiell ist, sondern zur Konformationsstabilität der sekretierten Enzymformen beiträgt.
2. Der Vergleich der Kristallstrukturen der humanen, der murinen sowie beider *D. melanogaster* QCs weist auf eine hohe Strukturhomologie hin. Ein zentrales, 6-strängiges  $\beta$ -Faltblatt wird von  $\alpha$ -Helices umgeben. Ein katalytisches Zinkion wird mittels eines konservierten Zn-bindenden Motivs komplexiert. Das aktive Zentrum der QCs befindet sich oberflächennah. Die Interaktion mit Substrat oder Inhibitor erfolgt über einen polaren und einen hydrophoben Bereich am Eingang des aktiven Zentrums.
3. Die Kokristallisation der *D. melanogaster* QCs mit dem kompetitiven Inhibitor PBD150 weist auf einen ähnlichen Bindungsmodus wie in den Säuger-QCs hin. Die primäre Enzym-Inhibitor-Interaktion wird zwischen dem katalytischem Zinkion des Enzyms und dem Zink-koordinierenden Teil von PBD150 (Imidazol, basischer Stickstoff) ausgebildet. Die sekundären Enzym-Inhibitor-Interaktionen zwischen den hier betrachteten QCs und PBD150 bestehen im Wesentlichen aus einer hydrophoben Interaktion des Propyllinkers ( $W^{207}_{hQC}$ ), der Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung der Thioharnstoffgruppe ( $Q^{304}_{hQC}$ ), einer hydrophoben Interaktion der 3,4-Dimethoxyphenylgruppe [ $I^{303} - F^{325} - W^{329} - S^{323}$ ] $_{hQC}$  sowie Wechselwirkungen der Methoxygruppen (polar oder hydrophob, z. B.  $F^{325}_{hQC}$ ).
4. Während die enzymkinetisch ermittelte Bindungskonstante von PBD150 gegenüber humaner und muriner QC annähernd identisch ist, zeigen sich deutliche Abweichungen im röntgenkristallographisch dargestellten Bindungsmodus des Inhibitors gegenüber beiden Enzymen. Ursache hierfür sind intermolekulare Wechselwirkungen der Enzym-Inhibitorkomplexe im Kristall, welche die Bindung des 3,4-Dimethoxyphenylrings offenbar beeinflussen. Auch bei den Kristallstrukturen der DromeQCs (DromeQC-C<sup>113</sup>A/C<sup>136</sup>A, PDB-Eintrag 4F9V; isoDromeQC-WT bzw. isoDromeQC-C<sup>136</sup>A/C<sup>164</sup>A, PDB-Einträge 4FAI, 4FBE) wird die Ausrichtung des 3,4-Dimethoxyphenylrings durch intermolekulare Wechselwirkungen beeinflusst und entspricht in der Proteinstruktur PDB-Eintrag 3PBB (hQC) dargestellten Orientierung. Im Rahmen der Röntgenstrukturanalyse der Kokristallisation von DromeQC-WT mit

PBD150 (PDB-Eintrag 4F9U) konnte nur eine geringe Elektronendichte für den 3,4-Dimethoxyphenylring des Inhibitors ermittelt werden, was auf eine hohe Flexibilität dieser Gruppe hinweist.

5. Die Bindung des Inhibitors PBD150 wurde mittels ortsgerichteter Mutagenese und enzymkinetischer Methoden analysiert. Durch Austausch von ( $I^{303}$  und  $F^{325}$ )<sub>hQC</sub> gegen Alanin und Asparagin konnte gezeigt werden, dass beide Aminosäurereste einen bedeutenden Beitrag zur Sekundärinteraktion mit PBD150 leisten. Eine Ausweitung des hydrophoben Wechselwirkungsbereiches im Bereich von  $I^{303}$ <sub>hQC</sub> durch Austausch von  $S^{323}$ <sub>hQC</sub> verstärkte die Interaktion von PBD150.
6. In zusammenfassender Betrachtung der Ergebnisse der Mutationsuntersuchungen und der Resultate einer semiempirischen Berechnung der Bindungsenergien von hQC/mQC und PBD150 sowie unter Einbeziehung der im Rahmen der Inhibitorentwicklung durchgeführten Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehung, lässt sich schlussfolgern, dass eine Interaktion zwischen hQC und PBD150 wahrscheinlicher dem in der Röntgenkristallstruktur der mQC (PDB-Eintrag 3SI2) abgebildeten Bindungsmodus entspricht, als dem, der sich bei Kokristallisation von PBD150 und hQC (PDB-Eintrag 3PBB) darstellt.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzeugten hQC-Varianten stellen eine Basis für die quantitative Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehungen weiterer Inhibitorclassen dar, ohne eine Kokristallisation von Enzym und Ligand vorauszusetzen. Anhand der erhobenen Daten können Ergebnisse aus *in silico* Experimenten besser evaluiert werden. Mithilfe der zur Verfügung stehenden Kristallstrukturen ist es aber auch möglich, potentielle Sekundärinteraktionsstellen für die Ligandenwechselwirkung *in silico* zu identifizieren, auf deren Basis potentere und spezifischere Inhibitoren im Sinne der therapeutischen Zielsetzung entwickelt werden könnten. Analog der Untersuchungen mit PBD150 mittels enzymkinetischer Methoden kämen hierfür insbesondere die kürzlich beschriebenen Benzimidazolderivate in Frage (Ramsbeck *et. al.*, 2013).

## Literatur

- Abraham, G. N. und Podell, D. N. (1981). Pyroglutamic acid. Non-metabolic formation, function in proteins and peptides, and characteristics of the enzymes effecting its removal. *Mol Cell Biochem* 38, 181-190
- Abramov, E., Dolev, I., Fogel, H., Ciccotosto, G. D., Ruff, E., Slutsky, I. (2009). Amyloid-beta as a positive endogenous regulator of release probability at hippocampal synapses. *Nat Neurosci* 12, 1567-1576
- Alberts, I. L., Nadassy, K., Wodak, S. J. (1998). Analysis of zinc binding sites in protein crystal structures. *Protein Sci* 7, 1700-1716
- Alexandru, A., Jagla, W., Graubner, S., Becker, A., Bauscher, C., Kohlmann, S., Sedlmeier, R., Raber, K. A., Cynis, H., Ronicke, R., Reymann, K. G., Petrasch-Parwez, E., Hartlage-Rubsamen, M., Waniek, A., Roßner, S., Schilling, S., Osmand, A. P., Demuth, H.-U., von Horsten, S. (2011). Selective Hippocampal Neurodegeneration in Transgenic Mice Expressing Small Amounts of Truncated A $\beta$  Is Induced by Pyroglutamate-A $\beta$  Formation. *J Neurosci* 31, 12790-12801
- Arii, K., Kobayashi, H., Kai, T., Kokuba, Y. (1999). Degradation kinetics of L-glutamine in aqueous solution. *Eur J Pharm Sci* 9, 75-78
- Awadé, A. C., Cleuziat, P., Gonzalès, T., Robert-Baudouy, J. (1994). Pyrrolidone carboxyl peptidase (Pcp): an enzyme that removes pyroglutamic acid (pGlu) from pGlu-peptides and pGlu-proteins. *Proteins* 20, 34-51
- Azarkan, M., Wintjens, R., Looze, Y., Baeyens-Volant, D. (2004). Detection of three wound-induced proteins in papaya latex. *Phytochemistry* 65, 525-534
- Backstrom, J. R., Lim, G. P., Cullen, M. J., Tökés, Z. A. (1996). Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is synthesized in neurons of the human hippocampus and is capable of degrading the amyloid-beta peptide (1-40). *J Neurosci* 16, 7910-7919
- Baggerman, G., Cerstiaens, A., De Loof, A., Schoofs, L. (2002). Peptidomics of the larval *Drosophila melanogaster* central nervous system. *J Biol Chem* 277, 40368-40374
- Bailey, J. A., Maloney, B., Ge, Y. W., Lahiri, D. K. (2011). Functional Activity of the novel Alzheimer's Amyloid  $\beta$ -Peptide interacting Domain (A $\beta$ ID) in the APP and BACE1 Promoter Sequences and Implications in Activating Apoptotic Genes and in Amyloidogenesis. *Gene* 488, 13-22
- Bañuelos, O., Casqueiro, J., Gutiérrez, S., Riaño, J., Martín, J. F. (2000). The specific transport system for lysine is fully inhibited by ammonium in *Penicillium chrysogenum*: an ammonium-insensitive system allows uptake in carbon-starved cells. *Antonie Van Leeuwenhoek* 77, 91-100
- Bentley, P. H., Kenner, G.W., Sheppard, R.C. (1966). Structures of human gastrins I and II. *Nature* 209, 583-585
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* 28, 235-242
- Blanc, E., Romi-Lebrun, R., Bornet, O., Nakajima, T., Darbon, H. (1998). Solution structure of two new toxins from the venom of the Chinese scorpion *Buthus martensi* Karsch blockers of potassium channels. *Biochemistry* 37, 12412-12418
- Błaszczak, J., Coillie, E. V., Proost, P., Damme, J. V., Opendakker, G., Bujacz, G. D., Wang, J. M., Ji, X. (2000). Complete crystal structure of monocyte chemoattractant protein-2, a CC chemokine that interacts with multiple receptors. *Biochemistry* 39, 14075-14081
- Boix, E., Wu, Y., Vasandani, V. M., Saxena, S. K., Ardelt, W., Ladner, J., Youle, R. J. (1996): Role of the N terminus in RNase A homologues: differences in catalytic activity, ribonuclease inhibitor interaction and cytotoxicity. *J Mol Biol* 257, 992-1007

- Booth, R. E., Lovell, S. C., Misquitta, S. A., Bateman, R. C., Jr. (2004). Human glutaminyl cyclase and bacterial zinc aminopeptidase share a common fold and active site. *BMC Biol* 2, 2-11
- Bora, R. P. und Prabhakar, R. (2010). Elucidation of interactions of Alzheimer amyloid beta peptides (Abeta40 and Abeta42) with insulin degrading enzyme: a molecular dynamics study. *Biochemistry* 49, 3947-3956
- Bosch, T. C., Augustin, R., Anton-Erxleben, F., Fraune, S., Hemmrich, G., Zill, H., Rosenstiel, P., Jacobs, G., Schreiber, S., Leippe, M., Stanisak, M., Grötzinger, J., Jung, S., Podschun, R., Bartels, J., Harder, J., Schröder, J. M. (2009). Uncovering the evolutionary history of innate immunity: the simple metazoan Hydra uses epithelial cells for host defence. *Dev Comp Immunol* 33, 559-569
- Buchholz, M., Heiser, U., Schilling, S., Niestroj, A. J., Zunkel, K., Demuth, H.-U. (2006). The first potent inhibitors for human glutaminyl cyclase: synthesis and structure-activity relationship. *J Med Chem* 49, 664-677
- Buchholz, M., Hamann, A., Aust, S., Brandt, W., Bohme, L., Hoffmann, T., Schilling, S., Demuth, H.-U., Heiser, U. (2009). Inhibitors for human glutaminyl cyclase by structure based design and bioisosteric replacement. *J Med Chem* 52, 7069-7080
- Busby, W. H. J., Quackenbush, G. E., Humm, J., Youngblood, W. W., Kizer, J. S. (1987). An enzyme(s) that converts glutaminyl-peptides into pyroglutamyl-peptides. Presence in pituitary, brain, adrenal medulla, and lymphocytes. *J Biol Chem* 262, 8532-8536
- Cacquevel, M., Lebeurrier, N., Cheenne, S., Vivien, D. (2004). Cytokines in neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Curr Drug Targets* 5, 529-534
- Calvaresi, M., Garavelli, M., Bottoni, A. (2008). Computational evidence for the catalytic mechanism of glutaminyl cyclase. A DFT investigation. *Proteins* 73, 527-538
- Carrillo, D. R., Parthier, C., Janckel, N., Grandke, J., Stelter, M., Schilling, S., Boehme, M., Neumann, P., Wolf, R., Demuth, H.-U., Stubbs, M. T., Rahfeld, J. U. (2010). Kinetic and structural characterization of bacterial glutaminyl cyclases from *Zymomonas mobilis* and *Myxococcus xanthus*. *Biol Chem* 391, 1419-1428
- Chang, E. S., Prestwich, G.D., Bruce, M. J. (1990). Amino acid sequence of a peptide with both molt-inhibiting and hyperglycemic activities in the lobster, *Homarus americanus*. *Biochem Biophys Res Commun* 171, 818-826
- Charo, I. F. und Taubman, M. B. (2004). Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res* 95, 858-866
- Chevrier, B., Schalk, C., Orchymont, H., Rondeau, J. M., Moras, D., Tarnus, C. (1994). Crystal structure of *Aeromonas proteolytica* aminopeptidase: a prototypical member of the co-catalytic zinc enzyme family. *Structure* 2, 283-291
- Click, E. M. und Bornstein, P. (1970). Isolation and characterization of the cyanogen bromide peptides from the alpha 1 and alpha 2 chains of human skin collagen. *Biochemistry* 9, 4699-4706
- Craig, A. G., Zafaralla, G., Cruz, L. J., Santos, A. D., Hillyard, D. R., Dykert, J., Rivier, J. E., Gray, W. R., Imperial, J., DelaCruz, R. G., Sporning, A., Terlau, H., West, P. J., Yoshikami, D., Olivera, B. M. (1998). An O-glycosylated neuroexcitatory conus peptide. *Biochemistry* 37, 16019-16025
- Cregg, J. M., Vedvick, T. S., Raschke, W. C. (1993). Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology* 11, 905-910
- Cummins, P. M. und O'Connor, B. (1998). Pyroglutamyl peptidase: an overview of the three known enzymatic forms. *Biochim Biophys Acta* 1429, 1-17

- Cynis, H., Schilling, S., Bodnár, M., Hoffmann, T., Heiser, U., Saido, T. C., Demuth, H.-U. (2006). Inhibition of glutaminyl cyclase alters pyroglutamate formation in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1764, 1618-1625
- Cynis, H., Rahfeld, J. U., Stephan, A., Kehlen, A., Koch, B., Wermann, M., Demuth, H.-U., Schilling, S. (2008a). Isolation of an isoenzyme of human glutaminyl cyclase: retention in the Golgi complex suggests involvement in the protein maturation machinery. *J Mol Biol* 379, 966-980
- Cynis, H., Scheel, E., Saido, T. C., Schilling, S., Demuth, H.-U. (2008b). Amyloidogenic processing of amyloid precursor protein: evidence of a pivotal role of glutaminyl cyclase in generation of pyroglutamate-modified amyloid-beta. *Biochemistry* 47, 7405-7413
- Cynis, H., Hoffmann, T., Friedrich, D., Kehlen, A., Gans, K., Kleinschmidt, M., Rahfeld, J. U., Wolf, R., Wermann, M., Stephan, A., Haegele, M., Sedlmeier, R., Graubner, S., Jagla, W., Müller, A., Eichentopf, R., Heiser, U., Seifert, F., Quax, P. H., de Vries, M. R., Hesse, I., Trautwein, D., Wollert, U., Berg, S., Freyse, E. J., Schilling, S., Demuth, H.-U. (2011). The isoenzyme of glutaminyl cyclase is an important regulator of monocyte infiltration under inflammatory conditions. *EMBO Mol Med* 3, 545-558
- Cynis, H., Kehlen, A., Haegele, M., Hoffmann, T., Heiser, U., Fujii, M., Shibasaki, Y., Yoneyama, H., Schilling, S., Demuth, H.-U. (2013). Inhibition of Glutaminyl Cyclases alleviates CCL2-mediated inflammation of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Int J Exp Pathol* 94, 217-225
- Cynis, H., Funkelstein, L., Toneff, T., Mosier, C., Ziegler, M., Koch, B., Demuth, H.-U., Hook, V. PyroGlu-A $\beta$  and Glutaminyl Cyclase are Co-Localized with A $\beta$  in Secretory Vesicles and Undergo Activity-Dependent Secretion. *Neurodegener Dis* (eingereicht)
- Dahl, S. W., Slaughter, C., Lauritzen, C., Bateman, R. C. Jr., Connerton, I., Pedersen, J. (2000). Carica papaya glutamine cyclotransferase belongs to a novel plant enzyme subfamily: cloning and characterization of the recombinant enzyme. *Protein Expr Purif* 20, 27-36
- De Gandarias, J. M., Irazusta, J., Fernandez, D., Varona, A., Casis, L. (1994) Developmental changes of pyroglutamate-peptidase I activity in several regions of the female and the male rat brain. *Int J Neurosci* 77, 53-60
- De Kimpe, L., van Haastert, E. S., Kaminari, A., Zwart, R., Rutjes, H., Hoozemans, J. J., Scheper, W. (2012). Intracellular accumulation of aggregated pyroglutamate amyloid beta: convergence of aging and A $\beta$  pathology at the lysosome. *Age (Dordr)* 35, 673-687
- El-Amouri, S. S., Zhu, H., Yu, J., Marr, R., Verma, I. M., Kindy, M. S. (2008). Neprilysin: an enzyme candidate to slow the progression of Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol* 172, 1342-1354
- El Moussaoui, A., Nijs, M., Paul, C., Wintjens, R., Vincentelli, J., Azarkan, M., Looze, Y. (2001). Revisiting the enzymes stored in the laticifers of Carica papaya in the context of their possible participation in the plant defence mechanism. *Cell Mol Life Sci* 58, 556-570
- Fischer, W. H. und Spiess, J. (1987). Identification of a mammalian glutaminyl cyclase converting glutaminyl into pyroglutamyl peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 3628-3632
- Fuhrmann, M., Bittner, T., Jung, C. K., Burgold, S., Page, R. M., Mitteregger, G., Haass, C., LaFerla, F. M., Kretschmar, H., Herms, J. (2010). Microglial Cx3cr1 knockout prevents neuron loss in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 13, 411-413
- Garcia-Pardo, A., Pearlstein, E., Frangione, B. (1983). Primary structure of human plasma fibronectin. The 29,000-dalton NH<sub>2</sub>-terminal domain. *J Biol Chem* 258, 12670-12674
- Goren, H. J., Bauce, L. G., Vale, W. (1977). Forces and structural limitations of binding of thyrotrophin-releasing factor to the thyrotrophin-releasing receptor: the pyroglutamic acid moiety. *Mol Pharmacol* 13, 606-614

- Greenblatt, H. M., Almog, O., Maras, B., Spungin-Bialik, A., Barra, D., Blumberg, S., Shoham, G. (1997). Streptomyces griseus aminopeptidase: X-ray crystallographic structure at 1.75 Å resolution. *J Mol Biol* 265, 620-636
- Güntert, A., Dobeli, H., Bohrmann, B. (2006). High sensitivity analysis of amyloid-beta peptide composition in amyloid deposits from human and PS2APP mouse brain. *Neuroscience* 143, 461-475
- Haegele, M. (2012). Physiologische Relevanz der Pyroglutamat-Bildung am N-Terminus von CCL2 und CX3CL1. *Dissertation*
- Hartlage-Rübsamen, M., Morawski, M., Waniek, A., Jager, C., Zeitschel, U., Koch, B., Cynis, H., Schilling, S., Schliebs, R., Demuth, H.-U., Roßner, S. (2011). Glutaminyl cyclase contributes to the formation of focal and diffuse pyroglutamate (pGlu)-Abeta deposits in hippocampus via distinct cellular mechanisms. *Acta Neuropathol* 121, 705-719
- Hellvard, A., Maresz, K., Schilling, S., Graubner, S., Heiser, U., Jonsson, R., Cynis, H., Demuth, H.-U., Potempa, J., Mydel, P. (2013). Glutaminyl cyclases as novel targets for the treatment of septic arthritis. *J Infect Dis* 207, 768-777
- Hemmerich, S., Paavola, C., Bloom, A., Bhakta, S., Freedman, R., Grunberger, D., Krstenansky, J., Lee, S., McCarley, D., Mulkins, M., Wong, B., Pease, J., Mizoue, L., Mirzadegan, T., Polsky, I., Thompson, K., Handel, T. M., Jarnagin, K. (1999). Identification of residues in the monocyte chemotactic protein-1 that contact the MCP-1 receptor, CCR2. *Biochemistry* 38, 13013-13025
- Hollander W. (1976). Role of hypertension in atherosclerosis and cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 38, 786-800
- Huang, K. F., Liu, Y. L., Cheng, W. J., Ko, T. P., Wang, A. H. (2005). Crystal structures of human glutaminyl cyclase, an enzyme responsible for protein N-terminal pyroglutamate formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13117-13122
- Huang, K. F., Wang, Y. R., Chang, E. C., Chou, T. L., Wang, A. H. (2008). A conserved hydrogen-bond network in the catalytic centre of animal glutaminyl cyclases is critical for catalysis. *Biochem J* 411, 181-190
- Huang, W. L., Wang, Y. R., Ko, T. P., Chia, C. Y., Huang, K. F., Wang, A. H. (2010). Crystal structure and functional analysis of the glutaminyl cyclase from *Xanthomonas campestris*. *J Mol Biol* 401, 374-388
- Huang, K. F., Liaw, S. S., Huang, W. L., Chia, C. Y., Lo, Y. C., Chen, Y. L., Wang, A. H. (2011). Structures of human Golgi-resident glutaminyl cyclase and its complexes with inhibitors reveal a large loop movement upon inhibitor binding. *J Biol Chem* 286, 12439-12449
- Husson, S. J., Clynen, E., Baggerman, G., De Loof, A., Schoofs, L. (2005). Discovering neuropeptides in *Caenorhabditis elegans* by two dimensional liquid chromatography and mass spectrometry. *Biochem Biophys Res Commun* 335, 76-86
- Igbavboa, U., Sun, G. Y., Weisman, G. A., He, Y., Wood, G. (2009). Amyloid  $\beta$ -Protein Stimulates Trafficking of Cholesterol and Caveolin-1 from the Plasma Membrane to the Golgi Complex in Mouse Primary Astrocytes. *Neuroscience* 162, 328-338
- International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) and International Union of Biochemistry (IUB) Joint Commission of Biochemical Nomenclature (JCBN) (1984). Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides. *Pure & Appl. Chem* 56, 595-624
- Janelins, M. C., Mastrangelo, M. A., Oddo, S., LaFerla, F. M., Federoff, H. J., Bowers, W. J. (2005). Early correlation of microglial activation with enhanced tumor necrosis factor-alpha and monocyte chemoattractant protein-1 expression specifically within the entorhinal cortex of triple transgenic Alzheimer's disease mice. *J Neuroinflammation* 2, 23-35

- Jawhar, S., Wirths, O., Schilling, S., Graubner, S., Demuth, H.-U., Bayer, T. A. (2010). Overexpression of glutaminyl cyclase, the enzyme responsible for pyroglutamate A $\beta$  formation, induces behavioral deficits, and glutaminyl cyclase knock-out rescues the behavioral phenotype in 5XFAD mice. *J Biol Chem* 286, 4454-4460
- Jiang, Y., Beller, D. I., Frenzl, G., Graves, D. T. (1992). Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J Immunol* 148, 2423-2428
- Kabsch, W. und Sander, C (1983). Dictionary of Protein Secondary Structure: Pattern Recognition of Hydrogen-Bonded and Geometrical Features. *Biopolymers* 22, 2577
- Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K., Muller-Hill, B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325, 733-736
- Koch, B., Kolenko, P., Buchholz, M., Carrillo, D. R., Parthier, C., Wermann, M., Rahfeld, J. U., Reuter, G., Schilling, S., Stubbs, M. T., Demuth, H.-U. (2012a). Crystal Structures of Glutaminyl Cyclases (QCs) from *Drosophila melanogaster* Reveal Active Site Conservation between Insect and Mammalian QCs. *Biochemistry* 51, 7383-7392
- Koch, B., Buchholz, M., Wermann, M., Heiser, U., Schilling, S., Demuth, H.-U. (2012b). Probing Secondary Glutaminyl-Cyclase (QC)-Inhibitor Interactions. *Chem Biol Drug Des* 80, 937-946
- Kol A. und Libby P. (1999). Molecular mediators of arterial inflammation: a role for microbial products? *Am Heart J* 138, 450-452
- Kolenko, P., Koch, B., Rahfeld, J. U., Schilling, S., Demuth, H.-U., Stubbs, M. T. (2013). Structure of glutaminyl cyclase from *Drosophila melanogaster* in space group I4. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 69, 358-361
- Krężel, A., Leśniak, W., Jeżowska-Bojczuk, M., Młynarz, P., Brasuń, J., Kozłowski, H., Bal, W. (2001). Coordination of heavy metals by dithiothreitol, a commonly used thiol group protectant. *J Inorg Biochem* 84, 77-88
- Kuo, Y. M., Emmerling, M. R., Woods, A. S., Cotter, R. J., Roher, A. E. (1997). Isolation, chemical characterization, and quantitation of A beta 3-pyroglutanyl peptide from neuritic plaques and vascular amyloid deposits. *Biochem Biophys Res Commun* 237, 188-191
- Lee, K. J., Joo, K. C., Kim, E. J., Lee, M., Kim, D. H. (1997). A new type of carboxypeptidase A inhibitors designed using an imidazole as a zinc coordinating ligand. *Bioorg Med Chem* 5, 1989-1998
- Leu, Y. J., Chern, S. S., Wang, S. C., Hsiao, Y. Y., Amiraslanov, I., Liaw, Y. C., Liao, Y.D. (2003). Residues involved in the catalysis, base specificity, and cytotoxicity of ribonuclease from *Rana catesbeiana* based upon mutagenesis and X-ray crystallography. *J Biol Chem* 278, 7300-7309
- Linke, R. P., Joswig, R., Murphy, C. L., Wang, S., Zhou, H., Gross, U., Rocken, C., Westermark, P., Weiss, D. T., Solomon, A. (2005). Senile seminal vesicle amyloid is derived from semenogelin I. *J Lab Clin Med* 145, 187-193
- Lowther, W. T. und Matthews, B. W. (2002). Metalloaminopeptidases: common functional themes in disparate structural surroundings. *Chem Rev* 102, 4581-4608
- Maloney, B. und Lahiri, D. K. (2011). The Alzheimer's Amyloid  $\beta$ -Peptide (A $\beta$ ) binds a specific DNA A $\beta$ -interacting Domain (A $\beta$ ID) in the APP, BACE1, and APOE Promoters in a Sequence-specific Manner: Characterizing a new regulatory Motif. *Gene* 488, 1-12
- Mehrad, B., Keane, M. P., Strieter, R. M. (2007). Chemokines as mediators of angiogenesis. *Thromb Haemost* 97, 755-762

- Messer, M. (1963). Enzymatic cyclization of L-glutamine and L-glutaminyll peptides. *Nature* 197, 1299
- Momoi, T., Suzuki, M., Titani, K., Hisanaga, S., Ogawa, H., Saito, A. (1995). Amino acid sequence of a modified beta 2-microglobulin in renal failure patient urine and long-term dialysis patient blood. *Clin Chim Acta* 236, 135-144
- Morawski, M., Schilling, S., Kreuzberger, M., Waniek, A., Jäger, C., Koch, B., Cynis, H., Kehlen, A., Arendt, T., Hartlage-Rübsamen, M., Demuth, H.-U., Roßner, S. (2014). Glutaminyll Cyclase in Human Cortex: Correlation with (pGlu)-Amyloid- $\beta$  Load and Cognitive Decline in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 39, 385-400
- Mori, E., Komori, K., Yamaoka, T., Tanii, M., Kataoka, C., Takeshita, A., Usui, M., Egashira, K., Sugimachi, K. (2002). Essential role of monocyte chemoattractant protein-1 in development of restenotic changes (neointimal hyperplasia and constrictive remodeling) after balloon angioplasty in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation* 105, 2905-2910
- Morty, R. E., Bulau, P., Pelle, R., Wilk, S., Abe, K. (2006). Pyroglutamyl peptidase type I from Trypanosoma brucei: a new virulence factor from African trypanosomes that de-blocks regulatory peptides in the plasma of infected hosts. *Biochem J* 394, 635-645
- Nixon, R. A., Yang, D. S., Lee, J. H. (2008). Neurodegenerative lysosomal disorders: a continuum from development to late age. *Autophagy* 4, 590-599
- Nussbaum, J. M., Schilling, S., Cynis, H., Silva, A., Swanson, E., Wangsanut, T., Tayler, K., Wiltgen, B., Hatami, A., Rönicke, R., Reymann, K., Hutter-Paier, B., Alexandru, A., Jagla, W., Graubner, S., Glabe, C. G., Demuth, H.-U., Bloom, G. S. (2012). Prion-like behaviour and tau-dependent cytotoxicity of pyroglutamylated amyloid- $\beta$ . *Nature* 485, 651-655
- Nutt, E., Gasic, T., Rodkey, J., Gasic, G. J., Jacobs, J. W., Friedman, P. A., Simpson, E. (1988). The amino acid sequence of antistasin. A potent inhibitor of factor Xa reveals a repeated internal structure. *J Biol Chem* 263, 10162-10167
- Önnerfjord, P., Heathfield, T. F., Heinegård, D. (2004). Identification of tyrosine sulfation in extracellular leucine-rich repeat proteins using mass spectrometry. *J Biol Chem* 279, 26-33
- Owen, J. L. und Mohamadzadeh, M. (2013). Macrophages and chemokines as mediators of angiogenesis. *Front Physiol* 4, 159
- Pace, C. N., Shirley, B. A., Thomson, J. A. (1997). Measuring the conformational stability of a protein. *Protein Structure: a Practical Approach* (T.E. Creighton, ed.) IRL Press, Oxford, 311-330
- Pawlak, J., Mackessy, S. P., Sixberry, N. M., Stura, E. A., Le Du, M. H., Ménez, R., Foo, C. S., Ménez, A., Nirthanan, S., Kini, R. M. (2009). Irditoxin, a novel covalently linked heterodimeric three-finger toxin with high taxon-specific neurotoxicity. *FASEB J* 23, 534-545
- Persidsky, Y., Ghorpade, A., Rasmussen, J., Limoges, J., Liu, X. J., Stins, M., Fiala, M., Way, D., Kim, K. S., Witte, M. H., Weinand, M., Carhart, L., Gendelman, H. E. (1999). Microglial and astrocyte chemokines regulate monocyte migration through the blood-brain barrier in human immunodeficiency virus-1 encephalitis. *Am J Pathol* 155, 1599-1611
- Philip, K. A., Dascombe, M. J., Fraser, P. A., Pentreath, V. W. (1994). Blood-brain barrier damage in experimental African trypanosomiasis. *Ann Trop Med Parasitol* 88, 607-616
- Pohl, T., Zimmer, M., Mugele, K., Spiess, J. (1991). Primary structure and functional expression of a glutaminyll cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 10059-10063

- Proost, P., Struyf, S., Couvreur, M., Lenaerts, J. P., Conings, R., Menten, P., Verhaert, P., Wuyts, A., Van Damme, J. (1998). Posttranslational modifications affect the activity of the human monocyte chemotactic proteins MCP-1 and MCP-2: identification of MCP-2(6-76) as a natural chemokine inhibitor. *J Immunol* 160, 4034-4041
- Qiu, W. Q., Ferreira, A., Miller, C., Koo, E. H., Selkoe, D. J. (1995). Cell-surface beta-amyloid precursor protein stimulates neurite outgrowth of hippocampal neurons in an isoform-dependent manner. *J Neurosci* 15, 2157-2167
- Raman, D., Sobolik-Delmaire, T., Richmond, A. (2011). Chemokines in health and disease. *Exp Cell Res* 317, 575-589
- Ramasubbu, N., Paloth, V., Luo, Y., Brayer, G. D., Levine, M. (1996). Structure of human salivary alpha-amylase at 1.6 Å resolution: implications for its role in the oral cavity. *J Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 52, 435-446
- Ramsbeck, D., Buchholz, M., Koch, B., Böhme, L., Hoffmann, T., Demuth, H.-U., Heiser, U. (2013). Structure-Activity Relationships of Benzimidazole-Based Glutaminyl Cyclase Inhibitors Featuring a Heteroaryl Scaffold. *J Med Chem* 56, 6613 – 6625
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J., Bateman, A. (2012). MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res* 40, D343-D350
- Ring, A., Weiser, J. N., Tuomanen, E. I. (1998). Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway. *J Clin Invest* 102, 347-360
- Rock, R. B., Gekker, G., Hu, S., Sheng, W. S., Cheeran, M., Lokensgard, J. R., Peterson, P. K. (2004). Role of microglia in central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev* 17, 942-964
- Ross, R. (1976). Atherosclerosis: the role of endothelial injury, smooth muscle proliferation and platelet factors. *Triangle* 15, 45-51
- Ruiz-Carrillo, D., Koch, B., Parthier, C., Wermann, M., Dambe, T., Buchholz, M., Ludwig, H. H., Heiser, U., Rahfeld, J. U., Stubbs, M. T., Schilling, S., Demuth, H.-U. (2011). Structures of Glycosylated Mammalian Glutaminyl Cyclases Reveal Conformational Variability near the Active Center. *Biochemistry* 50, 6280-6288
- Saido, T. C., Iwatsubo, T., Mann, D. M., Shimada, H., Ihara, Y., Kawashima, S. (1995). Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, A beta N3(pE), in senile plaques. *Neuron* 14, 457-466
- Saul, A., Lashley, T., Revesz, T., Holton, J., Ghiso, J. A., Coomaraswamy, J., Wirths, O. (2013). Abundant pyroglutamate-modified ABri and ADan peptides in extracellular and vascular amyloid deposits in familial British and Danish dementias. *Neurobiol Aging* 34, 1416-1425
- Scharfmann, R., Morgat, J. L., Aratan-Spire, S. (1989). Presence of a particulate thyrotropin-releasing hormone-degrading pyroglutamate aminopeptidase activity in rat liver. *Neuroendocrinology* 49, 442-448
- Scheller, B., Hehrlein, C., Bocksch, W., Rutsch, W., Haghi, D., Dietz, U., Böhm, M., Speck, U. (2006). Treatment of coronary in-stent restenosis with a paclitaxel-coated balloon catheter. *N Engl J Med* 355, 2113-2124
- Schilling, S., Hoffmann, T., Rosche, F., Manhart, S., Wasternack, C., Demuth, H.-U. (2002). Heterologous expression and characterization of human glutaminyl cyclase: evidence for a disulfide bond with importance for catalytic activity. *Biochemistry* 41, 10849-10857
- Schilling, S., Niestroj, A. J., Rahfeld, J. U., Hoffmann, T., Wermann, M., Zunkel, K., Wasternack, C., Demuth, H.-U. (2003a). Identification of Human Glutaminyl Cyclase as a Metalloenzyme: Inhibition by Imidazole Derivatives and Heterocyclic Chelators. *J Biol Chem* 278, 49773-49779

- Schilling, S., Manhart, S., Hoffmann, T., Ludwig, H. H., Wasternack, C., Demuth, H.-U. (2003b). Substrate specificity of glutaminyl cyclases from plants and animals. *Biol Chem* 384, 1583-1592
- Schilling, S., Hoffmann, T., Manhart, S., Hoffmann, M., Demuth, H.-U. (2004). Glutaminyl cyclases unfold glutamyl cyclase activity under mild acid conditions. *FEBS Lett* 563, 191-196
- Schilling, S., Cynis, H., von Bohlen, A., Hoffmann, T., Wermann, M., Heiser, U., Buchholz, M., Zunkel, K., Demuth, H.-U. (2005). Isolation, catalytic properties, and competitive inhibitors of the zinc-dependent murine glutaminyl cyclase. *Biochemistry* 44, 13415-13424
- Schilling, S., Lauber, T., Schaupp, M., Manhart, S., Scheel, E., Bohm, G., Demuth, H.-U. (2006). On the seeding and oligomerization of pGlu-amyloid peptides (in vitro). *Biochemistry* 45, 12393-12399
- Schilling, S., Lindner, C., Koch, B., Wermann, M., Rahfeld, J. U., Bohlen, A. V., Rudolph, T., Reuter, G., Demuth, H.-U. (2007). Isolation and Characterization of Glutaminyl Cyclases from Drosophila: Evidence for Enzyme Forms with Different Subcellular Localization. *Biochemistry* 46, 10921-10930
- Schilling, S., Zeitschel, U., Hoffmann, T., Heiser, U., Francke, M., Kehlen, A., Holzer, M., Hutter-Paier, B., Prokesch, M., Windisch, M., Jagla, W., Schlenzig, D., Lindner, C., Rudolph, T., Reuter, G., Cynis, H., Montag, D., Demuth, H.-U., Roßner, S. (2008a). Glutaminyl cyclase inhibition attenuates pyroglutamate Abeta and Alzheimer's disease-like pathology. *Nat Med* 14, 1106-1111
- Schilling, S., Appl, T., Hoffmann, T., Cynis, H., Schulz, K., Jagla, W., Friedrich, D., Wermann, M., Buchholz, M., Heiser, U., von Horsten, S., Demuth, H.-U. (2008b). Inhibition of glutaminyl cyclase prevents pGlu-Abeta formation after intracortical/hippocampal microinjection in vivo/in situ. *J Neurochem.* 106, 1225-1236
- Schilling, S., Kohlmann, S., Baeuscher, C., Sedlmeier, R., Koch, B., Eichentopf, R., Becker, A., Cynis, H., Hoffmann, T., Berg, S., Freyse, E. J., von Hoersten, S., Roßner, S., Graubner, S., Demuth, H.-U. (2011). Glutaminyl cyclase (QC) knock out mice show mild hypothyroidism but absence of hypogonadism: implications for enzyme function and drug development. *J Biol Chem* 286, 14199-14208
- Schlenzig, D., Manhart, S., Cinar, Y., Kleinschmidt, M., Hause, G., Willbold, D., Funke, S. A., Schilling, S., Demuth, H.-U. (2009). Pyroglutamate formation influences solubility and amyloidogenicity of amyloid peptides. *Biochemistry* 48, 7072-7078
- Schlenzig, D., Rönicke, R., Cynis, H., Ludwig, H. H., Scheel, E., Reymann, K., Saido, T., Hause, G., Schilling, S., Demuth, H.-U. (2012). N-Terminal pyroglutamate formation of Aβ38 and Aβ40 enforces oligomer formation and potency to disrupt hippocampal long-term potentiation. *J Neurochem* 121, 774-784
- Schmid, F. X. (1997). Spectral methods of characterizing protein conformation and conformational changes. *Protein Structure: a Practical Approach* (T.E. Creighton, ed.) IRL Press, Oxford, 261-297
- Schomburg, L., Turwitt, S., Prescher, G., Lohmann, D., Horsthemke, B., Bauer, K. (1999). Human TRH-degrading ectoenzyme cDNA cloning, functional expression, genomic structure and chromosomal assignment. *Eur J Biochem* 265, 415-422
- Schubert, D., Jin, L. W., Saitoh, T., Cole, G. (1989). The regulation of amyloid beta protein precursor secretion and its modulatory role in cell adhesion. *Neuron* 3, 689-694
- Sealfon, S. C., Weinstein, H., Millar, R. P. (1997). Molecular mechanisms of ligand interaction with the gonadotropin-releasing hormone receptor. *Endocr Rev* 18, 180-205
- Seifert, F., Schulz, K., Koch, B., Manhart, S., Demuth, H.-U., Schilling, S. (2009). Glutaminyl cyclases display significant catalytic proficiency for glutamyl substrates. *Biochemistry* 48, 11831-11833
- Selkoe, D. J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81, 741-766

- Simpson, R. J., Moritz, R. L., Rubira, M. R., Gorman, J. J., Van Snick, J. (1989). Complete amino acid sequence of a new murine T-cell growth factor P40. *Eur J Biochem* 183, 715-722
- Soscia, S. J., Kirby, J. E., Washicosky, K. J., Tucker, S. M., Ingelsson, M., Hyman, B., Burton, M. A., Goldstein, L. E., Duong, S., Tanzi, R. E., Moir, R. D. (2010). The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide. *PLoS One* 5, e9505
- Stemme, S., Faber, B., Holm, J., Wiklund, O., Witztum, J. L., Hansson, G. K. (1995). T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 3893-3897
- Stephan, A., Wermann, M., von Bohlen, A., Koch, B., Cynis, H., Demuth, H.-U., Schilling, S. (2009). Mammalian glutaminyl cyclases and their isoenzymes have identical enzymatic characteristics. *FEBS J* 276, 6522-6536
- Streit, W. J., Mrak, R. E., Griffin, W. S. (2004). Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *J Neuroinflammation* 1, 14-18
- Szczepanik, A. M., Funes, S., Petko, W., Ringheim, G. E. (2001). IL-4, IL-10 and IL-13 modulate A beta(1-42)-induced cytokine and chemokine production in primary murine microglia and a human monocyte cell line. *J Neuroimmunol* 113, 49-62
- Tabaton, M., Zhu, X., Perry, G., Smith, M. A., Giliberto, L. (2010). Signaling Effect of Amyloid-β42 on the Processing of AβPP. *Exp Neurol* 221, 18-25
- Takai, T., Takaya, T., Nakano, M., Akutsu, H., Nakagawa, A., Aimoto, S., Nagai, K., Ikegami, T.J. (2006). Orexin-A is composed of a highly conserved C-terminal and a specific, hydrophilic N-terminal region, revealing the structural basis of specific recognition by the orexin-1 receptor. *Pept Sci* 12, 443-454
- Tan, L. und Rousseau, P. (1982). The chemical identity of the immunoreactive LHRH-like peptide biosynthesized in the human placenta. *Biochem Biophys Res Commun* 109, 1061-1071
- Tucker, H. M., Kihiko, M., Caldwell, J. N., Wright, S., Kawarabayashi, T., Price, D., Walker, D., Scheff, S., McGillis, J. P., Rydel, R. E., Estus, S. (2000). The plasmin system is induced by and degrades amyloid-beta aggregates. *J. Neurosci* 20, 3937-3946
- Uguccioni, M., Loetscher, P., Forssmann, U., Dewald, B., Li, H., Lima, S. H., Li, Y., Kreider, B., Garotta, G., Thelen, M., Baggiolini, M. J. (1996). Monocyte chemoattractant protein 4 (MCP-4), a novel structural and functional analogue of MCP-3 and eotaxin. *Exp Med* 183, 2379-2384
- Walsh, C. T., Garneau-Tsodikova, S., Gatto, G. J. Jr. (2005). Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew Chem Int Ed Engl* 44, 7342-7372
- Weber, F., Lues, I., Meyer, A., Hoffmann, T., Pokorny, R., Lopez, L., Demuth, H.-U., Glund, K. (2013). A Phase 1 Study Assessing Safety, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of PQ912, the First Glutaminyl Cyclase (QC) Inhibitor to Treat AD. AD/PD 2013
- Wirhth, O., Breyhan, H., Cynis, H., Schilling, S., Demuth, H.-U., Bayer, T. A. (2009). Intraneuronal pyroglutamate-Aβ 3-42 triggers neurodegeneration and lethal neurological deficits in a transgenic mouse model. *Acta Neuropathol* 118, 487-496
- Wu, G., Miller, R. A., Connolly, B., Marcus, J., Renger, J., Savage, M. J. (2013). Pyroglutamate-Modified Amyloid-β Protein Demonstrates Similar Properties in an Alzheimer's Disease Familial Mutant Knock-In Mouse and Alzheimer's Disease Brain. *Neurodegener Dis* (epub)

- Yan, P., Hu, X., Song, H., Yin, K., Bateman, R. J., Cirrito, J. R., Xiao, Q., Hsu, F. F., Turk, J. W., Xu, J., Hsu, C. Y., Holtzman, D. M., Lee, J. M. (2006). Matrix metalloproteinase-9 degrades amyloid-beta fibrils in vitro and compact plaques in situ. *J Biol Chem* 281, 24566-24574
- Yao, Z. X. und Papadopoulos, V. (2002). Function of beta-amyloid in cholesterol transport: a lead to neurotoxicity. *FASEB J* 16, 1677-1679
- Yoshimura, T. und Leonard, E. J. (1991). Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Adv Exp Med Biol* 305, 47-56
- Zhang, Y. J., Rutledge, B. J., Rollins, B. J. (1994). Structure/activity analysis of human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) by mutagenesis. Identification of a mutated protein that inhibits MCP-1-mediated monocyte chemotaxis. *J Biol Chem* 269, 15918-15924
- Zhang, Z. und Henzel, W.J. (2004). Signal peptide prediction based on analysis of experimentally verified cleavage sites. *Protein Sci* 13, 2819-2824
- Zhou, H. M. und Strydom, D. J. (1993). The amino acid sequence of human ribonuclease 4, a highly conserved ribonuclease that cleaves specifically on the 3' side of uridine. *Eur J Biochem* 217, 401-410
- Zou, K., Gong, J. S., Yanagisawa, K., Michikawa, M. (2002). A novel function of monomeric amyloid beta-protein serving as an antioxidant molecule against metal-induced oxidative damage. *J Neurosci* 22, 4833-4841

## Wissenschaftliche Publikationen

### Erstautorenschaft

**Koch, B.**, Buchholz, M., Wermann, M., Heiser, U., Schilling, S., Demuth, H.-U. (2012). Probing Secondary Glutaminyl-Cyclase (QC)-Inhibitor Interactions. *Chem Biol Drug Des* 80, 937-946

Eigenanteil: 40%

Klonierung/Mutagenese, rekombinante Expression, Reinigung sowie enzymkinetische/strukturbio­logische Untersuchungen der hQC-Varianten

**Koch, B.**, Kolenko, P., Buchholz, M., Carrillo, D. R., Parthier, C., Wermann, M., Rahfeld, J. U., Reuter, G., Schilling, S., Stubbs, M. T., Demuth, H.-U. (2012). Crystal Structures of Glutaminyl Cyclases (QCs) from *Drosophila melanogaster* Reveal Active Site Conservation between Insect and Mammalian QCs. *Biochemistry* 51, 7383-7392

Eigenanteil: 35%

Klonierung/Mutagenese, rekombinante Expression, Reinigung, enzymkinetische/strukturbio­logische Untersuchungen bzw. Kristallisation der Glutaminylzyklen aus *D. melanogaster* und deren Varianten

Ruiz-Carrillo, D., **Koch, B.**, Parthier, C., Wermann, M., Dambe, T., Buchholz, M., Ludwig, H. H., Heiser, U., Rahfeld, J. U., Stubbs, M. T., Schilling, S., Demuth, H.-U. (2011). Structures of Glycosylated Mammalian Glutaminyl Cyclases Reveal Conformational Variability near the Active Center. *Biochemistry* 50, 6280-6288

Eigenanteil: 30%

Klonierung/Mutagenese, rekombinante Expression, Reinigung, enzymkinetische/strukturbio­logische Untersuchungen verschiedener hQC-Varianten bzw. Kristallisation der hQC/Wildtyp

Birgit Koch  
(Erstautor)

Dr. Stephan Schilling  
(Koautor)

## Koautorenschaft

Höfling, C., Indrischek, H., Höpcke, T., Waniek, A., Holger Cynis, H., **Koch, B.**, Schilling, S., Morawski, M., Demuth, H.-U., Roßner, S., Hartlage-Rübsamen, M. (2014). Mouse strain and brain region-specific expression of the glutaminyl cyclases QC and isoQC. *Int J Dev Neurosci* (eingereicht)

Eigenanteil: 5%

RP-HPLC-Analyse der QC-Aktivität in verschiedenen Hirnregionen unterschiedlicher Mausstämme

Cynis, H., Funkelstein, L., Toneff, T., Mosier, C. Ziegler, M., **Koch, B.**, Demuth, H.-U., Hook, V. (2014). PyroGlu-A $\beta$  and Glutaminyl Cyclase are Co-Localized with A $\beta$  in Secretory Vesicles and Undergo Activity-Dependent Secretion. *Neurodegener Dis* (eingereicht)

Eigenanteil: 5%

RP-HPLC-Analyse der QC-Aktivität im Kulturmedium boviner chromaffiner Zellen nach stimulierter QC-Sekretion

Becker, A., Sedlmeier, R., Cynis, H., **Koch, B.**, Stephan, A. Eichentopf, R., Bäuscher, C., Kohlmann, S., Hoffmann, T., Kehlen, A., Berg, S., Freyse, E.-J., Osmand, A., von Hörsten, S., Graubner, S., Demuth, H.-U., Schilling, S. (2014). IsoQC (QPCTL) knockout Mice Suggest Differential Substrate Conversion by Glutaminyl Cyclase Isoenzymes. *J Biol Chem* (eingereicht)

Eigenanteil: 5%

RP-HPLC-Analyse der QC-Aktivität in peripherem Gewebe, verschiedenen Gehirnregionen und primären neuronalen Zellen/Kulturmedium von isoQC<sup>+/+</sup>, isoQC<sup>-/-</sup> Mäusen

Morawski, M., Schilling, S., Kreuzberger, M., Waniek, A., Jäger, C., **Koch, B.**, Cynis, H., Kehlen, A., Arendt, T., Hartlage-Rübsamen, M., Demuth, H.-U., Roßner, S. (2014). Glutaminyl Cyclase in Human Cortex: Correlation with (pGlu)-Amyloid- $\beta$  Load and Cognitive Decline in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 39, 385 – 400

Eigenanteil: 5%

RP-HPLC-Analyse der QC-Aktivität in humanem Gehirngewebe (Lysate temporalen Cortex) von AK- und Kontrollgruppe

- Ramsbeck, D., Buchholz, M., **Koch, B.**, Böhme, L., Hoffmann, T., Demuth, H.-U., Heiser, U. (2013). Structure-Activity Relationships of Benzimidazole-Based Glutaminyl Cyclase Inhibitors Featuring a Heteroaryl Scaffold. *J Med Chem* 56, 6613 – 6625  
Eigenanteil: 10%  
Klonierung/Mutagenese, heterologe Expression, Reinigung sowie enzymkinetische/strukturbiologische Untersuchungen der hQC-Varianten
- Kolenko, P., **Koch, B.**, Rahfeld, J. U., Schilling, S., Demuth, H.-U., Stubbs, M. T. (2013). Crystal structure of the glutaminyl cyclase from *Drosophila melanogaster* in space group *I4*, *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 69, 358 – 361  
Eigenanteil: 25%  
Klonierung, heterologe Expression, Reinigung sowie Kristallisation des Proteins
- Wittnam, J. L., Portelius, E., Zetterberg, H., Gustavsson, M. K., Schilling, S., **Koch, B.**, Demuth, H.-U., Blennow, K., Wirths, O., Bayer, T. A. (2012). Pyroglutamate Abeta Aggravates Behavioral Deficits in 5XFAD Mice. *J. Biol. Chem* 287, 8154 – 1862  
Eigenanteil: 5%  
RP-HPLC-Analyse der QC-Aktivität in Gehirnllysaten von WT, TBA42, 5xFAD und FAD42 Mäusen (Supplement)
- Hartlage-Rübsamen, M., Morawski, M., Waniek, A., Jager, C., Zeitschel, U., **Koch, B.**, Cynis, H., Schilling, S., Schliebs, R., Demuth, H.-U.; Roßner, S. (2011). Glutaminyl cyclase contributes to the formation of focal and diffuse pyroglutamate (pGlu)-Abeta deposits in hippocampus *via* distinct cellular mechanisms. *Acta Neuropathol* 121, 705 – 719  
Eigenanteil: 5%  
RP-HPLC-Analyse der QC-Aktivität in murinen neuronalen Zellen (QC<sup>+/+</sup>, QC<sup>-/-</sup>GT1-7) und Kulturmedium
- Schilling, S., Kohlmann, S., Bauscher, C., Sedlmeier, R., **Koch, B.**, Eichertopf, R., Becker, A., Cynis, H., Hoffmann, T., Berg, S., Freyse, E. J., von Hörsten, S.; Roßner, S., Graubner, S., Demuth, H.-U. (2011). Glutaminyl Cyclase Knock-out Mice Exhibit Slight Hypothyroidism but No Hypogonadism: Implications for enzyme function and drug development. *J. Biol. Chem* 286, 14199 - 14208  
Eigenanteil: 5%  
RP-HPLC-Analyse der QC-Aktivität in peripherem Gewebe, verschiedenen Gehirnregionen und primären neuronalen Zellen/Kulturmedium von QC<sup>+/+</sup>, QC<sup>-/-</sup> Mäusen

Stephan, A., Wermann, M., von Bohlen, A., **Koch, B.**, Cynis, H., Demuth H.-U., Schilling, S. (2009). Mammalian glutaminyl cyclases and their isoenzymes have identical enzymatic characteristics. *FEBS J* 276, 6522 – 6536

Eigenanteil: 5%

Heterologe Expression von isohQC in *E. coli*, Reinigung und biochemische Charakterisierung

Seifert, F., Schulz, K., **Koch, B.**, Manhart, S., Demuth, H.-U., Schilling, S. (2009). Glutaminyl cyclases display significant catalytic proficiency for glutamyl substrates. *Biochemistry* 48, 11831 – 11833

Eigenanteil: 5%

RP-HPLC-Analyse der pH-abhängigen Spontanzyklisierung der untersuchten Glutamyl-/Glutaminylpeptide

Cynis, H., Rahfeld, J. U., Stephan, A., Kehlen, A., **Koch, B.**, Wermann, M., Demuth, H.-U., Schilling, S. (2008). Isolation of an isoenzyme of human glutaminyl cyclase: Retention in the Golgi complex suggests involvement in the protein maturation machinery. *J.Mol.Biol* 379, 966 – 980

Eigenanteil: 5%

Heterologe Expression der isohQC in *E. coli*, Reinigung und biochemische Charakterisierung

Schilling, S., Schäfer, C., **Koch, B.**, Wermann, M., Rahfeld, J. U., von Bohlen, A., Rudolph, T., Reuter, G., Demuth, H.-U. (2007). Isolation and Characterization of Glutaminyl Cyclases from Drosophila; Evidence for Enzyme Forms with different subcellular Localization. *Biochemistry* 46, 10921 - 10930

Eigenanteil: 15%

Klonierung, heterologe Expression, Reinigung sowie enzymkinetische Untersuchung der QCs aus *D. melanogaster*

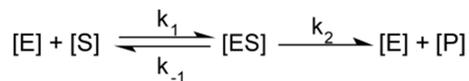
## Anhang

### Enzymkinetische Grundlagen – Michaelis-Menten-Theorie

Mathematisches Modell zur Beschreibung der Kinetik enzymatisch katalysierter Reaktionen

Allgemeiner Mechanismus:

- 1) Freies Enzym der Konzentration [E] bindet reversibel das Substrat der Konzentration [S] und bildet einen Enzym-Substrat-Komplex der Konzentration [ES]. Die kennzeichnenden Geschwindigkeitskonstanten sind  $k_1$  für die Assoziation und  $k_{-1}$  für die Dissoziation des Komplexes.  $k_1$  und  $k_{-1}$  charakterisieren die Substratbindung.
- 2) Das im [ES] gebundene Substrat wird irreversibel umgewandelt. Der [ES] zerfällt irreversibel in freies Enzym [E] und Produkt der Konzentration [P]. Die beschreibende Geschwindigkeitskonstante ist  $k_2$ . Sie charakterisiert den katalytischen Schritt der Substratumsetzung.



Michaelis-Menten-Konstante  $K_M$ :

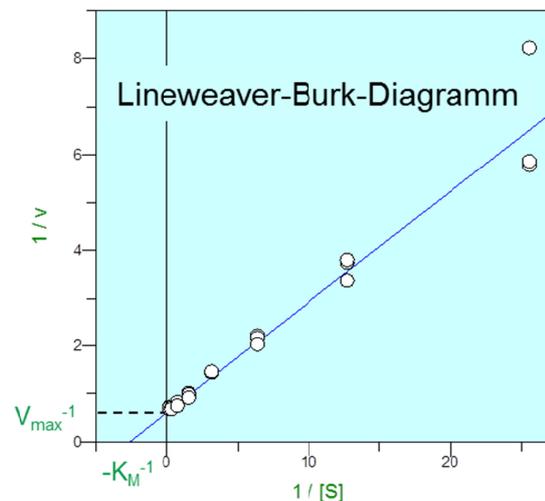
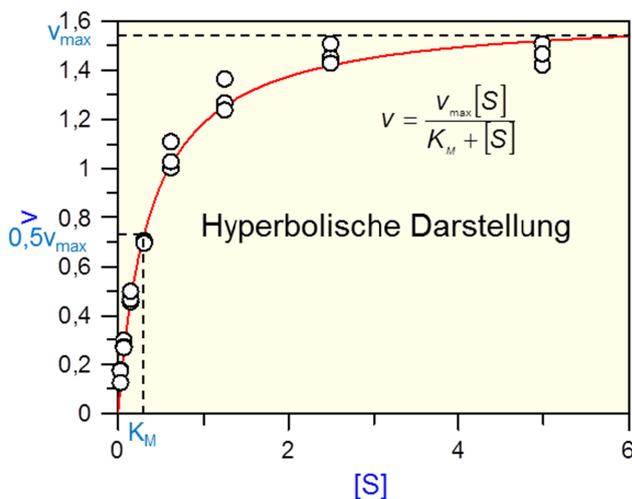
Substratkonzentration bei halbmaximaler Umsatzgeschwindigkeit  $v_{max}$

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \hat{=} [S]_{(v=0,5v_{max})}$$

Wechselzahl  $k_{cat}$ :

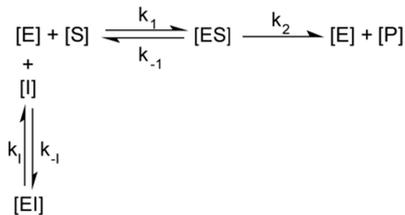
Geschwindigkeitskonstante des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts der Reaktion

$$k_{cat} = \frac{v_{max}}{[E_0]} \quad [E_0] \dots \text{Ausgangskonzentration des Enzyms } [E_0] = [E] + [ES]$$



## Enzymkinetische Grundlagen – Kompetitive Hemmung

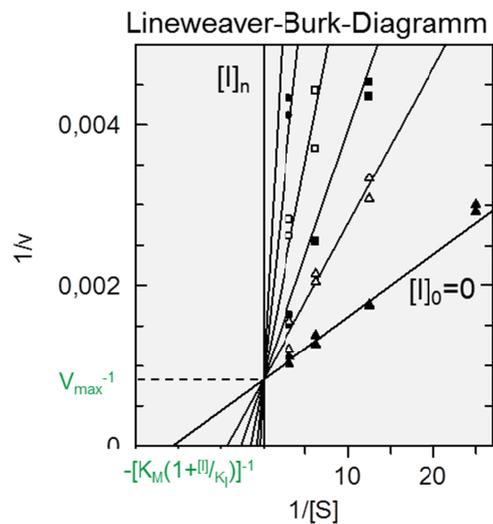
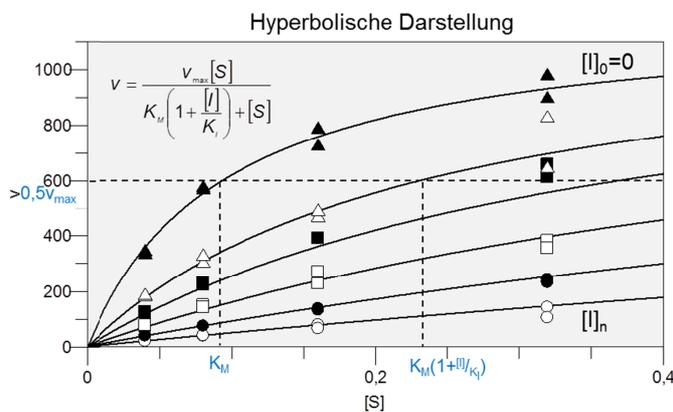
Kompetitive Inhibitoren [I] konkurrieren mit dem Substrat um eine reversible Interaktion mit dem Enzym und werden durch das Enzym in ihrer Struktur nicht verändert. Inhibitor- [EI] und Substratbindung [ES] schließen sich wechselseitig aus. Assoziation und Dissoziation des Enzym-Inhibitor-Komplexes werden durch die Geschwindigkeitskonstanten  $k_I$  bzw.  $k_{-I}$  wiedergegeben. Eine kompetitive Hemmung drückt sich durch eine Erhöhung des gemessenen  $K_M$ -Wertes bei unveränderter  $v_{max}$  aus.



Inhibitorkonstante  $K_i$ :

Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes

$$K_i = \frac{k_{-I}}{k_I} = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad K_{M \text{ beobachtet}} = K_M \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$



**Tabelle A1** Pflanzliche Proteine mit N-terminaler pE-Modifikation. Aufgeführt sind Proteine, welche bei der pflanzlichen Pathogenabwehr eine Rolle spielen und während der Sekretion in den oder im Apoplasten eine N-terminale pE-Modifikation erfahren. Unterhalb der Bezeichnung ist die Nummer des jeweiligen UniProt-Datenbankeintrages (<http://www.uniprot.org>) aufgeführt.

Peptid/Protein	Sequenz	Funktion
<i>Arabidopsis thaliana</i>		
Peroxidase 34 Q9SMU8	pELTPTFYDRS-353	Oxidation von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , reaktiven Sauerstoffspezies, Biosynthese und Abbau von Lignin, Suberisation, Auxinkatabolismus, Verstärkte Expression durch umweltbedingten Stress wie Verletzung, oxidativen Stress oder Pathogenbefall
Pathogenese-assoziiertes Protein 1 P33154	pEDSPQDYLRV-161	Beteiligung an der erworbenen Pathogenresistenz Verstärkte Expression bei Pathogenbefall
<i>Nicotiana tabacum</i>		
β-1,3-Endoglukanase P36401	pEAGVCYGRQG-396	Beteiligung an der Pathogenabwehr Verstärkte Expression bei Pathogenbefall

**Tabelle A2** Beispiele im Tierreich vorkommender pE-modifizierter Peptide/Proteine und ihre Funktion. Konnte in derselben Art eine QC nachgewiesen werden, wurde deren Sequenzidentität zur humanen sekretierten QC bestimmt. In Klammern sind die jeweiligen UniProt-Datenbankeinträge (<http://www.uniprot.org>) angegeben. Da für die Modifikation des Peptids/Proteins durch QC-Aktivität nur der N-Terminus von Bedeutung ist, wurde lediglich ein kurzer N-terminaler Abschnitt der Aminosäuresequenz aufgeführt. Die Ziffer rechts dieser Sequenz gibt die Gesamtlänge der Aminosäuresequenz an.

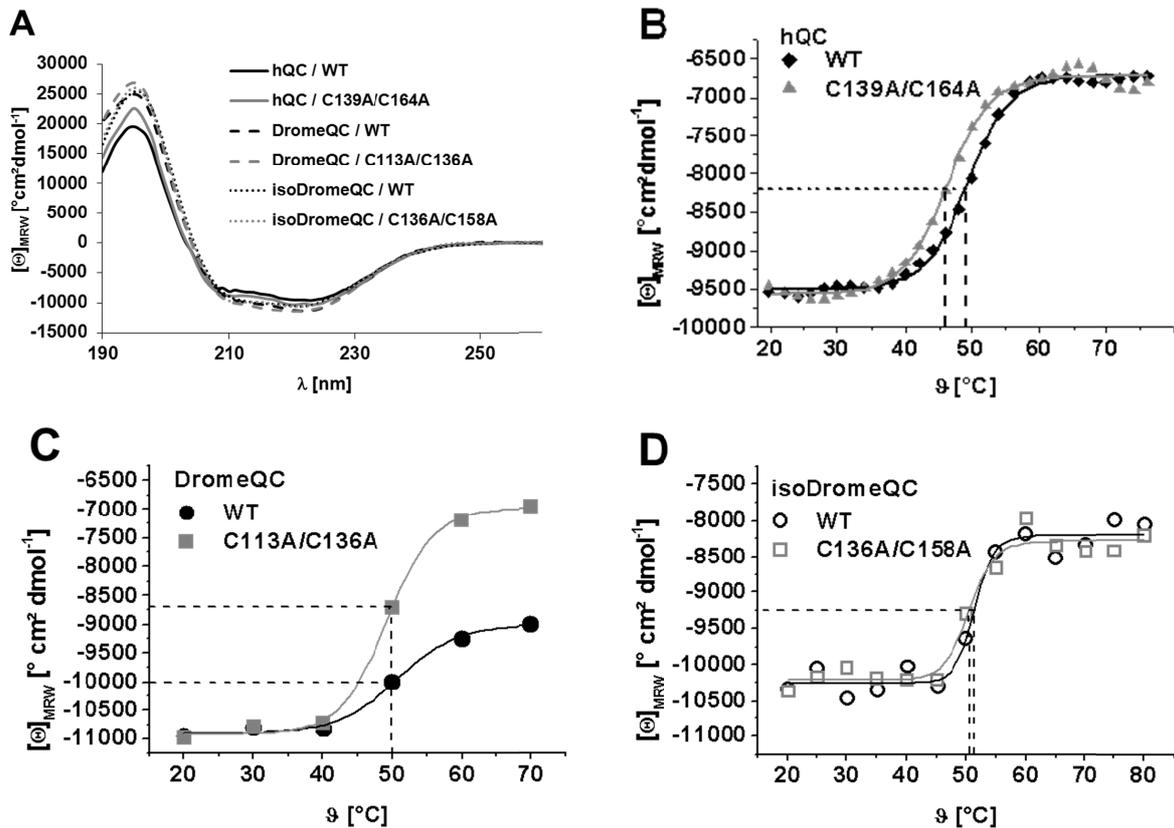
Stamm	Art	Sequenzidentität der jeweiligen QC zur hQC	pE-Peptid/Protein	Funktion des Peptids/Proteins
Chordata (Chordatiere)				
Mammalia (Säugetiere)	<i>Mus musculus</i> (Hausmaus)	82% (Q9CYK2)	Interleukin-9 (P15247) pERCSTTWGIR-144 (Simpson et al., 1989)	Wachstumsfaktor für T-Helferzellen
Reptilia (Kriechtiere)	<i>Boiga irregularis</i> (Braune Nachtbaumnatter)	69% (A7ISW1)	Irditoxin Untereinheit A (A0S864) pEAVGPPYTLC-109 (Pawlak et al., 2009)	Vogel- und Reptilien-spezifisches Neurotoxin
Amphibia (Lurche)	<i>Rana catesbeiana</i> (Afrikanischer Ochsenfrosch)	63% (A1XA57 – potentielle QC)	RNAse (P11916) pEQNWATFQQK-133 (Leu et al., 2003) (PDB-Eintrag 1M07)	Hydrolyse einzelsträngiger RNA
Actinopterygii (Strahlenflosser)	<i>Danio rerio</i> (Zebrafisch)	62% (Q1LWV0 – potentielle QC)	Thyreoliberin (Q5EDF9) pEHP-NH <sub>2</sub>	Neurotransmitter/-modulator des zentralen und peripheren Nervensystems; Regulator der Thyreotropin-Synthese in der Hypophyse
Aves (Vögel)	<i>Gallus gallus</i> (Bankivahuhn)	67% (F1NUW6)	Kollagen $\alpha$ -1(I) (P02457) pEMSYGYDEKS-1205	Fibrillen formendes Kollagen

Stamm	Art	Sequenzidentität der jeweiligen QC zur hQC	pE-Peptid/Protein	Funktion des Peptids/Proteins
Arthropoda (Gliederfüßler) Crustacea (Krebstiere)	<i>Homarus americanus</i> (Amerikanischer Hummer)		Hyperglykämisches Hormon A (P19806) pEVFDQACKGV-132 (Chang et al., 1990)	Kontrolle des Blutzuckerspiegels; Regulation der Amylasefreisetzung; Stresshormon; Inhibitor des Häutungsprozesses
Arachnida (Spinnentiere)	<i>Mesobuthus martensii</i> (Mandschurischer Skorpion)		Kaliumkanal Toxin $\alpha$ -KTx 1.5 (Q9NII6) pEFTDVKCTGS-57 (Blanc et al., 1998) (PDB-Eintrag 1BIG)	Blockade von Kaliumkanälen (Kalzium- und Spannungs-reguliert)
Insecta (Insekten)	<i>Drosophila melanogaster</i> (Schwarzbäuchige Taufliege)	35% (CG32412)	Corazonin (Q26377) pETFQYSRGWTN (Baggerman et al., 2002)	Kardioaktives Peptid, involviert in die physiologische Regulation des Herzschlags
Mollusca (Weichtiere)	<i>Conus striatus</i> (Gestreifte Kegelschnecke)		$\kappa$ -Konotoxin SIVA (P0C828) pEKSILVPSVI-68 (Craig et al., 1998)	Blockade Spannungs-regulierter Kaliumkanäle
Nematoda (Fadenwürmer)	<i>Caenorhabditis elegans</i>		(Q19165) pEQDSEVEREMM (Husson et al., 2005)	Neuropeptid
Annelida (Ringelwürmer)	<i>Haementeria officinalis</i> (Mexikanischer Blutegel)		Antistatin (P15358) pEGPFGPGCEE-136 (Nutt et al., 1988)	Inhibitor des Faktors Xa
Cnidaria (Nesseltiere)	<i>Hydra vulgaris</i> (Gemeiner Süßwasserpolyp)		HydrAMYCIN-1 (B3RFR8) pEIVDCWETWS-84 (Bosch et al., 2009)	Kationisches antimikrobielles Peptid

Fortsetzung von **Tabelle A2**

hQC	-MAGGR-----HRRVVGTLHLLLLVAALPWASRG-----VSPSAS	34
isohQC	MRSGRGRPRRLRGLGERGLMEPLLPKRRLLPRVRLPLLLALAVGSAFYTIWSCWHRRT	60
mQC	-MAGSE-----DKRVVGTLHLLLLQATVLSLTAGN-----LSLVSA	35
DromeQC	-----MAIGSVVFAAAGLLLLLP-----P	20
isoDromeQC	-----MRLLLRNYSLMEAVKRLLPKPRK-----IYNLGA	30
ApS	-----APDIPLANVKAHLTQLS-----	17
	: : .	
hQC	AWPEEKNYHQPAI--LNSSALRQIAEGTISEMWQNDLQPLLIERYPGSPGSYAARQHIM	92
isohQC	ELPLGRRELVRPLIGSLPEARLRVVGQLDPQRLWSTYLRPLLVVRTPGSPGNLQVRKFLE	120
mQC	AWTQEKNNHQPAH--LNSSLQVVAEGTISEMWQNDLRPLLIERYPGSPGSYSARQHIM	93
DromeQC	SHQQATAGNIG--SQWRD-----DEVHFNRTLDSILVPRVVGSRGHQVREYL	67
isoDromeQC	CFELVDIPKISYNPSELSEPRFLEYSNLSDKLHLREAIKILIPRVVGTNHSIVREYIV	90
ApS	-----TIAANNGGNRAHGRPGYKASVDYVK	42
	* * . . . :	
hQC	QRIQRLQADWVLEIDTFLSQTP-YGYRSFSNIISTLNPTAKRHLVLA <u>CHYDSKY</u> FSHWN	151
isohQC	ATLRSLTAGWHVELDPFTASTP-LGPVDFGNVATLDPRAARHLTLA <u>CHYDSKLF</u> PPG-S	178
mQC	QRIQRLQAEWVVEVDTFLSRTP-YGYRSFSNIISTLNPEAKRHLVLA <u>CHYDSKY</u> FPRWDS	152
DromeQC	QSLN--GLGFQTEVDFEKQRPVVFGEFTANVVGTTNPQAQNFLLA <u>CHYDSKY</u> FPND--	123
isoDromeQC	QSLR--DLWDVEVNSFDHAPIKGKLHFHNIATLNPNAERYLVLS <u>CHYDSKY</u> MPG---	145
ApS	AKLD--AAGYTTTLQQFTSGGA----TGYNLIANWPGGDPNKVLMAGAH <u>LDS</u> -----	89
	: : * . : : . . * . * **	
hQC	RVFVGATDSAVPCAMMLELARALDKKLLSLKTVSDSKPDLSQLIFFDGE <u>EAF</u> LHWSPQD	211
isohQC	TPFVGATDSAVPCALLLELAQALDLELSRAKKAAP---VTLQLFLDGE <u>EALK</u> EWGPKD	235
mQC	RVFVGATDSAVPCAMMLELARALDKKLLHSLKDVSGSKPDLSQLIFFDGE <u>EAF</u> HHWSPQD	212
DromeQC	PGFVGATDSAVPCAILLNTAKTLGAYLQKEFRNRSD---VGLMLIFFDGE <u>EAF</u> KEWTDAD	180
isoDromeQC	VEFLGATDSAVPCAMLLNLAQVLQEQLKPLK--KSK---LSLMLIFFDGE <u>EAF</u> EWGPKD	200
ApS	SSGAGINDNGSGSAAVLETALAVSRAGYQPKD-----HLRF <del>AW</del> GA <u>E</u> -----	132
	* . * . . * : * : * . :	
hQC	S-LYGSRHAAKMASTP-HPPGARGTSQLHGMDDLVLVLDLIGAPNPTFPNFFPNSARWFE	269
isohQC	S-LYGSRHLAQLMESIP-HSPGP---TRIQAIELFMLLDLIGAPNPTFYSHFRTRVRFH	290
mQC	S-LYGSRHAAKMASSP-HPPGSRGTNQLDGMDDLVLVLDLIGANPTFPNFFPKTRWFN	270
DromeQC	S-VYGSKHLAAKLASKRSGSQAQLAPRNIDRIEVLVLDLIGARNPKFSSFYENTDGLHS	239
isoDromeQC	S-IYGARHLAKKWHHEG-----KLDRIDMLVLDLIGAPDPAFYSSFFENTESWYM	249
ApS	LGLIGSKFYVNNLPSAD-----RSKLAGLYNFDMIGSPNPGYF-VYDDDPVIEK	180
	: * : . : : * : : * : * : * : :	
hQC	RLQAIHEHLELGLLKDHS-----LEGRYFQNYSY-GGVIQDD-HIPFLRRGVPVLHL	320
isohQC	RLRSIEKRLHRLNLLQSHP-----QEVMYFQGPGEF-SGSVEDD-HIPFLRRGVPVLHL	341
mQC	RLQAIKELEYELGLLKDHS-----LERKYFQNFY-GNIIQDD-HIPFLRKGVPVLHL	321
DromeQC	SLVQIEKSLRTAGQLE-----GNNMFLSRVS-GGLVDDD-HRPFLDENVPVLHL	287
isoDromeQC	RIQSVETRLAKLQLLERYASSGVAQRDPTRYFQSQA <u>MRS</u> SFIEDD-HIPFLRRNVPILHL	308
ApS	TFKNYFAGLNVPTETETEGD---GRSDHAPFKNVGVPVGLFTGAGYTKSAAQAQKWGGT	237
	: * : * : : . . . . :	
hQC	<u>IPSP</u> FEVWHTMDDNEENLDESTIDNLNKILQVFLVEYLHL-----	361
isohQC	<u>I</u> STPFPVWHTPADTEVNLHPPTVHNLCRILAVFLAEYGL-----	382
mQC	<u>I</u> ASPFEVWHTMDDNEENLHASTIDNLNKIIQVFLVEYLHL-----	362
DromeQC	<u>V</u> ATPFPDVWHTPRDNAANLHWPSIRNFRVFRNFVYQYLRKRTSPVNLRFYRT	340
isoDromeQC	<u>I</u> PVFPFSVWHTPPDNASVIDYATTDNLALIIIRLFALEYLLAGTEAK-----	354
ApS	AGQAFDR <u>CYH</u> SSCDSLSNINDTALDRNSDAAAHAIWTLSSSGTGEPPT-----	284
	. * : * : * . : . . :	

**Abbildung A1** Vergleich der Primärstrukturen von humaner QC (hQC, UniProt-Eintrag Q16769), deren Isoenzym (isohQC, UniProt-Eintrag Q9NXS2), muriner QC (mQC, UniProt-Eintrag Q9CYK2), den QCs der *D. melanogaster* (DromeQC, UniProt-Eintrag Q9VRQ9; isoDromeQC, UniProt-Eintrag Q86PD7) sowie der Aminopeptidase S aus *S. griseus* (ApS, UniProt-Eintrag P80561). Die Sekretionssignalsequenz ist *rot/kursiv*, die Translokalisationssequenz für das Mitochondrium *grün/kursiv* und der Transmembrananker *blau* (Zytosol) bzw. *blau/kursiv* (Transmembranhelix) dargestellt. Das Zink-bindende Motiv der bakteriellen Aminopeptidasen ist *grün/fett* hervorgehoben. Die Zink-bindenden Aminosäuren der QCs sind zusätzlich *unterstrichen*. Cysteine sind *rot/fett* gekennzeichnet. N-Glykosylierungsstellen sind *blau/fett/unterstrichen* markiert. Die in den Mutationsstudien betrachteten Aminosäuren sind in allen QC-Sequenzen *fett* hervorgehoben und für die Enzyme, von denen Varianten generiert wurden, *grau unterlegt*. Wurde in der hQC ein ganzer Sequenzabschnitt variiert, ist dieser ebenfalls *grau unterlegt*. Aminosäuren dieses Bereichs, die separat untersucht wurden, sind durch einen *dunkleren Hintergrund* markiert. Symbole: \* gleiche Aminosäuren; ., . ähnliche Aminosäuren



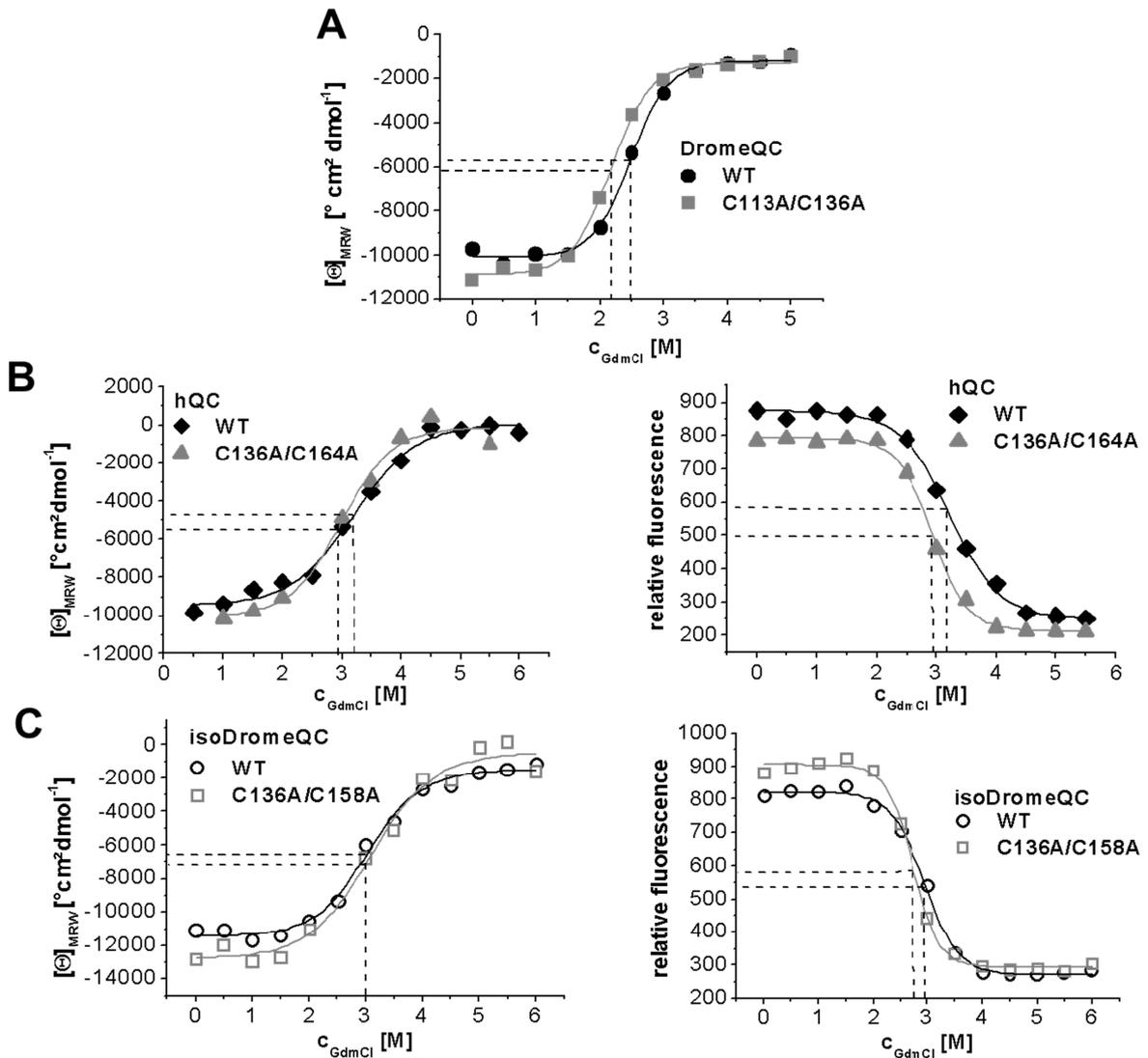
**Abbildung A2** Graphische Darstellung der thermischen Strukturstabilität von hQC, DromeQC und isoDromeQC.

A) CD-Spektren im UV-Bereich ( $190 \text{ nm} \leq \lambda \leq 260 \text{ nm}$ ) bei  $20^\circ\text{C}$ . Die untersuchten QCs zeigen ein typisches CD-Spektrum für Proteine mit hohem  $\alpha$ -helikalem Anteil in ihrer Sekundärstruktur (lokale Minima der mittleren Elliptizität pro Aminosäure  $\Theta_{\text{MRW}}$  bei  $208\text{nm}$  und  $222\text{nm}$ ). B) – D) Thermisch induzierte Denaturierung von humaner QC und QCs aus *D. melanogaster* sowie deren Cystein→Alanin Variante, dargestellt als temperaturabhängige Veränderung der  $\Theta_{\text{MRW}}$  bei konstanter Wellenlänge  $\lambda$ .

B) hQC ( $\lambda = 227 \text{ nm}$ ): Während der Temperaturübergangsmittelpunkt für den WT  $49,3 \pm 0,1^\circ\text{C}$  beträgt, reduziert sich dieser Wert bei fehlender Disulfidbrücke ( $\text{C}^{139}\text{A}/\text{C}^{164}\text{A}$ ) um  $3 \text{ K}$  auf  $46,1 \pm 0,1^\circ\text{C}$  (Ruiz-Carrillo, Koch et al., 2011).

C) DromeQC ( $\lambda = 223 \text{ nm}$ ): Im Gegensatz zur hQC beträgt der Temperaturübergangsmittelpunkt für beide Varianten der DromeQC circa  $50^\circ\text{C}$  (WT:  $50,6 \pm 1,3^\circ\text{C}$ ,  $\text{C}^{113}\text{A}/\text{C}^{136}\text{A}$ :  $49,2 \pm 0,4^\circ\text{C}$ ). Es ist jedoch ein viel stärkerer Verlust der Sekundärstruktur für die Enzymspezies ohne intramolekulare Disulfidbrücke durch thermische induzierte Denaturierung zu beobachten ( $\Delta\Theta_{\text{MRW}}_{\text{WT}} < \Delta\Theta_{\text{MRW}}_{\text{Cys}\rightarrow\text{Ala}}$ ) (Koch, Kolenko et al., 2012a).

D) isoDromeQC ( $\lambda = 227 \text{ nm}$ ): Es ist kein Unterschied in der thermischen Konformationsstabilität zwischen WT und Cys→Ala Variante zu erkennen (WT:  $52,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$ ,  $\text{C}^{136}\text{A}/\text{C}^{158}\text{A}$ :  $51,4 \pm 0,1^\circ\text{C}$ ;  $\Delta\Theta_{\text{MRW}}_{\text{WT}} = \Delta\Theta_{\text{MRW}}_{\text{Cys}\rightarrow\text{Ala}}$ ). Bei diesem Enzym wird die thermische Konformationsstabilität offenbar durch andere intramolekulare Wechselwirkungen bestimmt (Koch, Kolenko et al., 2012a).

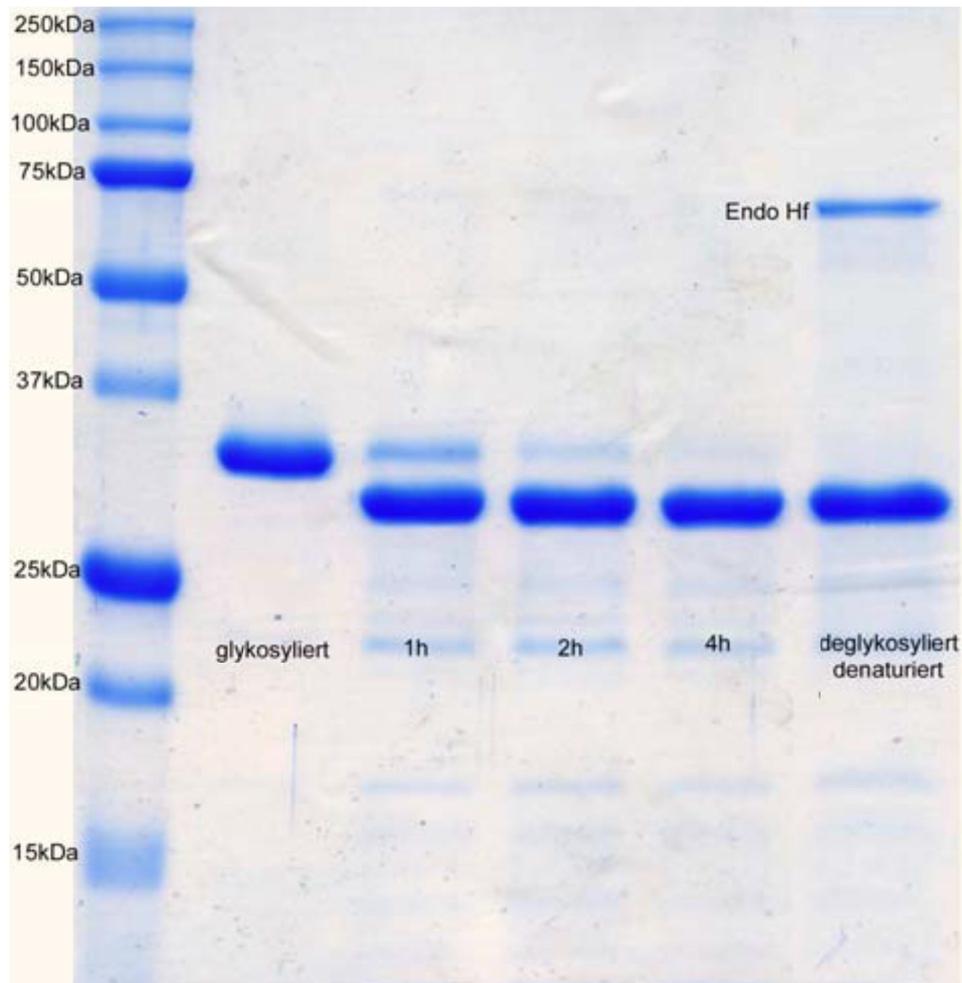


**Abbildung A3** Graphische Darstellung der durch Guanidinhydrochlorid (GdmCl) induzierte Denaturierung von humaner QC und beiden *D. melanogaster* QCs sowie deren Cystein→Alanin Varianten, dargestellt als GdmCl ( $c_{\text{GdmCl}}$ ) abhängige Veränderung der  $\Theta_{\text{MRW}}$  bei konstanter Wellenlänge  $\lambda$  (hQC:  $\lambda = 227$  nm, DromeQC:  $\lambda = 223$  nm, isoDromeQC:  $\lambda = 227$  nm) beziehungsweise der relativen Fluoreszenz (Anregungswellenlänge  $\lambda_{\text{ex}} = 295$  nm, Detektionswellenlänge  $\lambda_{\text{em}} = 337$  nm). Im Gegensatz zur thermisch induzierten Denaturierung führt die durch GdmCl-induzierte Entfaltung zum fast vollständigen Verlust der Sekundärstruktur ( $\Theta_{\text{MRW}} \rightarrow 0^\circ\text{cm}^2/\text{dmol}$ , bzw. relative Fluoreszenz  $\rightarrow 0$ ) (vergl. Abbildung A2, Seite 75).

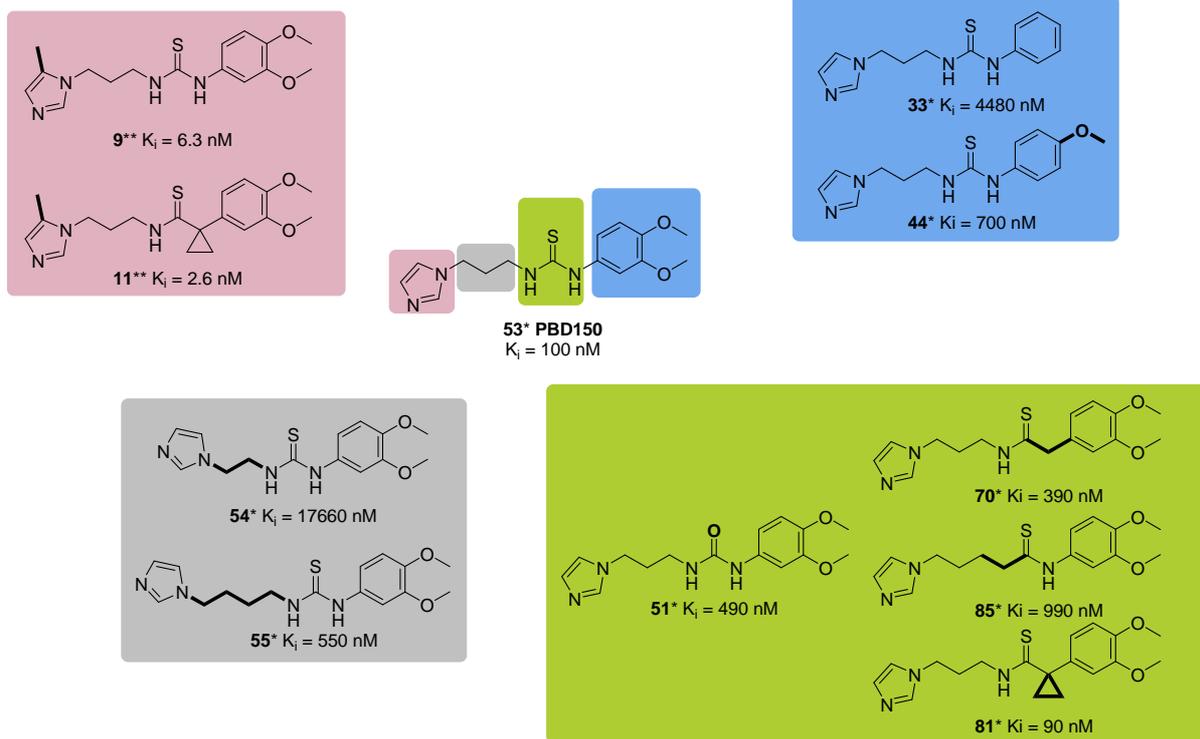
A) Ein Verlust der intramolekularen Disulfidbrücke führt bei der DromeQC zu einer Verringerung der chemischen Konformationsstabilität. Der GdmCl-Konzentrationsübergangsmittelpunkt reduziert sich von  $2,49 \pm 0,03 \text{ M}_{\text{GdmCl}}$  für den WT um *circa* 0,3 M auf  $2,17 \pm 0,03 \text{ M}_{\text{GdmCl}}$  für die Cys→Ala Variante (Koch, Kolenko et al., 2012a).

B) Auch bei der hQC resultiert eine Mutation der beiden Cysteine in einer Verschiebung des GdmCl-Konzentrationsübergangsmittelpunktes von  $3,19 \pm 0,08 \text{ M}_{\text{GdmCl}}$  (CD-Spektroskopie, links) /  $3,23 \pm 0,03 \text{ M}_{\text{GdmCl}}$  (Fluoreszenzspektroskopie, rechts) für den WT um *circa* 0,3 M zu  $2,87 \pm 0,17 \text{ M}_{\text{GdmCl}}$  /  $2,94 \pm 0,02 \text{ M}_{\text{GdmCl}}$  für die Cys→Ala Variante (Ruiz-Carrillo, Koch et al., 2011).

C) Für die isoDromeQC konnte kein Einfluss der Mutation  $\text{C}^{136}\text{A}/\text{C}^{158}\text{A}$  auf die chemische Konformationsstabilität festgestellt werden [WT:  $3,03 \pm 0,07 \text{ M}_{\text{GdmCl}}$  (CD-Spektroskopie, links) /  $2,95 \pm 0,03 \text{ M}_{\text{GdmCl}}$  (Fluoreszenzspektroskopie, rechts), Cys→Ala Variante:  $3,09 \pm 0,13 \text{ M}_{\text{GdmCl}}$  /  $2,73 \pm 0,02 \text{ M}_{\text{GdmCl}}$ ] (Koch, Kolenko et al., 2012a).



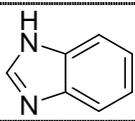
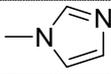
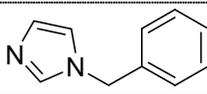
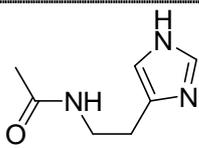
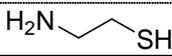
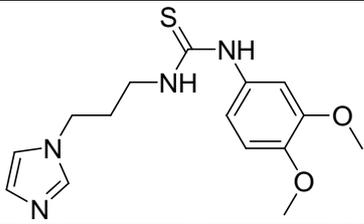
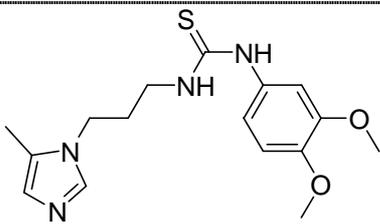
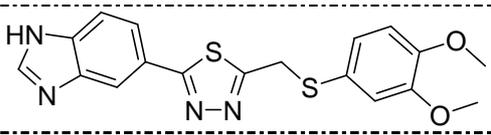
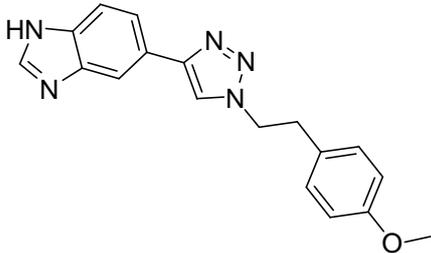
**Abbildung A4** Darstellung der SDS-PAGE-Analyse von glykosylierter, unter nicht-denaturierenden Bedingungen deglykosylierter sowie unter denaturierenden Bedingungen deglykosylierter DromeQC. Durch Deglykosylierung tritt sowohl beim nativen als auch beim denaturierten Enzym eine durch die Abspaltung des Oligosaccharids hervorgerufene Veränderung der Migration von *ca.* 35 kDa zu *ca.* 33 kDa auf. Da ein direkter Übergang zwischen beiden Formen erfolgt (vergl. 1h Inkubation des nativen Proteins), wird auf eine einzelne Glykosylierungsstelle der DromeQC geschlossen. Da auch das native Protein deglykosyliert wird, lässt sich eine oberflächennahe Lage des Oligosaccharids vermuten. Nach einem Zeitraum von  $t > 3h$  konnte eine Präzipitation des nativen Enzyms beobachtet werden. So dient die Glykosylierung unter anderem der Proteinlöslichkeit. Die Deglykosylierung nativer DromeQC für  $t = 1,5h$  beeinflusste die katalytische Aktivität des Enzyms nicht.



**Abbildung A5** Beitrag der Pharmakophoren zur Enzyminteraktion von PBD150 und abgeleiteten Strukturen  
 [(Buchholz et al., 2006), \*\* (Buchholz et al., 2009)].

Nr.	Bezeichnung
9	1-(3,4-Dimethoxyphenyl)-3-(3-(5-methyl-1-imidazol-1-yl)propyl)thioharnstoff (PQ0352)
11	1-(3,4-Dimethoxyphenyl)-N-(3-(5-methyl-1-imidazol-1-yl)propyl)cyclopropancarbothioamid
33	1-(3-(1-Imidazol-1-yl)propyl)-3-phenylthioharnstoff
44	1-(3-(1-Imidazol-1-yl)propyl)-3-(3-methoxyphenyl)thioharnstoff
51	1-(3-(1-Imidazol-1-yl)propyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)harnstoff
<b>53</b>	<b>PBD150</b> [1-(3,4-Dimethoxyphenyl)-3-(3-imidazol-1-yl-propyl)-thioharnstoff]
54	1-(2-(1-Imidazol-1-yl)ethyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)thioharnstoff
55	1-(4-(1-Imidazol-1-yl)butyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)thioharnstoff
70	N-(3-(1-Imidazol-1-yl)propyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethanthioamid
81	N-(3-(1-Imidazol-1-yl)propyl)-1-(3,4-dimethoxyphenyl)cyclopropancarbothioamid
85	5-(1-Imidazol-1-yl)-N-(3,4-dimethoxyphenyl)pentanthioamid

**Tabelle A3** Chemische Bezeichnung und Strukturformeln der verwendeten kompetitiven hQC-Inhibitoren.

Bezeichnung		Struktur
<b>Imidazol</b>		
<b>Benzimidazol</b>		
<b>1-Methylimidazol</b>		
<b>1-Benzylimidazol</b>		
<b>N-ω-Acetylhistamin</b>		
<b>Cysteamin</b>		
<b>PBD150</b>	1-(3-(1H-imidazol-1-yl)propyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)thioharnstoff	
<b>PQ0352</b>	1-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(3-(5-methyl-1H-imidazol-1-yl)propyl)thioharnstoff	
<b>PQ1025</b>	2-(1H-benzo[d]imidazol-5-yl)-5-((3,4-dimethoxyphenylthio)methyl)-1,3,4-thiadiazol	
<b>PQ1050</b>	5-(1-(4-methoxyphenethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-1H-benzo[d]imidazol	

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen gekennzeichnet habe.

Diese Arbeit wurde zuvor weder an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg noch an einer anderen universitären Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht.

Die der Dissertation angefügten Publikationen umfassen den Inhalt der eigenen Arbeiten und wurden vollständig oder in den entsprechenden Teilgebieten von mir verfasst.

Birgit Koch

Halle (Saale), den 16.06.2014

## Lebenslauf

### Angaben zur Person

Name: Koch  
Vorname: Birgit  
Akademischer Grad: Dipl.-Ing. (FH)  
Anschrift: Chausseestr. 8, 06317 Seegebiet Mansfelder Land, Ortsteil Amsdorf  
Geburtsdatum: 10.04.1980  
Geburtsort: Merseburg  
Geschlecht: weiblich  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Bildungsgang

Fachgebiet der Promotion: Biochemie, Strukturbiologie  
Thema der Dissertation: Untersuchungen zur Charakterisierung von Bindungseigenschaften kompetitiver Inhibitoren tierischer Glutaminylzyklasen

09/2009 – Promotionsstudentin, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
2007 – 2012 BioSolutions Halle GmbH / Probiodrug AG, wissenschaftliche Mitarbeiterin  
2003 – 2006 Hochschule Anhalt, Abteilung Köthen  
Dipl.-Ing. (FH) Biotechnologie  
Diplomarbeit: Heterologe Expression, Reinigung und Charakterisierung homologer Proteine der humanen Glutaminyl-Cyclase aus Mensch und *Drosophila melanogaster*  
1998 – 2002 Hochschule Anhalt, Abteilung Köthen  
Dipl.-Ing. (FH) Biomedizinische Technik  
Diplomarbeit: Entwicklung einer Methodik zur Abbildung lebender Zellen im Atmosphärischen Rasterelektronenmikroskop (ESEM)  
1994 – 1998 Gymnasium an der Bergmannsallee, Lutherstadt Eisleben, Abschluss: Abitur  
1991 – 1994 Frieden-Gymnasium, Halle (Saale)  
1986 – 1991 Polytechnische Oberschule „Alexander Matrossow“, Halle (Saale)

Birgit Koch

## **Danksagung**

„Leider lässt sich eine wahrhafte Dankbarkeit mit Worten nicht ausdrücken.“

(Johann Wolfgang von Goethe, 1749 - 1832)

Dennoch möchte ich es an dieser Stelle versuchen. Mein herzlichster Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Hans-Ulrich Demuth für die Überlassung dieses überaus interessanten Themas, das mir entgegengebrachte Vertrauen und die umfassende Unterstützung bei der Realisierung der vorliegenden Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Markus Pietzsch für sein Engagement bei der Betreuung diese Arbeit an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Herrn Dr. Stephan Schilling für wertvolle Diskussionen und tatkräftige Unterstützung.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Probiodrug AG, insbesondere Herrn Dr. Mirko Buchholz und Herrn Michael Wermann, für die angenehme Zusammenarbeit, stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Herrn Dr. Petr Kolenko, Herrn Prof. Dr. Milton T. Stubbs und Herrn Dr. David Ruiz Carrillo für wertvolle Anregungen und die Unterstützung bei der Anfertigung der Publikationen.

Meinen Eltern und Freunden für die mir entgegengebrachte Geduld und Unterstützung, was maßgeblich zur Entstehung der vorliegenden Arbeit beigetragen hat.

## Angefügte Publikationen

- Ruiz-Carrillo, D., **Koch, B.**, Parthier, C., Wermann, M., Dambe, T., Buchholz, M., Ludwig, H. H., Heiser, U., Rahfeld, J. U., Stubbs, M. T., Schilling, S., Demuth, H.-U. (2011). Structures of Glycosylated Mammalian Glutaminyl Cyclases Reveal Conformational Variability near the Active Center. *Biochemistry* 50, 6280-6288
- Koch, B.**, Kolenko, P., Buchholz, M., Carrillo, D. R., Parthier, C., Wermann, M., Rahfeld, J. U., Reuter, G., Schilling, S., Stubbs, M. T., Demuth, H.-U. (2012). Crystal Structures of Glutaminyl Cyclases (QCs) from *Drosophila melanogaster* Reveal Active Site Conservation between Insect and Mammalian QCs. *Biochemistry* 51, 7383-7392
- Koch, B.**, Buchholz, M., Wermann, M., Heiser, U., Schilling, S., Demuth, H.-U. (2012). Probing Secondary Glutaminyl-Cyclase (QC)-Inhibitor Interactions. *Chem Biol Drug Des* 80, 937-946