

"Untersuchungen zur Rolle N-terminaler Peptidmodifikationen bei dementiellen Erkrankungen sowie daraus folgende Ansätze zur Unterdrückung pathophysiologischer Prozesse"

H a b i l i t a t i o n s s c h r i f t

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium habitatus (Dr. rer. nat. habil.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Dr. rer. nat. Stephan Schilling

geb. am: 30.05.1976 in: Halle (Saale)

Gutachter

1. Prof. Dr. M. Pietzsch, Halle (Saale)
2. Prof. Dr. D. Steinhilber, Frankfurt (Main)
3. Prof. Dr. D. Willbold, Düsseldorf

Halle (Saale), 10.01.2019

Inhalt

1 Einleitung	5
2 Die Bildung Pyroglutamat-modifizierter Peptide <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	10
2.1 Pyroglutamat (pGlu, 5-Oxo-Prolin) – Vorkommen, Metabolismus und Wirkung als N-terminale Modifikation von Peptiden	10
2.2 Untersuchungen zur nicht-enzymkatalysierten Bildung von Pyroglutamat	17
2.3 Enzymkatalysierte Bildung von N-terminalem Pyroglutamat durch Glutaminyl-Cyclasen (QCs)	18
2.3.1 Pflanzliche und bakterielle Glutaminyl-Cyclasen (QCs)	18
2.3.2 Tierische und menschliche Glutaminyl-Cyclasen – Struktur und Funktion.....	20
2.3.3 Isolation von Isoenzymen der tierischen Glutaminyl-Cyclasen (iso-Glutaminyl-cyclase, isoQC)	23
2.3.4 Zusammenhang zwischen Lokalisation von Glutaminyl-Cyclase und iso-Glutaminyl-Cyclase sowie deren Substratumsetzung in der Zelle	25
2.3.5 Das Golgi-Phosphoprotein 3 (GOLPH3) vermittelt die Retention von iso-Glutaminyl-Cyclase (isoQC) im Golgi-Apparat	29
3 Glutaminyl-Cyclasen als Zielenzyme der Wirkstoffentwicklung.....	31
3.1 Die Rolle der pGlu-Modifikation für die pathophysiologischen Eigenschaften von Amyloidpeptiden	31
3.2 Pharmakologische Untersuchungen zur Unterdrückung von pGlu-modifizierten Amyloidpeptiden	36
3.3 Der Einfluss von QC-Inhibitoren auf die Reifung und Aktivität von CC-Chemokine Ligand 2 (CCL2).....	38
3.4 QC und isoQC: Bildung von pGlu-modifizierten Peptiden als zentraler Teil des Pathomechanismus der Alzheimer-Krankheit	40
4 Weitere Modifikationen von Amyloidpeptiden – die Bildung von isoAspartat am N-Terminus von Amyloid- β (A β).....	43
5 Therapeutische Antikörper gegen modifiziertes A β	45
5.1 Untersuchungen zur passiven Immunisierung von transgenen Mäusen mit pGlu-A β -spezifischen Antikörpern	45
5.2 QC-Inhibitoren oder Proteinwirkstoffe zur Verhinderung der Bildung von pGlu-A β ; Vergleich der therapeutischen Konzepte	48
6 Zusammenfassung	51
7 Literaturverzeichnis.....	54

Anhang (separater Einband)

Abkürzungsverzeichnis

A β	Amyloid- β , Spaltprodukt des APP
AD	<i>Alzheimer's Disease</i> , Alzheimer-Krankheit
ADan	<i>Amyloid-Danish variant</i> , Spaltprodukt des Bri(Dan)-Proteins
ADDL	<i>Amyloid derived diffusible ligands</i>
AICD	<i>Amyloid precursor protein intracellular domain</i>
APP	<i>Amyloid precursor protein</i>
BACE	<i>Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme</i>
CCL2	<i>CC-chemokine ligand 2</i>
CSF	<i>Cerebrospinal fluid</i>
DP4	Dipeptidyl-Peptidase 4
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ENU	<i>N-ethyl-N-nitrosourea</i> , N-Ethyl-N-nitrosoharnstoff
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FBD	<i>Familial British dementia</i>
FSH	follikelstimulierendes Hormon
GnRH	<i>Gonadotropin-releasing hormone</i>
GNTIX	<i>Alpha-1,6-mannosylglycoprotein 6-beta-N-acetylglucosaminyltransferase B</i>
GOLPH3	<i>Golgi phosphoprotein 3</i>
HEK293	<i>Human embryonal kidney cells 293</i>
HPG	<i>Hypothalamic-pituitary-gonadal</i> , hormoneller Regelkreislauf
HPT	<i>Hypothalamic-pituitary-thyroid</i> , hormoneller Regelkreislauf
IDE	<i>Insulin-degrading enzyme</i>
IgG	Immunglobulin G
isoQC	Glutaminyl-Cyclase-Isoenzym
ko	<i>knockout</i>
LH	Luteinisierendes Hormon
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i> (Bezeichnung für CCL2, veraltet)
MMP-9	Matrix-Metalloproteinase 9
NEP	Nepilysin (Endoprotease)
pE	Pyroglutamat, 5-Oxo-L-Prolin
pGlu	Pyroglutamat, 5-Oxo-L-Prolin
QC	Glutaminyl-Cyclase
PI4P	Phosphatidylinositol-4-Phosphat

T4	Thyroxin
TRH	<i>Thyrotropin-releasing hormone</i>
TSH	<i>Thyroid-stimulating hormone</i>
VPS74	<i>Vacuolar protein sorting-associated protein 74</i>

1 Einleitung

Dementielle Syndrome sind als Erkrankungen des zentralen Nervensystems definitionsgemäß durch eine quantitative und qualitative Abnahme der Hirnleistung gekennzeichnet (Alzheimer's Association: 2014 Alzheimer's disease facts and figures (2014)). Die Erkrankungen äußern sich durch Störungen des Antriebs und des Gedächtnisses, des Auffassungs-, Konzentrations- und Orientierungsvermögens sowie durch Persönlichkeitsveränderungen (Prince et al., 2013). Die Ursachen für diese Symptome können verschieden sein, so sind sie z.B. auf Vergiftungen oder Mangelernährung (Thiaminmangel), Hirnverletzungen oder –tumore, Infektionen (Enzephalitis) oder Hirndurchblutungsstörungen (vaskuläre Demenz) zurückzuführen (Burns und Iliffe, 2009b). In einigen dieser Fälle ist die Symptomatik transient und z.B. durch Medikamente oder Operationen behandelbar. Andererseits treten jedoch auch neurodegenerative Krankheiten auf, welche durch einen fortschreitenden Verlust von Nervenzellen gekennzeichnet sind. Zu diesen Erkrankungen zählen z.B. die Alzheimer-Krankheit, die frontotemporale Demenz sowie die Huntington-Krankheit (Tabelle 1)(Hugo und Ganguli, 2014).

Neurodegenerative Erkrankungen sind häufig auf Strukturveränderungen von Proteinen zurückzuführen, sie werden daher auch der Gruppe der Proteinfaltungserkrankungen oder auch Amyloidosen (betrifft nicht alle abgelagerten Spezies (Sipe et al., 2010)) zugeordnet (Rostagno et al., 2010; Hazenberg, 2013). Diese Erkrankungen haben gemeinsam, dass eine Strukturveränderung eines oder mehrerer Proteine zur Aggregation und in deren Folge zur Schädigung des betroffenen Gewebes führt. Werden die entsprechenden Proteine verstärkt durch Nervenzellen exprimiert, kommt es zur Neurodegeneration.

Die mit Abstand häufigste Ursache einer Demenz ist die Alzheimer-Krankheit (AD; Tabelle 1). Ungefähr drei Viertel aller Demenzerkrankungen sind auf Fälle mit AD-typischen Veränderungen zurückzuführen (Burns und Iliffe, 2009b). Die zweithäufigste Form ist die cerebro-vaskuläre Demenz (ca. 20%). Andere neurodegenerative Erkrankungen, wie z.B. die Huntington-Krankheit oder die frontotemporale Demenz, weisen eine Prävalenz von unter 1% auf (Hugo und Ganguli, 2014). Das Alter stellt einen Hauptrisikofaktor dar, an einer Demenz zu erkranken (Burns und Iliffe, 2009a). Es wird geschätzt, dass jeder Dritte im Alter von über 90 Jahren an einer Demenz erkrankt ist (Brookmeyer et al., 2007).

Tabelle 1: Auswahl dementieller Syndrome, welche durch Aggregation und Ablagerung von Proteinen bzw. Peptiden gekennzeichnet sind. Häufig treten Mischformen der aufgeführten Erkrankungen auf, z.B. Alzheimer-Krankheit mit Lewy-Körperchen. Einen erheblichen Anteil an allen Demenzfällen (auch Mischformen) bildet auch die vaskuläre Demenz, die hier aber nicht aufgeführt ist. Auf den Begriff „Amyloid“ wird verzichtet, da nicht alle Proteinablagerungen (α -synuclein, Huntingtin) den entsprechenden Kriterien genügen (Sipe et al., 2014).

Erkrankung	Prävalenz mit entsprechender Quelle	Anteil an Demenzfällen¹	Abgelagertes Protein	Betroffene Hirnregion	Form²	Ausgewählte Beschreibung der Erkrankung	Literatur zur
Alzheimer-Krankheit	11 % (Alter 65+) (Hebert et al., 2013)	50-75%	Amyloid- β , Tau	Kortex, Hippocampus	s, v	(Querfurth und LaFerla, 2010; Selkoe et al., 2012)	
Lewy-Körperchen-Demenz (DLB) (incl. Parkinson-Krankheit, PDD)	LBD: 0 -5 % (Alter 65+) (Zaccai et al., 2005) PDD: 0,15 - 0,5% (Alter 65+) (Aarsland et al., 2005)	< 5% (23 % ³)	α -synuclein	Substantia nigra, Neokortex	s, v	(Thomas und Beal, 2007; Klein und Westenberger, 2012; Walker et al., 2015; Zhang et al., 2015)	
Frontotemporale Demenz	< 0,1 % (Alter 50+) (Rosso et al., 2003)	5-10%	Tau, TDP-43, FUS	Frontaler und temporalen Kortex	s, v	(Spillantini und Goedert, 2013; Bang et al., 2015; Iqbal et al., 2016)	
Huntington-Krankheit	Ca. 1:10000 in Mitteleuropa; weltweit stark unterschiedlich (Laccone et al., 1999)	k.A.	Huntingtin	Striatum, Kortex	v	(Lange, 2002; Ross und Tabrizi, 2011; Pringsheim et al., 2012; Rollnik, 2015)	
Creutzfeld-Jacob-Erkrankung	Ca. 1:1Mio (Johnson, 2005)	k.A.%	PrP ^{sc}	Kortex, graue Substanz, variiert je nach Subtyp	s, v, e	(Puoti et al., 2012; Aguzzi und Falsig, 2012; Aguzzi und Lakkaraju, 2016)	

¹, entnommen aus: (Prince et al., 2014); k.A., keine Angabe, Anteil jedoch deutlich geringer als bei den anderen Erkrankungen

², sporadisch (s) oder monogenetisch vererbare Form bekannt (v) sowie erworben (e)

³, Angabe aus (Vann Jones und O'Brien, 2014)

Schätzungen zufolge sind momentan 44 Millionen Menschen weltweit von AD betroffen (Prince et al., 2014). Charakteristische Symptome der Erkrankung sind progressiver Gedächtnisverlust, gehinderte kognitive Funktion und Paranoia. Die bereits vom Entdecker Alois Alzheimer beobachteten histopathologischen Veränderungen, die hauptsächlich die Hirnrinde und den Hippocampus betreffen, sind offenbar die Ursache der Symptomatik. Pathologische Merkmale der Krankheit sind die extrazellulären Amyloidablagerungen („amyloid plaques“), die hauptsächlich aus dem Peptid A β bestehen sowie intrazelluläre Ablagerungen des hyperphosphorylierten Proteins Tau („neurofibrillary tangles“). Die Bildung und Ablagerung von A β -Peptiden wird als ursächlich für die Entstehung von AD beim Menschen angesehen. Für eine umfassende Darstellung der Mechanismen, welche zum Neuronenverlust bei AD führen, sei auf die Literatur verwiesen (Selkoe, 2001; Selkoe, 2008; Querfurth und LaFerla, 2010; Jack, Jr. et al., 2010).

Aufgrund der stetig steigenden Lebenserwartung wird die Prävalenz von AD zunehmen. Es wird geschätzt, dass sich die Zahl der Alzheimer-Patienten in den kommenden 30 Jahren auf über 100 Mio weltweit vervierfacht (Brookmeyer et al., 2007; Prince et al., 2014). Wenn man bedenkt, dass die Pflege und Medikation eines Demenzpatienten bis zu 40 000 Euro pro Jahr kostet (Burns und Iliffe, 2009b; Wortmann, 2012), ergibt sich daraus ein erheblicher gesellschaftlicher Druck zur Entwicklung entsprechender Pharmaka. Dennoch steht bislang keine Therapiemöglichkeit zur Verfügung, welche den chronischen Verlauf der Erkrankung verzögern bzw. aufhalten könnte. Die zugelassenen Medikamente, z.B. Acetylcholinesterase-Inhibitoren, lindern die Symptomatik vorübergehend, greifen jedoch nicht in die pathologischen Veränderungen im Hirn ein (Carter et al., 2010). Die Ursachen für das Fehlen einer kurativen Medikation sind vielfältig (Aguzzi und O'Connor, 2010; Carter et al., 2010):

1. Die Mechanismen der Bildung der fehlgefalteten Proteine sind komplex und häufig ein Ergebnis limitierter Proteolyse (Rostagno et al., 2010). Die an der Bildung der Peptide bzw. Proteine beteiligten Enzyme haben auch physiologische Funktionen, wodurch eine spezifische Unterdrückung der Bildung von amyloidogenen Produkten kaum möglich erscheint, ohne andere Abbauprozesse zu stören. Beispiele hierfür sind der γ -Sekretase-Komplex, welcher bei der Bildung von A β -Peptiden eine Rolle spielt, oder die Caspasen, welche für die Generierung von toxischen Huntingtin-Fragmenten verantwortlich sind (Sanchez Mejia und Friedlander, 2001; Extance, 2010; Landles et al., 2010; Sambamurti et al., 2011; Ehrnhoefer et al., 2011; Schapira et al., 2014).
2. Zahlreiche der amyloidogenen Proteine sind bei neurodegenerativen Erkrankungen im Zellkern oder cytosolisch lokalisiert, so z.B. α -Synuclein oder Tau. Eine effektive

Unterdrückung der Aggregation bzw. des Abbaus der Konglomerate, z.B. durch Antikörper, wird dadurch erschwert (Golde, 2014). Die beobachtete Wirkung von Antikörpern auf die zelluläre Transmission von Aggregaten (Clavaguera et al., 2009) könnte auf eine extrazelluläre Bindung zurückzuführen sein (Pedersen und Sigurdsson, 2015).

3. Die Blut-Hirn-Schranke, ein System, welches auf der dichten Verknüpfung von Endothelzellen über *tight junctions* beruht und zur Kontrolle des Stofftransportes ins Gehirn dient (Bicker et al., 2014), stellt eine wesentliche Barriere für Wirkstoffe dar. Dies macht es erforderlich, dass die Pharmaka verschiedene Kriterien in Bezug auf ihre molekulare Masse, Lipophilie, polare Oberfläche und Eigenschaften zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken und Ionisierbarkeit erfüllen (Hubbard, 2011; Rankovic, 2015). Dies war z.B. sehr hinderlich für die Entwicklung von Inhibitoren der β -Sekretase BACE1 (Carter et al., 2010; De Strooper, 2010). Deshalb werden derzeit verschiedene andere Möglichkeiten geprüft (z.B. Ultraschall), die Blut-Hirn Schranke für Substanzen transient durchlässig zu machen (Parrish et al., 2015).
4. Zahlreiche amyloidogene Spezies, z.B. A β und Tau, haben eine physiologische Funktion (Puzzo et al., 2008; Puzzo et al., 2011; Puzzo und Arancio, 2013; Iqbal et al., 2016). Die Unterdrückung der Bildung der Peptide könnte somit Nebenwirkungen hervorrufen. Im Gegensatz dazu ist eine physiologische Funktion posttranslational modifizierter A β -Peptide noch nicht beschrieben worden.
5. Das klinische Erscheinungsbild, insbesondere der AD, ist von Fall zu Fall unterschiedlich. Es kann auf genetischer Prädisposition beruhen (vgl. Tabelle 1), sporadisch auftreten oder z.B. die Spätfolge einer Verletzung sein. Zudem treten die typischen Kennzeichen der Alzheimer-Krankheit häufig in Verbindung mit anderen Gewebeveränderungen auf. Dies hat zur Folge, dass die klinische Testung von neuen Wirkstoffen nicht in „reinen“ Alzheimer-Patientenpopulationen erfolgt. Dementsprechend wird versucht (u.a. mittels Imaging-Verfahren und genetischen Analysen), Untersuchungen in eng umgrenzten Patientenpopulationen durchzuführen (Jack, Jr., 2012; Ringman et al., 2014; Schneider et al., 2014). Darüber hinaus ist bekannt, dass z.B. A β -Ablagerungen lange vor Auftreten von Verhaltensveränderungen nachweisbar sind (Jack, Jr. et al., 2010; Villedaigne et al., 2013). Zahlreiche Ansätze wurden demnach in Patienten getestet, bei denen das Stadium womöglich zu weit fortgeschritten war (Giacobini und Gold, 2013; Schneider et al., 2014). Daher werden zunehmend Studien mit Patienten favorisiert, welche sich

in einem Frühstadium der Demenz befinden. Dies wiederum erschwert die Rekrutierung, verlängert die klinische Prüfphase und erhöht entsprechend die Kosten der Entwicklung neuer Präparate (Schneider et al., 2014).

6. Die zurzeit verfügbaren Tiermodelle spiegeln die neurodegenerative Erkrankung häufig unvollständig wider. Dies betrifft vor allem die Alzheimer-Krankheit (Van Dam und De Deyn, 2011). Diese Unterschiede könnten für das Scheitern verschiedener Therapieansätze in der klinischen Phase verantwortlich sein (LaFerla und Green, 2012).
7. Obgleich zahlreiche diagnostische Biomarker verfügbar sind (Jack, Jr., 2012; Johnson et al., 2012; Blennow et al., 2012a; Blennow et al., 2015), gibt es keine derartigen Marker, die mit dem kognitiven Status der Patienten korrelieren. Wie bereits erwähnt, geht die Veränderung der Biomarker den Symptomen der Erkrankung voraus (Bateman et al., 2012), d.h. der Meßwert eines Biomarkers ist nicht direkt mit einer Wirkung auf die Kognition zu korrelieren. Ein Beispiel hierfür ist der Antikörper Bapineuzumab, der in der Phase 2 eine signifikante Veränderung von Phospho-Tau im CSF bewirkte, jedoch klinische Endpunkte verfehlte (Blennow et al., 2012b).

Vor diesem Hintergrund hatte die vorliegende Arbeit das Ziel, die Entstehung und die Wirkung posttranslationaler Modifikationen von Peptiden zu untersuchen, die nach Saido et al. (1995) verstärkt bei neurodegenerativen Prozessen, insbesondere AD, auftreten. Im Vordergrund stand hierbei die Modifikation des N-Terminus durch Pyroglutamat (pGlu), welche insbesondere bei A β eine wichtige Rolle für die Ausprägung der neurotoxischen Eigenschaften zu spielen scheint und deren Bildung durch das Enzym Glutaminyl-Cyclase (QC) katalysiert wird. Es sollte deshalb auch geprüft werden, ob eine Unterdrückung der Modifikation durch Enzyminhibitoren einen möglichen therapeutischen Ansatz darstellt. Einige der zuvor genannten Probleme der Wirkstoffforschung könnten dadurch umgangen werden:

1. Die Unterdrückung von posttranslationalen Modifikationen der Amyloidpeptide greift nicht in grundlegende Prozesse der Proteolyse ein (vgl. Punkt 1 auf Seite 7). Zudem wird den modifizierten Formen keine physiologische Funktion zugeschrieben. Das Auftreten von pGlu-A β ist ausschließlich an pathophysiologische Veränderungen im Hirn geknüpft (vgl. Punkt 4 auf Seite 8). Potentielle Nebenwirkungen zuvor getesteter Ansätze sind daher nicht zu erwarten.

2. Aufgrund früherer Untersuchungen (Schilling et al., 2003b) ist anzunehmen, dass Enzyminhibitoren, wie sie zur Unterdrückung der Pyroglutamatbildung eingesetzt werden könnten, zellgängig sind und auch die Blut/Hirn-Schranke überwinden (vgl. Punkt 3 auf Seite 8).
3. Es sollten neuartige Tiermodelle erzeugt werden, die sich in Bezug auf das Auftreten der pGlu-Peptide von etablierten Modellen unterscheiden. Zum einen sollte dies zur Charakterisierung der zellulären Toxizität von pGlu-A β beitragen. Zum anderen können diese Tiermodelle zur Testung von neuen Wirkstoffkandidaten (*proof of principle*) eingesetzt werden (vgl. Punkt 6 Seite 9).

Insgesamt sollten die Untersuchungen dazu dienen, die Unterdrückung von pGlu-modifizierten Peptiden als therapeutisches Konzept zu prüfen. Dies umfasste einerseits die Analyse der Bildung von pGlu sowie eine detaillierte enzymatische und strukturelle Charakterisierung der Enzymspezies QC tierischen und pflanzlichen Ursprungs, um das Verständnis der Enzymfunktion als eine Grundlage für die Entwicklung von Inhibitoren zu nutzen (Kapitel 2). Zum anderen stand auch die Isolation und funktionelle Charakterisierung von QC-Isoenzymen im Vordergrund (Kapitel 2). In einem weiteren Teil wurde die Wirkung von pGlu-A β und QC-Inhibitoren in zellulären Testsystemen und Tiermodellen geprüft, um das therapeutische Konzept zu belegen (*proof of principle*) (Kapitel 3). Weiterführende Studien betrafen die Bildung alternativer N-terminaler Modifikationen im Vergleich zur pGlu-Bildung (Kapitel 4) sowie die Möglichkeit des Einsatzes von Proteinwirkstoffen zur Unterdrückung der pGlu-A β -Toxizität (Kapitel 5).

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit sollten daher dazu beitragen, neuartige Möglichkeiten zur Behandlung von AD zu entwickeln und die Basis für die Überführung in eine klinische Entwicklung zu schaffen.

2 Die Bildung Pyroglutamat-modifizierter Peptide *in vitro* und *in vivo*

2.1 Pyroglutamat (pGlu, 5-Oxo-Prolin) – Vorkommen, Metabolismus und Wirkung als N-terminale Modifikation von Peptiden

Die für die Alzheimer-Krankheit charakteristischen Proteinablagerungen können unterschiedlichen posttranslationalen Modifikationen unterliegen. Neben der pGlu-Modifikation des N-terminus von Amyloid- β treten z.B. auch eine Nitrierung oder Phosphorylierungen auf (siehe hierzu auch die Kapitel 4 und 5). Die aus dem intraneuronalen

Protein Tau gebildeten Degenerationsfibrillen sind stark phosphoryliert. Obgleich die genannten Modifikationen von Amyloid- β und Tau mutmaßlich deren pathophysiologische Eigenschaften hervorrufen, sind derartige posttranslationale Veränderungen ein wesentliches Element zur Regulation der biologischen Aktivität und Stabilität von Proteinen und Peptiden. Eine Vielzahl dieser Strukturveränderungen ist daher an der Steuerung physiologischer Prozesse beteiligt (Walsh, 2005). Beispiele hierfür sind die Phosphorylierung von Proteinen durch Kinasen zur Regulation der Genexpression, die Sulfatierung von Hormonen, welche deren Rezeptorbindung vermittelt oder eine Methylierung bzw. Acetylierung von Proteinen, Vorgänge, die ebenfalls für die Regulation der Genexpression in der eukaryontischen Zelle essentiell sind (Tompa et al., 2014; Mowen und David, 2014; Matsubayashi, 2014; Woodsmith und Stelzl, 2014).

Den genannten Modifikationen liegt grundsätzlich eine katalysierte Bildung zugrunde. Daneben treten aber auch spontane Veränderungen des Peptidrückgrates auf, die meistens mit Alterungsprozessen in Verbindung gebracht werden oder verstärkt bei pathophysiologischen Prozessen auftreten. Zu diesen Modifikationen zählen die Bildung von Isoaspartat oder D-Aspartat im Peptidrückgrat (Shimizu et al., 2000; Shimizu et al., 2005) oder auch die Tyrosin-Nitrierung oder -Dimerisierung, die bei entzündlichen Prozessen aufgrund von Radikalbildung vorkommen (Malencik und Anderson, 1994; Malencik und Anderson, 2003; Franco und Estevez, 2014).

Die Bildung von Pyroglutamat (pGlu, pE), eine stets am N-Terminus vorzufindende Peptid-Modifikation, kann sowohl enzymkatalysiert durch Glutaminyl-Cyclasen als auch spontan erfolgen (Abraham und Podell, 1981; Moret und Briley, 1988). Erstmals beschrieben wurde pGlu als Aminosäure-Derivat in Zellkulturmedien bei deren Erhitzung (Haitinger, 1882). Das Erhitzen führt zur Dehydratation von Glutamat bzw. zur spontanen Deamidierung des Glutamins (Abbildung 1). Die Reaktion verläuft dabei nach einem Additions-Eliminierungs-Mechanismus. Die α -Aminogruppe greift nukleophil am γ -Carbonylkohlenstoff der Aminosäure an. Es bildet sich ein tetraedrisches Intermediat, aus dem Wasser bzw. Ammoniak eliminiert wird.

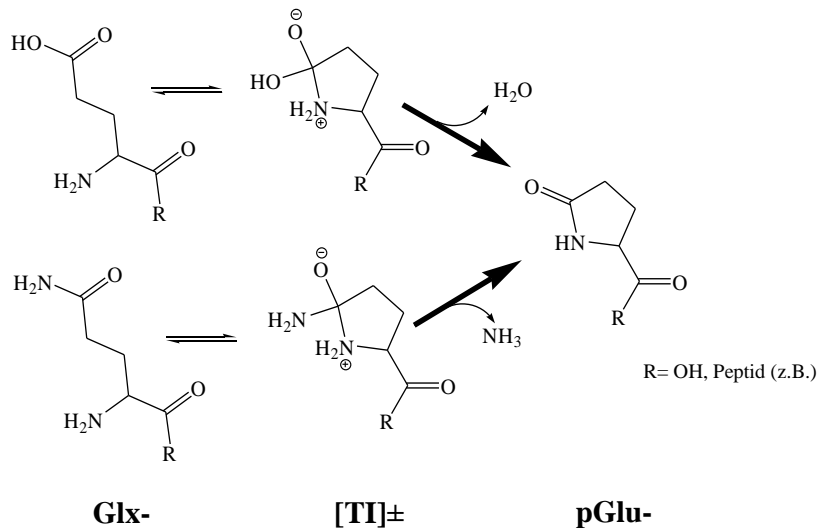


Abbildung 1: Spontane Bildung von Pyroglutamat aus Glutamat bzw. Glutamin. Die Reaktion ist irreversibel und verläuft unter Bildung eines tetraedrischen Intermediats (hier dargestellt in der zwitterionischen Form), aus dem Wasser bzw. Ammoniak (Ammonium) eliminiert wird.

Im tierischen Organismus wird das freie Aminosäurederivat pGlu im γ -Glutamylzyklus durch die Aktivität des Enzyms γ -Glutamyl-Cyclotransferase (GCT) gebildet (Abbildung 2, Mitte unten) (van der Werf und Meister, 1975). Im Unterschied zur zuvor erläuterten verläuft diese Reaktion über ein Acyl-Enzym-Intermediat.

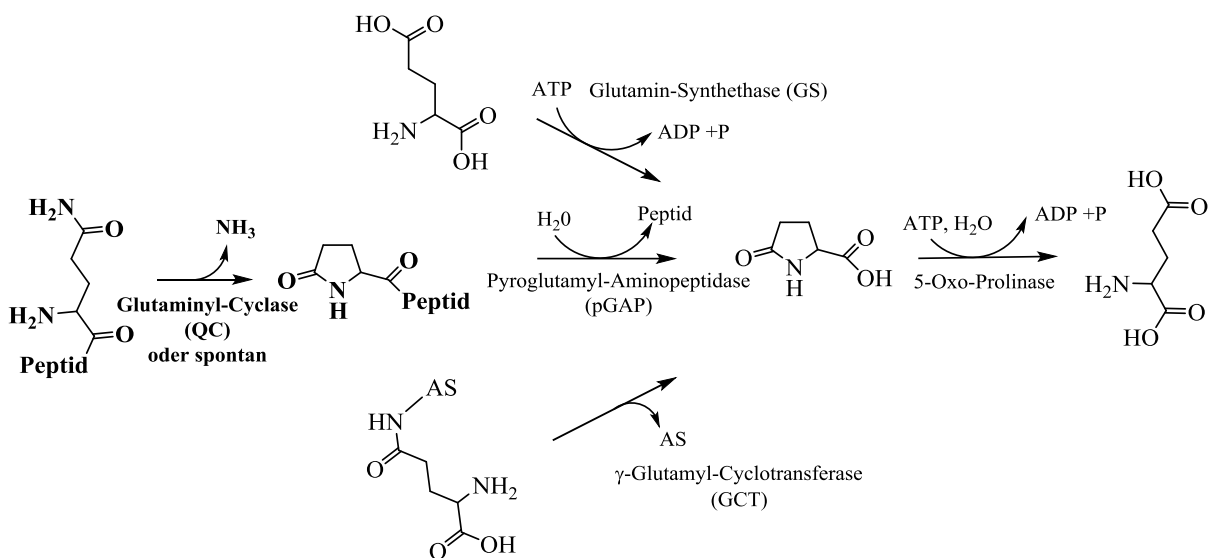


Abbildung 2: Verschiedene Wege der Bildung von Pyroglutamat sowie der Abbau des Aminosäure-Derivats (Erläuterungen im Text). Neben der Spaltung durch 5-Oxo-Prolinase wird pGlu auch über den Urin ausgeschieden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von Pyroglutamyl-Peptiden sowie deren Bildung durch Glutaminy-Cyclasen bei pathophysiologischen Prozessen untersucht (fett hervorgehoben). Neben der hier aufgezeigten Zyklisierung von Glutaminyresten können pGlu-Peptide auch aus Glutamyl-Präkursoren hervorgehen (nicht dargestellt) (AS, Aminosäure).

Ein aktivierter Cysteinrest im aktiven Zentrum der GCT greift die γ -Glutamylbindung eines Dipeptids, das zuvor durch die Aktivität der membranständigen γ -Glutamyl-Transpeptidase gebildet wurde, nukleophil an, und Glycylcystein wird freigesetzt. Das nicht-acylierte Enzym bildet sich durch den intramolekularen, nukleophilen Angriff der Aminogruppe am Thioester zurück und Pyroglutamat entsteht. Darüber hinaus kann pGlu auch durch Glutaminsynthetase in Abwesenheit von Ammoniumionen (Meister, 1985) gebildet werden (Abbildung 2, Mitte oben). Der Mechanismus ist nicht im Detail untersucht, jedoch kann vermutet werden, dass die Aminogruppe nach einer Gruppenübertragung eines Phosphatrestes von ATP auf die γ -Carbonylgruppe, es entsteht dabei ein Säureanhydrid, ebenfalls nucleophil angreift und das Anhydrid in einer intramolekularen Reaktion gespalten wird. Zudem entsteht Pyroglutamat nach Abspaltung des N-terminalen Restes von Peptiden durch Pyroglutamyl-Aminopeptidasen (pGAPasen; Abbildung 2, Mitte) (Awade et al., 1994; Cummins und O'Connor, 1998). Diese Enzyme kommen in Tieren, Pflanzen und Bakterien vor. Im Menschen treten zwei Pyroglutamyl-Aminopeptidasen auf. Die pGAPase II, eine Zink-Aminopeptidase, die sich auf Epithelzellen von Blutgefäßen befindet, hydrolysiert spezifisch das Peptidhormon Thyreoliberin (TRH). Deren Isoenzym, die pGAPase I, ist in verschiedenen Geweben vorzufinden. Diese Protease weist eine breite Substratspezifität auf und ist höchstwahrscheinlich am Peptidabbau im Cytosol beteiligt. Das durch die verschiedenen Mechanismen gebildete Pyroglutamat wird durch die Aktivität der 5-Oxoprolinase zum Glutamat umgesetzt (Abbildung 2, rechts)(Van der Werf et al., 1971; Williamson und Meister, 1981; Meister, 1985), das in den Aminosäure-Stoffwechsel eingeschleust wird. Zudem wird Pyroglutamat über den Urin abgegeben (Eldjarn et al., 1972; Eldjarn et al., 1973).

Offenbar stellt die freie Aminosäure pGlu¹ ausschließlich einen Metaboliten dar, dem keine physiologische Funktion zuzuordnen ist. Demgegenüber ist pGlu am N-Terminus von Proteinen oder Peptiden in vielen Fällen eine Funktion zuzuordnen. Die Bildung der pGlu-Peptide aus Glutaminyl- oder Glutamyl-Präkursoren kann spontan oder durch Glutaminyl-Cyclasen katalysiert erfolgen (siehe das folgende Kapitel). Die Untersuchung dieser Prozesse sowie die Rolle der pGlu-Modifikation für die (patho-) physiologische Aktivität von Peptiden war eines der Ziele der vorliegenden Arbeiten.

Da der aminoterminal Stickstoff die Amidgruppe des Lactamrings ausbildet, verliert der N-Terminus die positive Ladung. Diese strukturellen Veränderungen beeinflussen die

¹ Pyroglutaminsäure ist an sich nicht den Aminosäuren zuzuordnen, da der Stickstoff aufgrund der Ausbildung des Lactamrings seine nucleophilen Eigenschaften eingebüßt hat. Da pGlu jedoch Bestandteil von Peptiden und Proteinen ist, wird es häufig den Aminosäuren zugerechnet. Dies wird jedoch debattiert (Christensen, 1988).

biochemischen Eigenschaften der Peptide und dadurch auch häufig deren biologische Funktion. Für die Peptide TRH und GnRH konnte gezeigt werden, dass N-terminales pGlu deren Halbwertszeit im Plasma verlängert, da sie der Verlust der N-terminalen Ladung vor Abbau durch unspezifische Aminopeptidasen schützt (Lipscomb und Strater, 1996). Des Weiteren war ein Ergebnis von Rezeptor-Interaktionsstudien, dass der N-terminale Rest die Bindung an die spezifischen Rezeptoren vermittelt (Goren et al., 1977; Sealfon et al., 1997). In Tabelle 2 sind einige pGlu-modifizierte Peptide aufgeführt, deren Wirkung bereits untersucht wurde. Die Funktion des N-terminalen Aminosäurerestes wird erläutert, falls diese bereits bekannt ist. Es wird deutlich, dass die „Blockierung“ des N-Terminus mutmaßlich immer zur Stabilisierung des Peptides/Proteines gegenüber Abbau durch Aminopeptidasen beiträgt. Hinzu kommt, dass für einige Enzyme wie Onconase oder Cellulase gezeigt wurde, dass der pGlu-Rest auch die Faltung von Proteinen beeinflussen kann (Ribo et al., 2004; Welker et al., 2007; Dana et al., 2014).

Einige der in Tabelle 2 aufgeführten Peptide (CCL2, CCL7) sind chemotaktisch wirksame Cytokine, sogenannte Chemokine, die bei Entzündungsreaktionen Immunzellen anlocken. Die Chemokine der MCP-Familie (CCL2, CCL7, CCL8 und CCL13) sind dabei spezifisch für Monocyten und Granulozyten (Van Damme et al., 1992). Insbesondere CCL2 (MCP-1) spielt eine wesentliche Rolle bei der angeborenen Immunantwort, da es im geschädigten Gewebe ausgeschüttet wird und auch an Prozessen der Gewebeumbildung beteiligt ist (Panee, 2012). Im Menschen ist CCL2, wie auch die anderen erwähnten Cytokine, am N-Terminus durch pGlu modifiziert (Gong und Clark-Lewis, 1995). Bereits frühere Untersuchungen konnten zeigen, dass eine Veränderung von CCL2 durch N-terminale Verlängerung oder Verkürzung dessen chemotaktische Aktivität stark herabsetzt (Gong und Clark-Lewis, 1995). Die Bedeutung des pGlu-Restes für die Funktion von CCL2 war noch nicht bekannt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Rolle des N-terminalen pGlu-Restes für Chemokine der MCP-Familie untersucht (Cynis et al., 2011)². Das Chemokin mit nicht-cyclisiertem N-Terminus, d.h. Gln¹-CCL2, wies im Vergleich zu pGlu-CCL2 eine 3- bis 5-fach niedrigere chemotaktische Potenz auf (Cynis et al., 2011). Dies geht mit einer

² Um Publikationen mit eigener Beteiligung und Beitrag zur vorliegenden Habilitationsschrift im Text kenntlich zu machen, wurden die entsprechenden Zitate kursiv hervorgehoben. Die entsprechenden Publikationen sind am Abschnittsende als vollständiges Zitat und im Anhang als Kopie aufgeführt.

Tabelle 2 Beispiele humaner, N-terminal pGlu-modifizierter Peptide und Proteine sowie deren Funktion.

Organismus	Peptid/Protein	Funktion des Peptides	Rolle pGlu-Rest	Literatur
Mensch, Rind	Kollagen I	Kollagen des Bindegewebes (Haut, Knochen, Sehnen)	unbekannt	(Click und Bornstein, 1970; Rauterberg et al., 1972; Horlein et al., 1979)
Mensch	Fibronectin	Protein der extrazellulären Matrix, Bindung verschiedener Zelloberflächenproteine (z.B. Kollagen, Fibrin)	unbekannt	(Garcia-Pardo et al., 1983)
Mensch	Gonadoliberin GnRH	Stimulation der Sezernierung von Gonadotropinen (LH)	Essentiell für Rezeptorbindung und -aktivierung, Stabilisierung gegenüber Abbau	(Okada et al., 1973; Karten und Rivier, 1986; Sealfon et al., 1997; Morty et al., 2006)
Mensch	α -Amylase I	Hydrolyse von $\alpha(1-4)$ -glykosidischen Bindungen (Stärkeabbau im Speichel)	unbekannt	(Karn et al., 1981; Ramasubbu et al., 1996)
Mensch	CCL2	Chemotaxis von Monozyten, bewirkt Monozyteninfiltration	Erhöht Affinität zu Rezeptor sowie Schutz vor Abbau	(Yoshimura und Leonard, 1992; Gong und Clark-Lewis, 1995; Cynis et al., 2011)
Mensch	CCL7	Lockstoff von Monozyten und eosinophilen Granulozyten	Einfluss auf Rezeptorbindung, vermutlich Stabilisierung gegenüber Aminopeptidasen	(Proost et al., 1998; Menten et al., 2001; Cynis et al., 2011)
<i>Rana pipiens</i>	RNase (Onconase, Ranpirnase)	Hydrolyse einzelsträngiger RNA	Aktivität und Strukturbildung	(Ribo et al., 2004; Welker et al., 2007)
Mensch	Thyreoliberin TRH	Stimuliert die hypophysäre Sekretion von Thyreotropin und Prolaktin; Neurotransmitter/-modulator; beteiligt am Haarwachstum	Essentiell für Rezeptorbindung und -aktivierung	(Goren et al., 1977)
Tabak	Peroxidase 34	Verstärkte Expression durch umweltbedingten Stress wie Verletzung, oxidativen Stress oder Pathogenbefall		
Tabak	Pathogenese-assoziiertes Protein 1	Verstärkte Expression bei Pathogenbefall		
Tabak	β -1,3-Endoglukanase	Verstärkte Expression bei Pathogenbefall		
<i>Talaromyces emersonii</i>	Cellulase Cel7a	Abbau von Cellulose	erhöht Thermostabilität und Aktivität des Enzyms	(Dana et al., 2014)

verringerten Rezeptor-Internalisierung einher, was auf einen Affinitätsverlust von Gln¹-CCL2 gegenüber dem Rezeptor schließen lässt. Auch die anderen Chemokine der MCP-1 Familie verhalten sich diesbezüglich ähnlich (Cynis et al., 2011). Der pGlu-Rest am N-Terminus von CCL2 beeinflusst jedoch nicht nur die Rezeptorbindung, sondern auch mögliche Mechanismen des Abbaus dieses Chemokins (Cynis et al., 2011). Die Spaltung im N-terminalen Bereich von CCL2 durch Matrix-Metalloproteasen ist ein Hauptweg der Inaktivierung des Chemokins. Dies ist unabhängig von der pGlu-Modifikation. Der nicht-modifizierte N-Terminus von CCL2 (Gln¹-CCL2) stellt eine mögliche Spaltstelle für Prolin-spezifische Proteasen wie Dipeptidyl-Peptidase 4 oder Aminopeptidase P dar. Beide Enzyme benötigen jedoch für die Substratbindung einen positiv geladenen (basischen) N-Terminus. Die Bildung von pGlu und der damit einhergehende Ladungsverlust sowie die strukturelle Veränderung verhindern daher die Spaltung durch diese Enzyme (Cynis et al., 2011). Im Gegensatz dazu wird der unprozessierte Präkursor Gln¹-CCL2 durch beide Proteasen als Substrat erkannt (Cynis et al., 2011). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass im Fall von CCL2 und vermutlich auch der anderen Chemokine der CCL2-Familie die Cyclisierung zur Stabilität bzw. zur Kanalisierung in spezifische Abbauege beiträgt, was eine Möglichkeit zur Regulation von Signalwegen darstellt.

Am Beispiel von CCL2, das ein Zielmolekül für die Wirkstoffentwicklung ist (siehe hierzu auch Kapitel 3), lassen sich somit zwei wesentliche Funktionen der N-terminalen pGlu-Modifikation ableiten:

1. die Stabilisierung gegenüber Abbau und dadurch die Verlängerung der Halbwertszeit im Organismus und
2. die Vermittlung bzw. Verstärkung der Interaktion von regulatorischen Peptiden mit deren Rezeptoren.

Diese grundlegenden Mechanismen spielen womöglich auch bei der Ausprägung der Toxizität von Amyloidpeptiden eine Rolle, wie in Kapitel 3 erläutert wird. Auf der Unterbindung der pGlu-Modifikation beruhen daher auch die therapeutischen Ansätze, die im Rahmen dieser Arbeit geprüft wurden. Grundlegendes Prinzip dabei ist die Unterdrückung der Wirkung der Peptide (bei CCL2 die Chemotaxis, bei pGlu-A β die Toxizität) durch eine gehemmte Bildung der posttranslationalen Modifikation oder der Bindung und Inaktivierung der modifizierten Peptide. Ersteres beruht auf Inhibitoren der Glutaminyl-Cyclasen, die im folgenden Teil dargelegt werden. Eine Alternative könnten monoklonale Antikörper darstellen, die spezifisch für die pGlu-Modifikation sind (Kapitel 5).

Zitierter Beitrag mit eigener Beteiligung³

Cynis H, Hoffmann T, Friedrich D, Kehlen A, Gans K, Kleinschmidt M, Rahfeld JU, Wolf R, Wermann M, Stephan A, Haegele M, Sedlmeier R, Graubner S, Jagla W, Müller A, Eichentopf R, Heiser U, Seifert F, Quax PH, de Vries MR, Hesse I, Trautwein D, Wollert U, Berg S, Freyse EJ, Schilling S*, Demuth HU. **The isoenzyme of glutaminy cyclase is an important regulator of monocyte infiltration under inflammatory conditions.** EMBO Mol Med 2011, 3, 545-58.

2.2 Untersuchungen zur nicht-enzymkatalysierten Bildung von Pyroglutamat

Bereits früh wurde gezeigt, dass insbesondere N-terminales Glutamin stark zur spontanen Deamidierung neigt (Gilbert et al., 1949). Die Instabilität spielt u.U. eine wichtige Rolle bei der Formulierung von Impfstoffen, da diese häufig über längere Zeit gelagert werden und eine Veränderung der Eigenschaften nicht erwünscht ist. Untersucht wurde dies z.B. bei Antikörpern, die ein N-terminales Glutamat aufweisen (Yu et al., 2006).

Da die spontane Cyclisierung eines Glutamylrestes der Bildung von pGlu-A β zugrunde liegen (siehe hierzu Kapitel 3) und man diesen Prozess nicht durch Enzyminhibitoren verlangsamen könnte, wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals ein quantitativer Vergleich der Zyklisierungsgeschwindigkeit von N-terminalen Glutamyl- und Glutaminylresten durchgeführt. Als Modellpeptid diente A β 3-6, abgeleitet vom Amyloidpeptid, das mit cyclisiertem N-Terminus im Hirn von Alzheimer-Patienten vorkommt (siehe hierzu auch Kapitel 3). Die nicht-enzymkatalysierte Bildung von Pyroglutamat aus N-terminalen Glutamin(yl)resten wurde in Lösung untersucht (Seifert et al., 2009; Seifert et al., 2015) (vgl. Abbildung 1). Dabei zeigte sich, dass die Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung der Zyklisierung von N-terminalen Glutaminylresten unter physiologischen pH-Bedingungen im Vergleich zu Glutamylresten 1- bis 2×10^3 -fach größer ist. Demzufolge lag die Halbwertszeit von L-Glutaminylpeptiden bei einigen Tagen, die von Glutamylpeptiden bei mehreren Jahren (Seifert et al., 2009).

Interessanterweise katalysieren Phosphationen die Zyklisierung von L-Glutaminylresten (Seifert et al., 2015). Die Halbwertszeit des Modellpeptides H-Gln-Phe-Ala-NH₂ sank von 29 Tagen in Abwesenheit von Phosphat auf 11 Stunden in 0,1 M Phosphatlösung bei pH 7,0 und 30°C. Die beachtliche katalytische Aktivität von Phosphationen ist offensichtlich auf eine Beschleunigung von Protonenübergängen zurückzuführen, die die Zyklisierungsreaktion (Bildung und/oder Zerfall des tetraedrischen Intermediats) limitieren. Dies ging aus der Ermittlung des Lösungsmittel-Isotopieeffektes (H₂O/D₂O) hervor, der in Abwesenheit von Phosphationen stark positiv war und mit steigender Phosphatkonzentration sank (Seifert et al., 2015). Möglicherweise ist die besondere Aktivität von Phosphat auf eine bispezifische

³ Bei den Zitaten am Ende eines Abschnittes sind korrespondierende(r) Autor(en) durch * gekennzeichnet. Gleichwertige Beiträge zur Publikation werden mit # kenntlich gemacht.

Katalyse zurückzuführen. Die Säure/Base Katalyse wird auch dadurch belegt, dass die katalytische Aktivität im Bereich des pK_{a2} von Phosphat (um pH 7,0) am höchsten ist (nicht publizierte Beobachtung).

Obleich die Bildung von pGlu-Peptiden im tierischen und pflanzlichen Organismus vermutlich überwiegend enzymkatalysiert abläuft, könnte insbesondere die spontane Cyclisierung von Glutamin dafür verantwortlich sein, dass die Deletion von Glutaminyl-Cyclasen in der Maus nicht zur Ausprägung von offensichtlichen phänotypischen Veränderungen führt (siehe hierzu Kapitel 2.3.4). Die im Vergleich zu Glutaminylresten deutlich langsamere Cyclisierung von N-terminalen Glutaminylresten legt nahe, dass der Anreicherung von pGlu-A β bei AD eine enzymkatalysierte Reaktion zugrunde liegt. Die Charakterisierung der dafür verantwortlichen Glutaminyl-Cyclasen ist Gegenstand der folgenden Abschnitte.

Zitierte Beiträge mit eigener Beteiligung

Seifert F, Schulz K, Koch B, Manhart S, Demuth HU*, Schilling S. **Glutaminyl cyclases display significant catalytic proficiency for glutamyl substrates.** *Biochemistry* 2009, 48, 11831-3.

Seifert F, Demuth HU, Weichler T, Ludwig HH, Tittmann K, Schilling S*. **Phosphate ions and glutaminyl cyclases catalyze the cyclization of glutaminyl residues by facilitating synchronized proton transfers.** *Bioorg Chem.* 2015, 60, 98-101.

2.3 Enzymkatalysierte Bildung von N-terminalem Pyroglutamat durch Glutaminyl-Cyclasen (QCs)

2.3.1 Pflanzliche und bakterielle Glutaminyl-Cyclasen (QCs)

Die Cyclisierung von N-terminalen Glutamin(yl)resten wird in Organismen durch QCs katalysiert (*Schilling et al., 2008a*). Die Enzyme beschleunigen die intramolekulare Cyclisierung von Glutamin durch nicht-kovalente Katalyse. Die QC der Pflanze *Carica papaya* ist die erste beschriebene QC (Messer, 1963). Das Enzym wurde aus dem Papainreichen Latex der Pflanze isoliert, welcher bei Verwundung abgegeben wird. Da das Sekret der Abwehr von pathogenen Mikroorganismen dient, wurde vermutet, dass die durch die QC freigesetzten Ammoniumionen diese Wirkung fördern (El Moussaoui et al., 2001).

Vor dem Hintergrund der Untersuchung der enzymkatalysierten Bildung von pGlu sowie der Testung von Inhibitoren der tierischen QCs wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch pflanzliche QCs isoliert und vergleichend charakterisiert (*Schilling et al., 2007a*). Aufgrund von Sequenzhomologie zur Papaya-QC wurden cDNAs mutmaßlicher QCs aus *Arabidopsis thaliana* und *Solanum tuberosum* isoliert. Die heterologe Expression in Hefe führte zur Isolation aktiver Enzyme. Der Nachweis von QC in anderen Pflanzen als *C. papaya* führte zur

Hypothese, dass der QC in Pflanzen auch eine andere Rolle als die der Ammoniumproduktion zukommt. In Anlehnung an die Funktion tierischer QCs (siehe hierzu den folgenden Abschnitt) wurde in Literatur- und Peptiddatenbanken nach pGlu-modifizierten Peptiden und Proteinen gesucht. Tatsächlich sind bereits zahlreiche pflanzliche Proteine beschrieben worden, welche einen N-terminalen pGlu-Rest aufweisen. Einige Hinweise legen nahe, dass die QC bei deren Bildung beteiligt sein könnte:

1. Zahlreiche der pGlu-Proteine, so z.B. das *Pathogenesis-related Protein 1* (PR1) und Chitinasen, werden bei Pathogenbefall exprimiert. Chitinasen befinden sich auch im Latex von *C. papaya*. Der pGlu-Rest am N-Terminus von PR1 ist offensichtlich konserviert (Schilling et al., 2007a).
2. Die QCs aller Pflanzen sowie auch die bisher bekannten pflanzlichen pGlu-Proteine werden sekretorisch exprimiert (Schilling et al., 2007a).
3. Erste Experimente mittels spezifischer Antikörper, welche gegen die QC aus Kartoffel gerichtet sind, weisen darauf hin, dass die QC bei Pathogenbefall induziert wird (nicht publiziert). Dies ist auch von den beschriebenen mutmaßlichen Substraten bekannt.
4. Die bisher untersuchten QCs weisen eine breite Substratspezifität auf (Schilling et al., 2003a; Schilling et al., 2007a). Eine Umsetzung verschiedener Substrate ist daher wahrscheinlich.

Strukturell stellen die pflanzlichen QCs eine eigene Klasse dar (Azarkan et al., 2005; Wintjens et al., 2006; Guevara et al., 2006). Konserviertes Merkmal ist ein β -Propeller, der aus 5 β -Faltblättern aufgebaut ist. Helikale Bereiche sind nur am N- bzw. C-Terminus vorzufinden. Im Zentrum des Propellers ist bei der Papaya-QC ein Metallion (Ca^{2+} oder Zn^{2+}) gebunden, welches jedoch nicht an der Katalyse beteiligt ist (siehe hierzu auch das folgende Kapitel 2.3.2 sowie Abbildung 3). Auf Basis der Primärstruktur der pflanzlichen QC konnten in zahlreichen Bakterien homologe Proteine identifiziert werden (Huang et al., 2010; Carrillo et al., 2010). Die Rolle dieser bakteriellen QCs ist jedoch noch ungeklärt. Ebenso scheint das Vorkommen von QCs in Bakterien, im Gegensatz zu Tieren und Pflanzen, weniger konserviert zu sein. Zudem weisen neueste Erkenntnisse darauf hin, dass in Bakterien auch QCs vorkommen können, die homolog zu den tierischen QCs sind (nicht publiziert). Da diese Enzyme in pathogenen Bakterien des Mundraumes vorkommen, wird deren Rolle zurzeit intensiv erforscht. Interessanterweise ist die katalytische Effizienz der bakteriellen QCs im Vergleich zu den homologen QCs der Säuger bzw. Pflanzen um 1-2 Größenordnungen niedriger (Schilling et al., 2003a; Schilling et al., 2005; Carrillo et al., 2010). Der

grundlegende Mechanismus der Katalyse ist bei tierischen, pflanzlichen und bakteriellen Glutaminyl-Cyclasen ähnlich (siehe dazu den folgenden Abschnitt).

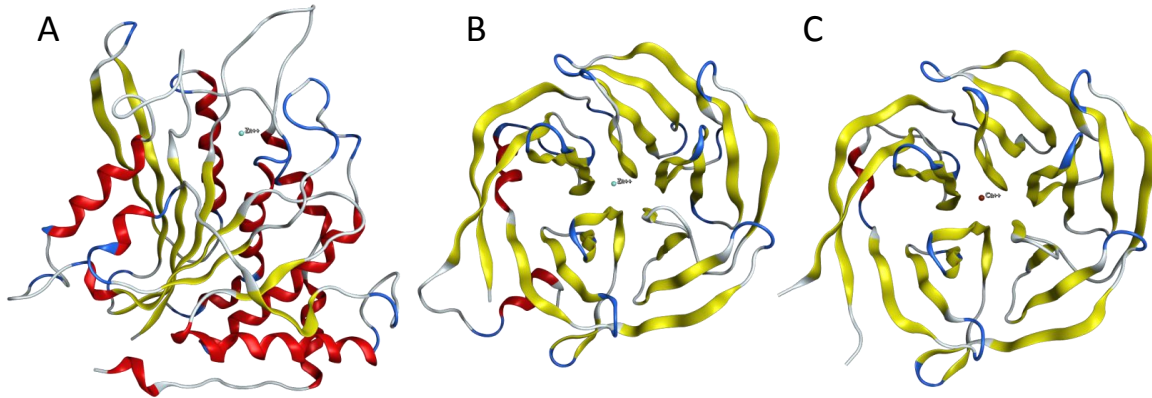


Abbildung 3: Strukturvergleich der menschlichen (A), einer pflanzlichen (B) und einer bakteriellen QC (C). Die Struktur der menschlichen QC (Typ 2; hier dargestellt ist pdb:3si0) ist derjenigen bakterieller Aminopeptidasen ähnlich (siehe auch Abbildung 4). Pflanzliche und bakterielle QCs (Typ 1) bilden eine eigene Strukturfamilie aus, hier dargestellt ist die QC aus *Carica papaya* (pdb:2faw) und aus *Zymomonas mobilis* (pdb:3nom). Das Zinkion der QCs der Säuger ist für die Enzymaktivität essentiell (siehe auch Abbildung 5). Die Metallionen der pflanzlichen und bakteriellen QCs haben vermutlich strukturelle Funktion (Quelle: www.rcsb.org).

Zitierte Beiträge mit eigener Beteiligung

Schilling S., Cynis H., von Bohlen A., Hoffmann T., Wermann M., Heiser U., Buchholz M., Zunkel K., and Demuth H. U.* **Isolation, catalytic properties, and competitive inhibitors of the zinc-dependent murine glutaminyl cyclase.** *Biochemistry* 2005, 44, 13415-13424.

Schilling S*, Stenzel I, von Bohlen A, Wermann M, Schulz K, Demuth HU, Wasternack C. **Isolation and characterization of the glutaminyl cyclases from *Solanum tuberosum* and *Arabidopsis thaliana*: implications for physiological functions.** *Biol Chem* 2007, 388, 145-53.

Schilling S*, Wasternack C, Demuth HU. **Glutaminyl cyclases from animals and plants: a case of functionally convergent protein evolution.** *Biol Chem* 2008, 389, 983-91.

Carrillo DR#, Parthier C#, Jänckel N, Grandke J, Stelter M, Schilling S, Boehme M, Neumann P, Wolf R, Demuth HU*, Stubbs MT*, Rahfeld JU. **Kinetic and structural characterization of bacterial glutaminyl cyclases from *Zymomonas mobilis* and *Myxococcus xanthus*.** *Biol Chem* 2010, 391, 1419-28.

2.3.2 Tierische und menschliche Glutaminyl-Cyclasen – Struktur und Funktion

Im Unterschied zu den pflanzlichen QCs (auch als Typ 1 bezeichnet) bilden die Enzyme tierischen Ursprungs (Typ 2) keine eigenständige Strukturfamilie (Huang et al., 2005; Wintjens et al., 2006). Offensichtlich entwickelten sich die tierischen QCs aus Zink-abhängigen bakteriellen Aminopeptidasen (Schilling et al., 2003b; Booth et al., 2004; Schilling et al., 2008a). Abgeleitet wurde dies aus der Konservierung der Zink-bindenden Reste des aktiven Zentrums sowie der generell ähnlichen Topologie der Faltung (Abbildung 4). Strukturmerkmal der tierischen QCs ist ein zentrales β -Faltblatt, das von α -Helices

umgeben ist (siehe auch Abbildung 3). Das aktive Zentrum wird durch flexible *loop*-Bereiche geformt, das für die Katalyse essentielle Zn^{2+} -Ion wird durch einen His-, einen Asp- und einen Glu-Rest komplexiert (Huang et al., 2005; Ruiz-Carrillo et al., 2011). Die QCs vom Typ 2 und Typ 1 unterscheiden sich daher nicht nur strukturell, sondern auch in Bezug auf Komponenten der Katalyse.

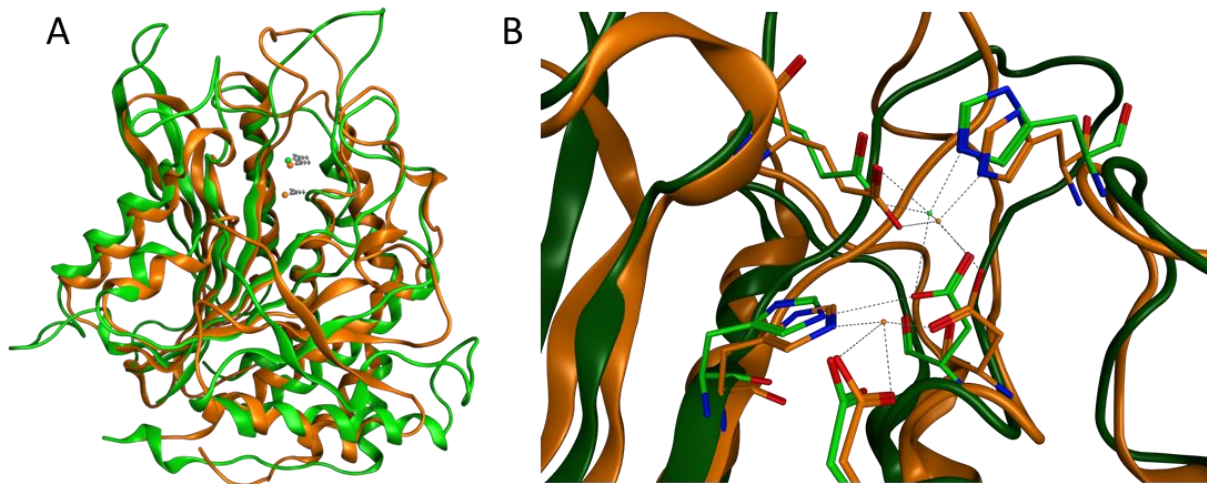


Abbildung 4: Vergleich der Struktur der menschlichen QC (grün) und der bakteriellen Aminopeptidase aus *Aeromonas proteolytica* (orange). Obgleich beide Enzyme eine Sequenzidentität von nur 15% aufweisen, zeigen sowohl die α/β -globuläre Struktur (A) als auch die aktiven Zentren sehr hohe Homologie (B). Im Gegensatz zur QC binden die Aminopeptidasen zwei Zinkionen im aktiven Zentrum. Vermutlich hatten beide Enzyme einen gemeinsamen Vorläufer (Quelle: www.rcsb.org).

Interessanterweise zeigen die menschliche QC und die QCs der Pflanzen jedoch eine ähnliche katalytische Effizienz (Schilling et al., 2003a; Schilling et al., 2005; Schilling et al., 2007a; Schilling et al., 2008a). Dies liegt wahrscheinlich in grundlegend ähnlichen Mechanismen der Katalyse begründet (Abbildung 5). Prinzipiell beruht die Beschleunigung der intramolekularen Cyclisierung auf zwei wesentlichen Prozessen (Schilling et al., 2008a):

1. Die γ -Carbonylgruppe des N-terminalen Gln-Restes wird durch eine Lewis-Säure polarisiert und stabilisiert das gebildete tetraedrische Intermediat.
2. Ein Glutamatrest katalysiert den Protonenübergang von der angreifenden Aminogruppe auf den abzuspaltenden Stickstoff.

Die QCs vom Typ 1 und 2 unterscheiden sich essentiell in der Art der Lewis-Säure, welche in den tierischen QCs das katalytische Zinkion (Schilling et al., 2003b), in den pflanzlichen QCs wahrscheinlich ein Lysylrest ist (Wintjens et al., 2006). Demzufolge übernimmt das Metallion eine ähnliche Aufgabe wie bei den verwandten bakteriellen Aminopeptidasen. Auch hier

polarisiert ein Zinkion die zu spaltende Peptidbindung (Lipscomb und Strater, 1996). Das Zinkion im aktiven Zentrum besitzt, zumindest in einigen Fällen, jedoch auch die Funktion der Strukturstabilisierung des Enzyms. Untersuchungen am Apoenzym einer Drosophila-QC haben gezeigt, dass die Entfernung des Zinkions mit einer partiellen Entfaltung einhergeht. Dies wurde bei der menschlichen QC nicht beobachtet (Koch *et al.*, 2012). Ein weiteres strukturbildendes Element der QCs der Säuger ist eine konservierte Disulfidbrücke. Diese scheint - im Gegensatz zu einer initialen Vermutung (Schilling *et al.*, 2002) - nicht essentiell für die Ausbildung der katalytisch aktiven Struktur zu sein, stabilisiert das Protein jedoch gegenüber thermisch und chemisch induzierter Entfaltung (Ruiz-Carrillo *et al.*, 2011).

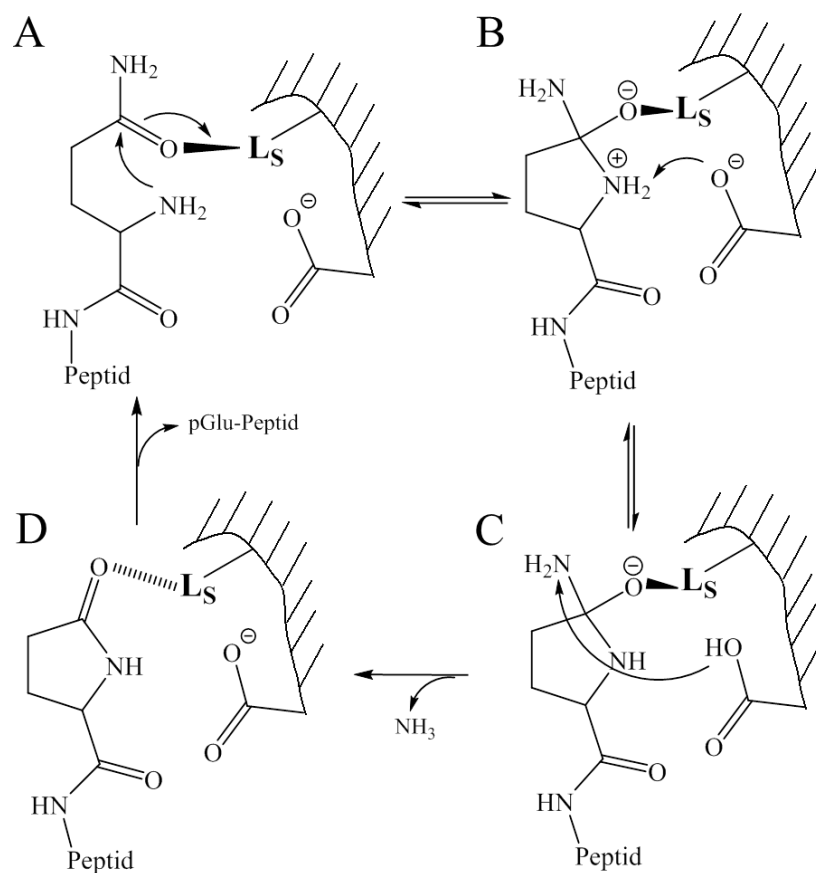


Abbildung 5: Katalytischer Mechanismus von QCs des Typs 1 und 2. Obgleich die Proteine keine strukturelle Homologie aufweisen, sind die katalytischen Mechanismen grundsätzlich ähnlich. Ein essentieller Unterschied besteht jedoch in Bezug auf die Lewis-Säure (L_s), welche die Carbonylgruppe polarisiert und das tetraedrische, enzymgebundene Intermediat stabilisiert: Bei QCs des Typs 2 (z.B. Säuger-QC) ist dies ein Zinkion, bei den QCs des Typs 1 ein Lysinrest. Ein Glutamyrest (hier nur die Carboxygruppe dargestellt) beschleunigt die Übertragung eines Protons auf die Abgangsgruppe (Ammoniak/Ammoniumion) (Schilling *et al.*, 2008a).

Zitierte Beiträge mit eigener Beteiligung

Schilling S., Cynis H., von Bohlen A., Hoffmann T., Wermann M., Heiser U., Buchholz M., Zunkel K., and Demuth H. U.* **Isolation, catalytic properties, and competitive inhibitors of the zinc-dependent murine glutaminyl cyclase.** *Biochemistry* 2005, 44, 13415-13424.

Schilling S*, Stenzel I, von Bohlen A, Wermann M, Schulz K, Demuth HU, Wasternack C. **Isolation and characterization of the glutaminyl cyclases from *Solanum tuberosum* and *Arabidopsis thaliana*: implications for physiological functions.** *Biol Chem* 2007, 388, 145-53.

Schilling S*, Wasternack C, Demuth HU. **Glutaminyl cyclases from animals and plants: a case of functionally convergent protein evolution.** *Biol Chem* 2008, 389, 983-91.

Ruiz-Carrillo D, Koch B, Parthier C, Wermann M, Dambe T, Buchholz M, Ludwig HH, Heiser U, Rahfeld JU, Stubbs MT*, Schilling S*, Demuth HU. **Structures of glycosylated mammalian glutaminyl cyclases reveal conformational variability near the active center.** *Biochemistry* 2011, 50, 6280-8.

Koch B, Kolenko P, Buchholz M, Carrillo DR, Parthier C, Wermann M, Rahfeld JU, Reuter G, Schilling S*, Stubbs MT*, Demuth HU. **Crystal structures of glutaminyl cyclases (QCs) from *Drosophila melanogaster* reveal active site conservation between insect and mammalian QCs.** *Biochemistry* 2012, 51, 7383-92.

2.3.3 Isolation von Isoenzymen der tierischen Glutaminyl-Cyclasen (iso-Glutaminyl-cyclase, isoQC)

Im Rahmen der Wirkstoffentwicklung (siehe hierzu auch das folgende Kapitel 3) wurden zahlreiche Inhibitoren dargestellt, welche die humane QC kompetitiv hemmen (*Buchholz et al., 2006; Buchholz et al., 2009; Ramsbeck et al., 2013*). Die Untersuchungen zur Wirkung von QC-Inhibitoren in verschiedenen Tiermodellen der Alzheimer-Krankheit machten die Isolation von QCs der Modellorganismen sowie deren enzymatische Charakterisierung erforderlich. Insbesondere sollte geklärt werden, ob die Inhibitoren auch die QCs der Modellorganismen hemmen. Dies war vor allem im Fall der Invertebraten-Tiermodelle bedeutsam, da es möglich erschien, dass diese QCs keine stark ausgeprägte Homologie zur menschlichen QC aufwiesen. Vor dem Hintergrund dieser Aufgabenstellung konnten in der Taufliege *Drosophila melanogaster* erstmals Invertebraten-QCs nachgewiesen werden (*Schilling et al., 2007b*). Interessanterweise ergaben diese Untersuchungen, dass im Genom von *Drosophila* mehrere Gene vorkommen, die eine QC codieren könnten. Die heterologe Expression der entsprechenden cDNAs ergab, dass die Gene CG32412 (DromeQC) und CG5976 (isoDromeQC) aktive QCs der Fliege codieren. Dabei weist DromeQC wie die QCs der Säuger und Pflanzen eine N-terminale Signalsequenz auf, die den Transport ins ER vermittelt. Zwei Transkripte werden aus CG5976 gebildet, eines der beiden codiert eine mitochondriale QC (*Schilling et al., 2007b*). Die homologe Expression der cDNA in *Drosophila* S2-Zellen bestätigte die Sezernierung von DromeQC und die mitochondriale Lokalisation eines der von CG5976 (isoDromeQC) abgeleiteten Proteine. Die enzymatische Aktivität der heterolog exprimierten QCs aus *Drosophila* war niedriger als die von QC aus Maus oder Mensch (*Schilling et al., 2007b*). DromeQC zeigte eine etwas anders geartete pH-Abhängigkeit der Katalyse, was durch ein sehr schmales pH-Optimum zwischen 7-7,5

gekennzeichnet war (Schilling *et al.*, 2007b). Die pH-Abhängigkeit von isoDromeQC war hingegen zu der von Maus-QC nahezu identisch. Die Untersuchungen an *Drosophila* wiesen erstmals auf das Vorkommen mehrerer Gene in einem Organismus hin, welche für eine QC codierten. Die Sequenzidentität von ca. 40% und die sehr ähnlichen enzymatischen Eigenschaften der *Drosophila*-QC-Isoformen legten dabei nahe, dass die Lokalisation von DromeQC und isoDromeQC in verschiedenen Kompartimenten unterschiedliche physiologische Funktionen widerspiegeln (Schilling *et al.*, 2007b).

In der Folge konnte auch ein Isoenzym in Mensch und Maus nachgewiesen werden (Cynis *et al.*, 2008a). QC (Genbezeichnung QPCT) und isoQC (Genbezeichnung QPCTL) sind, wie die Gene der QCs aus *Drosophila*, auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert. Die isoQC weist eine Sequenzidentität von ca. 40% gegenüber der QC aus Mensch und Maus auf. Wesentliche Sequenzunterschiede sind im N-terminalen Bereich beider Enzyme zu finden (Cynis *et al.*, 2008a). Sequenzanalysen zeigten, dass der N-Terminus eine Membranbindung von isoQC vermitteln und als Signalanker fungieren könnte. Die Expression der isoQC-cDNA und die anschließende Fraktionierung bestätigten diese Theorie. Diese Analysen wiesen auch darauf hin, dass der N-Terminus für die Membranbindung und die Retention des Proteins im Golgi-Apparat verantwortlich ist (Cynis *et al.*, 2008a). In einer folgenden Arbeit wurde isoQC heterolog in der Hefe *Pichia pastoris* exprimiert (Stephan *et al.*, 2009). Bereits in früheren Untersuchungen wurde diese Hefe erfolgreich zur Isolation von QC eingesetzt (Schilling *et al.*, 2002). Im Unterschied zur QC weist isoQC jedoch keine N-Glykosylierung auf. Dies führte dazu, dass das Protein nur sehr schwach exprimiert bzw. in das Medium der Hefe sezerniert wurde (bei der Expression wurde der N-terminale Signalanker nicht berücksichtigt). In der Folge konnte die Expressionsrate jedoch deutlich gesteigert werden, indem eine N-Glykosylierungsstelle eingeführt sowie ein freier Cysteinrest im C-terminalen Bereich des Enzymes durch Serin ausgetauscht wurde. Die isoQC aus Maus wurde auf die gleiche Weise exprimiert, jedoch war der Austausch des C-terminalen Cysteinrestes nicht notwendig, da an dieser Position natürlicherweise ein Serylrest vorkommt. Die isolierten isoQC-Enzyme menschlichen und murinen Ursprungs wiesen im Vergleich zur QC eine sehr ähnliche Substratspezifität auf (Stephan *et al.*, 2009). Die zwischen den QC-Isoformen konservierten Cysteine bilden eine intramolekulare Disulfidbrücke aus. Sowohl isoQC als auch QC binden ein Zinkion im aktiven Zentrum. Dies konnte mittels Röntgenfluoreszenz-Untersuchungen nachgewiesen werden (Stephan *et al.*, 2009).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals QC-Isoenzyme in Arthropoden und Säugern nachgewiesen und isoliert. Deren enzymatische Eigenschaften sind sehr ähnlich, jedoch

zeigen sich Unterschiede in der Kompartimentierung der Proteine innerhalb der Zelle. Diese Unterschiede sind offensichtlich für eine differentielle Substratumsetzung *in vivo* verantwortlich. Die Untersuchungen hierzu wurden maßgeblich durch die Entwicklung von QC- und isoQC-*knockout* Mäusen vorangetrieben, sie werden im folgenden Abschnitt abgehandelt.

Zitierte Beiträge mit eigener Beteiligung

Buchholz M, Heiser U*, Schilling S, Niestroj AJ, Zunkel K, Demuth HU. **The first potent inhibitors for human glutaminyl cyclase: synthesis and structure-activity relationship.** J Med Chem 2006, 49, 664-677.

Schilling S, Lindner C, Koch B, Wermann M, Rahfeld JU, von Bohlen A, Rudolph T, Reuter G, Demuth HU*. **Isolation and characterization of glutaminyl cyclases from *Drosophila*: evidence for enzyme forms with different subcellular localization.** Biochemistry 2007, 46, 10921-30.

Cynis H, Rahfeld JU, Stephan A, Kehlen A, Koch B, Wermann M, Demuth HU*, Schilling S. **Isolation of an isoenzyme of human glutaminyl cyclase: retention in the Golgi complex suggests involvement in the protein maturation machinery.** J Mol Biol 2008, 379, 966-80.

Stephan A, Wermann M, von Bohlen A, Koch B, Cynis H, Demuth HU, Schilling S*. **Mammalian glutaminyl cyclases and their isoenzymes have identical enzymatic characteristics.** FEBS J 2009, 276, 6522-36.

Buchholz M, Hamann A, Aust S, Brandt W, Böhme L, Hoffmann T, Schilling S, Demuth HU, Heiser U*. **Inhibitors for human glutaminyl cyclase by structure based design and bioisosteric replacement.** J Med Chem 2009, 52, 7069-7080.

2.3.4 Zusammenhang zwischen Lokalisation von Glutaminyl-Cyclase und iso-Glutaminyl-Cyclase sowie deren Substratumsetzung in der Zelle

Die Isolation von isoQC aus Mensch und Maus warf die Frage auf, ob QC und isoQC ein Beispiel biologischer Redundanz darstellen oder ob die Isoenzyme verschiedene physiologische Funktionen erfüllen. Eine Untersuchung der Gewebespezifität wies darauf hin, dass QC und isoQC zwar ubiquitär exprimiert werden, die QC jedoch in neuronalem Gewebe und sekretorisch aktiven Zellen sehr stark exprimiert wird. Demgegenüber wird isoQC weitgehend ähnlich in vielen verschiedenen Geweben gebildet (Cynis *et al.*, 2008a). Dieses Expressionsmuster könnte mit der Umsetzung verschiedener Substrate in Verbindung stehen. Bereits in früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass die QC aus Rind mit pGlu-Hormonen im Hypothalamus colokalisiert ist (Bockers *et al.*, 1995). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Mäuse generiert, bei denen ein Teil des QPCT-Gens mittels homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen zerstört wurde (*knockout*) (Schilling *et al.*, 2011). Die Mäuse zeigen eine verringerte QC-Aktivität im Hirngewebe, nicht jedoch in peripheren Organen wie Leber oder Milz, was vermutlich auf die isoQC zurückzuführen ist (Schilling *et al.*, 2011). Eine QC-Aktivität war im Blutplasma homozygoter ko-Tiere nicht mehr nachweisbar, was durch die subzelluläre Lokalisation von isoQC und QC erklärt werden kann, da die QC sezerniert, die isoQC jedoch im Golgi-Apparat zurückgehalten wird (Cynis *et al.*, 2008a). Ein Gendosis-abhängiger Verlust von QC im Medium von primären Astrocyten

und Neuronen konnte nachgewiesen werden. Der *knockout* von QC hatte keine offensichtlichen Auswirkungen auf die Vitalität der Tiere, was u.a. mittels vollautomatisierter Ganztagsüberwachung (*home cage phenotyping*) sowie motorischer und kognitiver Tests festgestellt wurde (Schilling et al., 2011).

Da die QC sehr stark im Hypothalamus, dem Bildungsort der pGlu-Hormone GnRH und TRH, exprimiert wird, konzentrierten sich die Untersuchungen auf die Funktion der hypophysalen Regelkreisläufe. Der hypophysale-gonadale Kreislauf (HPG-Achse) wird durch das Hypothalamushormon GnRH gesteuert, welches am N-Terminus einen für die Aktivität essentiellen pGlu-Rest aufweist (Sealfon et al., 1997). GnRH bewirkt die Freisetzung von LH und FSH aus der Hypophyse, welche wiederum die Produktion der Sexualhormone in den Gonaden stimulieren. Der Testosteronspiegel⁴ wies keine Unterschiede zwischen QC^{-/-} und QC^{+/+}-Tieren⁵ auf. Offensichtlich ist die HPT-Achse von einem *knockout* der QC nicht beeinträchtigt, da die QC^{-/-}-Tiere fertil waren. Ein Verlust des Hormons GnRH würde zur Infertilität führen, wie an GnRH-defizienten Mäusen gezeigt wurde (Mason et al., 1986).

Im Gegensatz zum Testosteron war die Konzentration des Schilddrüsenhormons T4 (Thyroxin) im Plasma von QC^{-/-}-Tieren um ca. 25% reduziert (Schilling et al., 2011). Die Freisetzung von T4 wird über die vom Hypothalamushormon TRH regulierte HPT-Achse gesteuert. TRH, ein pGlu-Hormon, stimuliert die Sezernierung von TSH aus der Hypophyse, TSH wiederum bewirkt die Freisetzung von T4 aus der Schilddrüse. Ein *knockout* von TRH führt in Mäusen zu einem starken Anstieg der TSH-Konzentration und einem Abfall der T4-Konzentration im Plasma. Darüber hinaus weisen diese Tiere einen erhöhten Glucosespiegel im Serum auf und zeigen eine signifikant beeinträchtigte Glucosetoleranz (Yamada et al., 1997; Yamada et al., 2003). Im Vergleich hierzu zeigen die QC^{-/-}-Tiere eine abgeschwächte Hypothyreose, der TSH-Spiegel war in männlichen Tieren unverändert, eine Glucoseintoleranz lag nicht vor (Schilling et al., 2011).

Die scheinbare Diskrepanz zwischen den Ergebnissen zur HPT und HPG Achse, d.h. der Rolle von QC für die Funktion von GnRH und TRH, könnte mit der Reifung der beiden Peptidhormone in Neuronen des Hypothalamus zusammenhängen. Sowohl TRH als auch GnRH werden reguliert sezerniert. Die Hormone werden als Präkursoren gebildet und im sekretorischen Weg durch limitierte Proteolyse prozessiert (Nillni et al., 1993; Friedman et al., 1995; Cruz und Nillni, 1996; Wetsel und Srinivasan, 2002). Die reifen, N-terminal pGlu-

⁴ Die Untersuchung der HPG-Achse erfolgt an männlichen Mäusen, da Testosteron geringeren Schwankungen unterliegt als die Sexualhormone weiblicher Tiere.

⁵ Erklärung zum Genotyp: QC^{+/+} - Wildtyp; QC^{-/-} - homozygoter *knockout*

modifizierten Peptide werden auf einen Stimulus hin von den Zellen in die Blutbahn abgegeben. Im Unterschied zu TRH unterliegt der N-Terminus von GnRH jedoch nicht einer Spaltung durch Prohormon-Konvertasen, d.h. der Glutaminyl-Präkursor wird bereits im Endoplasmatischen Retikulum (ER) gebildet. Der N-Terminus von GnRH könnte daher im Prozess der Sezernierung auch durch isoQC, die im Golgi-Apparat vorkommt, cyclisiert werden. Im Gegensatz hierzu wird der Präkursor von TRH durch Prohormon-Konvertasen im trans-Golgi und sekretorischen Vesikeln gespalten und der Glutaminylrest hier für die Cyclisierung durch QC bereitgestellt. Die isoQC kann aufgrund der Kompartimentierung im Golgi-Apparat TRH nicht vollständig umsetzen, es kommt zur verringerten Bildung von pGlu-TRH und dadurch zum Phänotyp der milden Hypothyreose (*Schilling et al., 2011*).

In Analogie zu TRH scheinen auch Substrate zu existieren, die primär durch isoQC umgesetzt werden. IsoQC *knockout* Mäuse wurden mittels ENU-Mutagenese erzeugt und charakterisiert (*Cynis et al., 2011; Becker et al., 2016*). IsoQC^{-/-}-Tiere sind fertil und zeigen keine offenkundigen phänotypischen Veränderungen. Die QC-Aktivität ist in allen untersuchten Organen abgesenkt, insbesondere in Leber und Milz. Die hauptsächliche Präsenz von isoQC war bereits aus der Charakterisierung der QC^{-/-}-Mäuse abgeleitet worden (s.o.). Weder die HPT- noch die HPG-Achse waren vom *knockout* der isoQC betroffen. Die Bildung der Hypothalamushormone GnRH und TRH ist deshalb offenbar unverändert (*Becker et al., 2016*). Die Untersuchungen weisen jedoch darauf hin, dass die Reifung von pGlu-CCL2 (MCP-1), dem zuvor bereits beschriebenen Chemokin (siehe Kapitel 2.1), in isoQC^{-/-}-Tieren beeinträchtigt ist. Mittels spezifischer ELISAs konnte bei Modellen der LPS-induzierten Neuroinflammation und der Thioglycollat-induzierten Peritonitis gezeigt werden, dass die Bildung von pGlu-CCL2 unterdrückt wird (*Cynis et al., 2011*). In der Folge ist z.B. die Einwanderung von Monocyten in den Bauchraum der Mäuse stark abgeschwächt, eine Wirkung, die die Hemmung von isoQC für therapeutische Anwendungen interessant macht (siehe hierzu Kapitel 3.3). Ein *knockout* von QC beeinflusst die Bildung von CCL2 jedoch nicht (*Cynis et al., 2011*). Dies konnte auch in primären Neuronen – Zellen, welche sowohl QC als auch isoQC exprimieren – gezeigt werden (*Becker et al., 2016*). Offensichtlich spielt QC bei der Chemokinreifung eine untergeordnete Rolle und die Depletion von isoQC kann nicht kompensiert werden. Das könnte auf eine geringe Expression von QC in den jeweiligen Epithelzellen des Peritoneums zurückzuführen sein, ist aber offensichtlich auch durch die Kompartimentierung von QC und isoQC bedingt. Wie beim GnRH entsteht der Glutaminyl-Präkursor von CCL2 bereits nach Spaltung durch Signalpeptidase im ER. CCL2 kann daher durch isoQC umgesetzt werden. Dies geschieht selbst in QC-exprimierenden Neuronen

offenbar ausschließlich durch isoQC (*Becker et al., 2016*). Ursache hierfür könnte sein, dass CCL2 konstitutiv sezerniert wird und nicht - wie z.B. TRH - in Vesikel zur regulierten Sezernierung „verpackt“ wird, in denen QC in hoher Konzentration vorzufinden ist.

Die Ergebnisse, die im Wesentlichen auf Untersuchungen an QC- und isoQC-*knockout* Mäusen beruhen, weisen darauf hin, dass QC und isoQC *in vivo* bestimmte Substrate präferentiell umsetzen. Dies ist nicht durch unterschiedliche enzymatische Eigenschaften bedingt, sondern wird vielmehr durch verschiedene Mechanismen der Prozessierung der Substrate innerhalb der Zelle, verbunden mit der subzellulären Kompartimentierung von QC und isoQC, verursacht. Die daraus abgeleitete Theorie der Substratumsetzung ist in Abbildung 6 zusammengefasst. Dies hat auch Auswirkungen auf die Entwicklung von Inhibitoren der QC als Wirkstoffe, da eine unterschiedlich starke Hemmung von QC und isoQC die Reifung verschiedener pGlu-Peptide beeinflussen könnte.

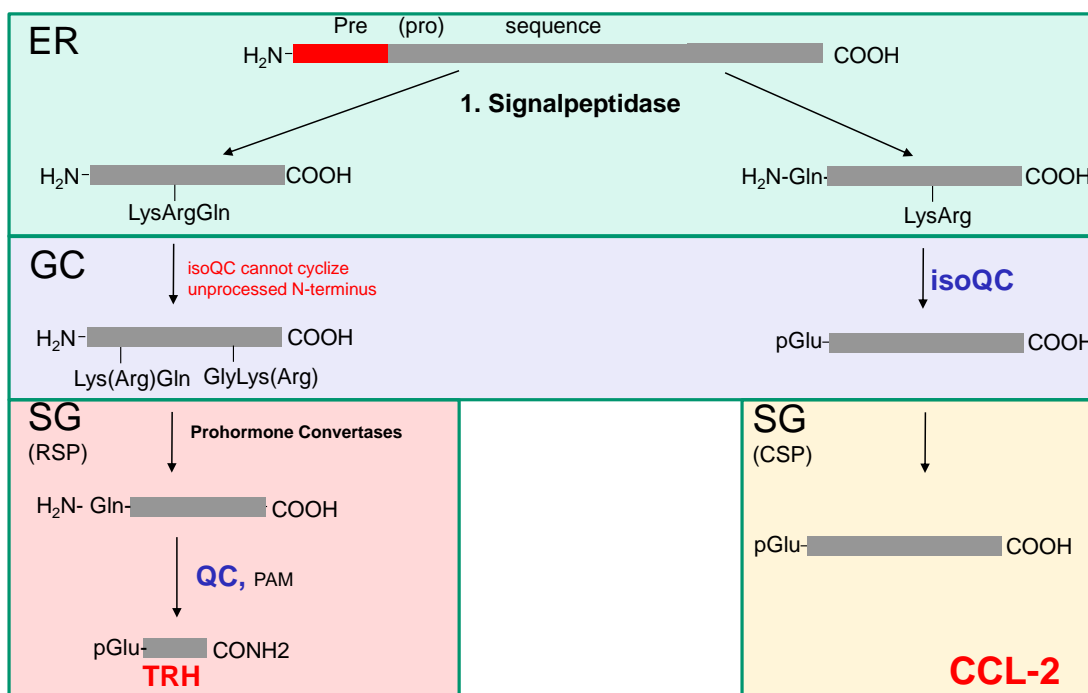


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Zusammenhangs von Prozessierung der Peptidsubstrate und Umsetzung durch QC bzw. isoQC in der Säugerzelle (aus *Becker et al., 2016*). Sekretorische Peptide werden co-translational in das ER transportiert, wobei das N-terminale Signalpeptid (rot) abgespalten wird. Daraufhin erfolgt der Transport der Peptide bzw. Proteine in den Golgi-Apparat (GC), in dem sich isoQC befindet. Die Substrate, deren N-terminaler Glutaminylrest bereits durch Signalpeptidase freigesetzt wurde, werden durch isoQC in das pGlu-Produkt überführt (hier am Beispiel von CCL2 gezeigt) und z.T. über den *constitutive secretory pathway* (CSP) ausgeschleust. Zahlreiche Substrate, insbesondere die Präkursoren von Peptidhormonen wie TRH, werden jedoch erst in sekretorischen Vesikeln (SG) des *regulated secretory pathway*

(RSP) durch Prohormon-Konvertasen prozessiert und die pGlu-Präkursoren generiert. Diese Hormon-Vorläufer werden durch QC umgesetzt. Viele dieser Hormone werden auch durch die Aktivität der *Peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase* (PAM) C-terminal amidiert.

Zitierte Beiträge mit eigener Beteiligung

Cynis H, Rahfeld JU, Stephan A, Kehlen A, Koch B, Wermann M, Demuth HU*, Schilling S. **Isolation of an isoenzyme of human glutaminyl cyclase: retention in the Golgi complex suggests involvement in the protein maturation machinery.** J Mol Biol 2008, 379, 966-80.

Schilling S#*, Kohlmann S#, Baeuscher C#, Sedlmeier R, Koch B, Eichentopf R, Becker A, Cynis H, Hoffmann T, Berg S, Freyse EJ, von Hoersten S, Rossner S, Graubner S*, Demuth HU. **Glutaminyl cyclase (QC) knock out mice show mild hypothyroidism but absence of hypogonadism: implications for enzyme function and drug development.** J Biol Chem 2011, 286, 14199-208.

Cynis H, Hoffmann T, Friedrich D, Kehlen A, Gans K, Kleinschmidt M, Rahfeld JU, Wolf R, Wermann M, Stephan A, Haegele M, Sedlmeier R, Graubner S, Jagla W, Müller A, Eichentopf R, Heiser U, Seifert F, Quax PH, de Vries MR, Hesse I, Trautwein D, Wollert U, Berg S, Freyse EJ, Schilling S*, Demuth HU. **The isoenzyme of glutaminyl cyclase is an important regulator of monocyte infiltration under inflammatory conditions.** EMBO Mol Med 2011, 3, 545-58.

Becker A#, Eichentopf R#, Sedlmeier R, Waniek A, Cynis H, Koch B, Stephan A, Baeuscher C, Kohlmann S, Hoffmann T, Kehlen A, Berg S, Freyse EJ, Osmand A, Plank AC, Roßner S, von Hörsten S, Graubner S, Demuth HU, Schilling S*. **IsoQC (QPCTL) knock-out mice suggest differential substrate conversion by glutaminyl cyclase isoenzymes.** Biol Chem 2016, 397, 45–55.

2.3.5 Das Golgi-Phosphoprotein 3 (GOLPH3) vermittelt die Retention von iso-Glutaminyl-Cyclase (isoQC) im Golgi-Apparat

Da die Lokalisation von QC und isoQC offensichtlich bei der Substratumsetzung innerhalb der Zelle eine wichtige Rolle spielt, sollte untersucht werden, wie es zur Retention von isoQC im Golgi-Apparat kommt. Die vorangegangenen Untersuchungen wiesen bereits darauf hin, dass der N-terminale Signalanker für den Verbleib im Golgi-Apparat verantwortlich ist. Jedoch war unklar, auf welchem Mechanismus dies beruhte.

In Bezug auf die Lokalisation zeigt isoQC interessante Parallelen zu Glykosyltransferasen. Diese Klasse von Enzymen ist ebenfalls im Golgi-Apparat vorzufinden und katalysiert die Glykosylierung von Proteinen (Paulson und Colley, 1989). Im Unterschied zu anderen Proteinen, die z.B. im ER zurückgehalten werden (Munro und Pelham, 1987), besitzen Glykosyltransferasen kein einheitliches Retentionssignal (Colley, 1997; Fenteany und Colley, 2005). Als Ursache für die Verhinderung des Transports an die Plasmamembran werden verschiedene Mechanismen diskutiert. Bei einem Teil der Proteine wird vermutet, dass sie aufgrund der Membranzusammensetzung (Patterson et al., 2008) und der Beschaffenheit der Transmembransequenz nicht zur Plasmamembran transportiert werden (Munro, 1995). Bei Glykosyltransferasen wurden aber auch luminale Bestandteile für die Retention, vermutlich aufgrund von Interaktionen mit anderen Proteinen, verantwortlich gemacht (Munro, 1995). Bei der Bäckerhefe konnte eine in Glykosyltransferasen für die Retention im Golgi-Apparat verantwortliche cytosolische Konsensussequenz identifiziert werden (Tu et al., 2008). Das Sequenzmotiv [F/L]-[L/I/V]-X-X-[R/K] ist in zahlreichen Typ2-Transmembranproteinen

konserviert. Es wird durch das cytosolische Protein VPS74 gebunden (Schmitz et al., 2008). Diese Interaktion führt offenbar zur Hemmung des Transports in andere Kompartimente bzw. an die Zelloberfläche und somit zum Verbleib der entsprechenden Proteine im Golgi-Apparat. Eine Untersuchung des N-Terminus der menschlichen isoQC wies interessanterweise darauf hin, dass die Sequenz der Hefe auch hier vorkommt (*Stephan et al., in Vorbereitung*). Ein Austausch der konservierten Aminosäuren durch Alanylreste bewirkte einen Transport von isoQC bzw. isoQC-GFP-Proteinen an die Zelloberfläche und eine Abgabe in das Medium, wie mittels Fluoreszenzmikroskopie, Durchflusszytometrie und Enzymaktivitätstest belegt werden konnte. Offensichtlich kommt es auch in humanen Zellen zu einer Interaktion des N-Terminus mit GOLPH3, dem orthologen Protein von VPS74, was mittels co-Immunpräzipitation von isoQC und GOLPH3 sowie GOLPH3 und Peptidfragmenten gezeigt wurde. Das Motiv wurde auch in Glykosyltransferasen wie der GNTIX identifiziert. Auch hier war eine Bindung an GOLPH3 nachweisbar. Vorangegangene Untersuchungen konnten eine Interaktion von GOLPH3 mit Glykosyltransferasen des Golgi-Apparates nicht belegen⁶ (Dippold et al., 2009). Vielmehr wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass GOLPH3 an Phosphatidylinositol-4-Phosphat (PI4P) bindet. Diese Bindung und die Vernetzung mit Proteinen des Cytoskeletts der Zelle scheinen für die Ausprägung der Morphologie sowie der Funktion des Golgi-Apparates mit verantwortlich zu sein (Wood et al., 2009). Die hier erhaltenen Ergebnisse zur Bindung von GOLPH3 an isoQC stehen jedoch nicht im Widerspruch zur Wechselwirkung von GOLPH3 mit PI4P. *Molecular modeling*-Untersuchungen lassen den Schluss zu, dass die Interaktionsstelle des GOLPH3-Dimers mit PI4P nicht mit derjenigen von GOLPH3 und den Golgi-Proteinen übereinstimmt (*Stephan et al., in Vorbereitung*). Daraus abgeleitet könnte GOLPH3 eine duale Adapterfunktion zukommen, die auf der Vernetzung von Lipiden der Membran mit Proteinen des Golgi-Apparates wie QC oder Glykosyltransferasen und dem Zytoskelett der Zelle beruht. Die Untersuchungen zur isoQC legen nahe, dass die Interaktion von GOLPH3 mit dem cytosolischen Teil von Proteinen eine Retention im Golgi-Apparat vermitteln kann. Dieser Mechanismus ist jedoch nicht ausschließlich für den Verbleib von Proteinen im Golgi-Apparat verantwortlich, da zahlreiche Glykosyltransferasen das Retentionssignal nicht aufweisen. Basierend auf einer gemeinsamen Lokalisation in der Zelle bildet die isoQC zusammen mit Glykosyltransferasen im Golgi-Apparat eine Umgebung zur posttranslationalen Reifung von Proteinen aus (*Stephan et al., in Vorbereitung*).

⁶ Die in der Studie von Dippold et al. untersuchten Glykosyltransferasen wiesen das VPS74- Konsensussignal nicht auf.

Zitierter Beitrag mit eigener Beteiligung

Stephan A, Jäger C, Schlenzig D, Buchholz M, Reimann A, Wermann M, Ludwig HH, Kehlen A, Scheel E, Klose C, Roßner S, Cynis H, Schilling S*. **Evidence for Involvement of GOLPH3 in Golgi Retention of a Human Glutaminyl Cyclase.** in Vorbereitung

3 Glutaminyl-Cyclasen als Zielenzyme der Wirkstoffentwicklung

3.1 Die Rolle der pGlu-Modifikation für die pathophysiologischen Eigenschaften von Amyloidpeptiden

Die Funktion von N-terminalem pGlu wurde bereits eingangs dieser Arbeit beschrieben und am Beispiel des Chemokins CCL2 erläutert (siehe Kapitel 2). Die aufgeführten Proteine weisen einen pGlu-Rest auf, der in der Mehrzahl der Fälle aus einem Glutaminyl-Präkursor hervorgeht. Es sind aber auch einige wenige Peptide bekannt, bei denen pGlu aus einem Glutamyl-Präkursor entsteht. Die pGlu-Bildung aus Glutamat ist beispielsweise für den N-Terminus von Antikörpern oder das *joining peptide*, welches aus Pro-Opiomelanocortin nach limitierter Proteolyse entsteht, beschrieben worden (Twardzik und Peterkofsky, 1972; Bateman et al., 1990). Die Funktion des pGlu-Restes ist in diesen Fällen nicht erforscht worden, es wurde jedoch vermutet, dass auch diese Modifikationen aufgrund von Enzymkatalyse entstehen.

Weitere N-terminal durch pGlu modifizierte Peptide sind mit Erkrankungen, den sogenannten Amyloidosen, assoziiert. Diese können, wie im Fall von β 2-Mikroglobulin, aus einem Glutaminyl-Präkursor entstanden sein (Momoi et al., 1995). Zudem wurden neurodegenerative Erkrankungen beschrieben, die mit der Ablagerung von pGlu-Amyloidpeptiden assoziiert sind, deren N-Terminus durch Cyclisierung eines Glutamatrestes modifiziert ist (Saido et al., 1995; Vidal et al., 1999; Vidal et al., 2000). Unter diesen ist die Alzheimer-Krankheit (AD) die Amyloidose mit der höchsten Prävalenz (siehe Kapitel 1).

Die aus 40 oder 42 Aminosäuren (4 kDa) bestehenden A β -Peptide werden aus dem *amyloid precursor protein (APP)*, einem Transmembranprotein, das in hohem Maße in neuronalen Zellen gebildet wird, generiert. Die amyloidogenen Peptide werden nach proteolytischer Spaltung durch β - und γ -Sekretase aus APP freigesetzt. Primäre Produkte der Prozessierung von APP sind A β (1-40) und A β (1-42), wobei diese in einem Verhältnis von 8:1 aufgrund von Spaltung innerhalb der APP-Transmembransequenz durch γ -Sekretase gebildet werden. Insbesondere A β 1-42 neigt stark zur Aggregation und bildet die frühesten Ablagerungen im Verlauf der Erkrankung aus (Iwatsubo et al., 1994; Iwatsubo et al., 1995). Weiterführende Untersuchungen des N-Terminus der abgelagerten Peptide weisen jedoch auch darauf hin,

dass N-terminale Verkürzungen sowie die Modifikation durch pGlu vorkommen. Vermutlich entstehen diese Verkürzungen durch eine alternative Spaltung von APP an der Zellmembran, z.B. durch Meprin β , und/oder durch Aminopeptidase-Spaltung nach Bildung von A β (Cynis *et al.*, 2008b; Sevalle *et al.*, 2009; Bien *et al.*, 2012; Schlenzig *et al.*, 2015). Eine solche Verkürzung von A β 1-x durch zwei oder zehn Aminosäuren⁷ führt zur Bildung von A β mit einem N-terminalen Glutamat, welches zum pGlu-A β umgesetzt werden kann. Insbesondere pGlu-A β 3-40/42 wird im AD-Hirn vorgefunden (Russo *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2014). Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass:

1. die Anreicherung von pGlu-A β im Hirn mit dem Grad der krankhaften Gewebeveränderung einhergeht (dies ist in charakteristischem Gegensatz zu A β 1-42 zu sehen) (Kuo *et al.*, 1997; Guntert *et al.*, 2006; Rijal *et al.*, 2014),
2. die Konzentration von pGlu-A β mit dem kognitiven Status negativ korreliert (*post mortem*-Analyse der Pathologie) und mit der Tau-Pathologie assoziiert ist (Morawski *et al.*, 2014; Mandler *et al.*, 2014),
3. pGlu-A β bereits früh im Krankheitsgeschehen gebildet wird und diesem Molekül daher auch eine Initiatorfunktion (Keim) bei der Aggregation zukommen könnte (Hosoda *et al.*, 1998; Tekirian, 2001) und
4. die Menge an pGlu3-A β im Vergleich zum gesamten abgelagerten A β bis zu 50% ausmacht und N-terminal verkürzte Formen von A β sehr stark bei genetischer Prädisposition für AD aufgrund von Mutationen in den Genen für Presenilin 1 und 2 auftreten (Saido *et al.*, 1996; Kuo *et al.*, 1997; Russo *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2014).

Die Ergebnisse dieser Studien legen nahe, dass N-terminal verkürztes und pGlu-modifiziertes A β ursächlich mit der AD-Symptomatik in Verbindung stehen könnte. Dies stellt auch den Ansatzpunkt für eine therapeutische Intervention dar, was Gegenstand des folgenden Abschnitts sein wird. Vor diesem Hintergrund wurde hier die Aggregation und Toxizität von pGlu-A β *in vitro* und *in vivo* untersucht (Schilling *et al.*, 2006; Schlenzig *et al.*, 2009; Schlenzig *et al.*, 2012; Nussbaum *et al.*, 2012).

Mittels eines durchflusszytometrischen Verfahrens konnte gezeigt werden, dass pGlu-A β (3-42) schneller aggregiert als A β (3-42) (Schilling *et al.*, 2006). Darüber hinaus bilden pGlu- und nicht-modifiziertes A β gemischte Aggregate, das N-terminal modifizierte Peptid beschleunigt dabei die Aggregation *in vitro*. Auch wurde gezeigt, dass pGlu-A β die Aggregation anderer Amyloidpeptide, z.B. ABri, welches bei der vererbaren Britischen Demenz (*Familial British Dementia*, FBD) im Hirn abgelagert wird, fördert. Diese Eigenschaft könnte auch erklären,

⁷ A β 11-14/42 kann auch direkt durch BACE-1 Spaltung generiert werden.

warum A β -Ablagerungen mit ADan bei der vererbaren Dänischen Demenz vergesellschaftet vorkommen (Tomidokoro et al., 2005). Eine weiterführende Untersuchung zur A β -Aggregation *in vitro* wurde mittels Thioflavin T-vermittelter Fluoreszenzänderung sowie Elektronenmikroskopie durchgeführt (Schlenzig et al., 2009). Diese Untersuchungen wiesen darauf hin, dass der pGlu-modifizierte N-Terminus die Aggregation verschiedener A β -Formen unabhängig von deren C-Terminus beschleunigt. Die A β -Fibrillen erschienen kürzer und stärker verzweigt in elektronenmikroskopischen Aufnahmen, was durch eine schnelle Bildung von Aggregationskeimen und dadurch netzwerkartige Verflechtung bedingt sein kann. Ein wesentliches Ergebnis dieser Untersuchungen war, dass eine C-terminale Verkürzung von A β , wie z.B. bei A β 38, nicht zu einer deutlichen Verringerung der Aggregationsneigung führt, wenn der N-Terminus durch pGlu modifiziert ist. Das therapeutische Prinzip von γ -Sekretase-Modulatoren basiert dagegen auf der Annahme, dass die Bildung von C-terminal verkürzten Formen zu einer Verringerung der Aggregationsneigung führt. Die Verkürzung und pGlu-Modifikation des N-Terminus wirkt dem entgegen (Schlenzig et al., 2009).

Die beiden zuvor beschriebenen Studien legten nahe, dass der N-terminale pGlu-Rest die Aggregatbildung beschleunigt und dadurch für eine Keimbildung von Ablagerungen und löslichen, diffusiblen Formen von A β -Oligomeren (*amyloid-derived diffusible ligands*, ADDL) in Frage käme. Insbesondere diese Formen von A β werden als ausschlaggebend für synaptische Veränderungen und Neurotoxizität betrachtet (Selkoe, 2002; Selkoe, 2008). Es wurde beispielsweise in verschiedenen Arbeiten gezeigt, dass die Demenz nicht mit der Menge an abgelagertem, wasserunlöslichem A β , sondern mit löslichen A β -Formen korreliert (Terry et al., 1991; Lambert et al., 1998; Wang et al., 1999). Lösliche Oligomere, die aus dem Hirn verstorbener AD-Patienten isoliert wurden, riefen in sehr geringen Konzentrationen kognitive Beeinträchtigungen in Versuchstieren hervor (Shankar et al., 2008).

Die folgenden Untersuchungen zur Aggregation und Toxizität von pGlu-A β konzentrierten sich daher auf lösliche, oligomere Formen von A β und mögliche Unterschiede bei der Bildung dieser Aggregate (Schlenzig et al., 2012; Nussbaum et al., 2012). Mittels lichtinduzierter Vernetzung von A β wurde gezeigt, dass pGlu-A β 3-40 im Vergleich zu A β 1-40, A β 3-40 und A β 5-40 eine verstärkte Bildung von Di- und Trimeren aufweist (Schlenzig et al., 2012). Dementsprechend beeinflussten pGlu-A β 3-40 und pGlu-A β 3-42 die Langzeit-Potenzierung in hippocampalen Hirnschnitten stärker als die nicht modifizierten A β -Spezies. Dies wurde auch mit konditionierten Medien von HEK293-Zellen, welche verschiedene Formen von APP exprimierten und dadurch die o.g. A β -Formen ins Medium sezernierten,

bestätigt. Einen Hinweis auf die mögliche Ursache der verstärkten Toxizität von pGlu-A β lieferte eine Färbung der A β -Lösungen mittels Amino-Naphthalin-Sulfonsäure (ANS). Die charakteristische Fluoreszenzänderung der Substanz bei hydrophober Wechselwirkung wurde bei pGlu-A β 3-40, nicht aber bei A β 1-40 beobachtet. Dies ließ auf einen hydrophoben Charakter der Oligomere bzw. eine höhere Konzentration schließen, was wiederum mit der verstärkten Beeinflussung der Langzeit-Potenzierung in Einklang gebracht werden kann (*Schlenzig et al., 2012*). Diese Beobachtung ist dabei keineswegs einzigartig für A β . Untersuchungen an anderen toxischen Amyloidpeptiden bakteriellen Ursprungs wiesen bereits nach, dass die Zytotoxizität mit der Hydrophobizität der jeweiligen oligomeren Peptide korreliert (*Campioni et al., 2010; Bolognesi et al., 2010*).

In einer weiterführenden Arbeit wurde die Co-Aggregation von A β 1-42 und pGlu-A β 3-42 sowie deren Toxizität auf primäre Neuronen der Maus untersucht (*Nussbaum et al., 2012*). Die Studie zeigte auf, dass von pGlu-A β 3-42 im Vergleich zu A β 3-42 eine verstärkte Toxizität ausgeht. Darüber hinaus war der Weg der Bildung von Oligomeren unterschiedlich. pGlu-A β 3-42 aggregierte sehr schnell zu Dimeren/Trimeren, die über einen Zeitraum von mehreren Stunden in der Lösung vorlagen und sich dann offensichtlich zu Aggregaten mit höherem Molekulargewicht zusammenlagerten. Im Unterschied dazu bildete A β 1-42 Oligomere mit höherem Molekulargewicht, insbesondere Octa- und Decamere, Di- bzw. Trimere waren nicht wie bei pGlu-A β über einen längeren Zeitraum nachzuweisen. Es zeigten jedoch genau jene Fraktionen nach Größenausschlusschromatographie eine Neurotoxizität, in welchen sich Di- und Trimere befanden. In einem weiteren Teil der Untersuchung wurden Mischungen von A β 1-42 und pGlu-A β 3-42 zur Aggregation eingesetzt. Es zeigte sich hier, dass, obwohl A β 1-42 im Ansatz 20-fach höher konzentriert war, Di- und Trimere über einen längeren Zeitraum nachweisbar waren und die gleiche Toxizität aufwiesen wie pGlu-A β 3-42. Die Schlussfolgerung aus diesen Untersuchungen war, dass die Bildung von gemischten Oligomeren offensichtlich kein statischer Prozess ist und pGlu-A β 3-42 aufgrund dessen eine Strukturänderung in A β 1-42 induziert, was zur Übertragung der Toxizität führt. Dass es sich dabei tatsächlich um einen Mechanismus handelt, der auf einem „molekularen Gedächtnis“ beruht, wurde mittels einer Reihe von Verdünnungen des o.g. Ansatzes gezeigt. Selbst bei einer Konzentration von unter 0,05 % pGlu-A β 3-42 war eine unveränderte Zytotoxizität nachweisbar (*Nussbaum et al., 2012*). Zur Prüfung dieser Untersuchungsergebnisse *in vivo* wurde ein transgenes Mausmodell generiert, welches die humane QC und das humane APP neuronenspezifisch exprimiert. Im Alter von 9 Monaten wiesen doppelt transgene Tiere eine signifikant erhöhte Konzentration von pGlu-A β im Hirn auf. Dies ging mit einer erhöhten

Konzentration von Oligomeren und einer Beeinträchtigung in einem kognitiven Test, dem *Morris water maze*, einher. Immunhistochemische Analysen belegten eine geringere Dichte von Synaptophysin, einem synaptischen Markerprotein, im Hippocampus. Anhand dieser Untersuchungen konnte belegt werden, dass eine verstärkte Bildung von pGlu-A β ⁸ in einem Mausmodell zu einer erhöhten Toxizität führt, was mit einem Einfluss auf die Entstehung von Oligomeren, wie es *in vitro* beobachtet wurde, in Einklang gebracht werden kann. Dementsprechend konnten in Homogenaten von Hirngewebe verstorbener AD- Patienten pGlu-A β -Oligomere nachgewiesen werden. Dies traf nicht für Hirngewebe der Kontrollgruppe zu (Nussbaum *et al.*, 2012).

Der Zusammenhang von pGlu-A β Bildung, QC-Aktivität und Verhaltensveränderungen in Versuchstieren war auch Gegenstand einer weiteren Studie (Jawhar *et al.*, 2011). In dieser wurden APP-transgene Mäuse der Linie 5xFAD mit QC-überexprimierenden oder QC ko-Tieren (*knockout* des QPCT Gens, siehe Kapitel 2.3.4) gekreuzt. Aus der Charakterisierung der verschiedenen transgenen Mauslinien ging hervor, dass die QC-Expression direkt mit der Konzentration von pGlu-A β im Hirn zusammenhängt: Transgene Mäuse, welche humane QC und humanes APP bilden, wiesen eine erhöhte Konzentration auf. Ein *knockout* von Maus-QC führte zu einer signifikanten Verringerung von pGlu-A β und auch Gesamt-A β im Hirngewebe der Mäuse. Diese Reduktion war jedoch nicht strikt gendosisabhängig mit QC verknüpft. Interessanterweise, jedoch in Übereinstimmung mit den zuvor beschriebenen Untersuchungen zur Oligomerenbildung, bestand ein direkter Zusammenhang zwischen der pGlu-A β -Bildung und Verhaltensveränderungen der Mäuse (Jawhar *et al.*, 2011). Eine Beeinträchtigung des räumlichen Gedächtnisses und ein verändertes Angstverhalten wurde bei Mäusen beobachtet, die im Hirn eine erhöhte pGlu-A β -Konzentration aufwiesen (hAPPxhQC doppelt transgene Mäuse), die Verhaltensveränderung war aber abgeschwächt in Tieren, welche QC nicht bildeten (hAPPxQC-*knockout*).

Insgesamt zeigten diese Studien, dass ein direkter Zusammenhang zwischen dem Auftreten von pGlu-A β und der Beeinträchtigung des Lernvermögens sowie des Gedächtnisses von Versuchstieren besteht. Die erhöhte Toxizität von pGlu-A β ist offensichtlich auf eine verstärkte Aggregationsneigung, verbunden mit der Bildung von oligomeren Formen mit ausgeprägter Hydrophobizität zurückzuführen. Dabei wird deutlich, dass die modifizierten A β -Spezies *in vivo* nicht dominierend vorliegen müssen, um funktionelle Veränderungen zu bewirken. Die Bildung von pGlu-A β ist wiederum mit der Expression von QC verknüpft, so dass eine Hemmung dieses Enzyms zur Unterdrückung von pGlu-A β führen könnte. Die

⁸ Im Alter von 9 Monaten beträgt der Anteil von pGlu-A β 3-42 am Gesamt-A β ca. 1%.

Darstellung der entsprechenden pharmakologischen Untersuchungen hierzu ist Gegenstand des folgenden Abschnitts.

Zitierte Beiträge mit eigener Beteiligung

Schilling S, Lauber T, Schaupp M, Manhart S, Scheel E, Böhm G, Demuth HU*. **On the Seeding and Oligomerization of pGlu-Amyloid Peptides (in vitro)**. *Biochemistry* 2006, 45, 12393-12399.

Cynis H, Scheel E, Saido TC, Schilling S*, Demuth HU. **Amyloidogenic processing of amyloid precursor protein: evidence of a pivotal role of glutaminyl cyclase in generation of pyroglutamate-modified amyloid-beta**. *Biochemistry* 2008, 47, 7405-7413.

Schlenzig D, Manhart S, Cinar Y, Kleinschmidt M, Hause G, Willbold D, Funke SA, Schilling S*, Demuth HU. **Pyroglutamate formation influences solubility and amyloidogenicity of amyloid peptides**. *Biochemistry* 2009, 48, 7072-8.

Jawhar S#, Wirths O#, Schilling S#, Graubner S, Demuth HU*, Bayer TA*. **Overexpression of glutaminyl cyclase, the enzyme responsible for pyroglutamate A β formation, induces behavioral deficits, and glutaminyl cyclase knock-out rescues the behavioral phenotype in 5XFAD mice**. *J Biol Chem* 2011, 286, 4454-60.

Nussbaum JM#, 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 CG, Demuth HU*, Bloom GS*. **Prion-like behaviour and tau-dependent cytotoxicity of pyroglutamylated amyloid- β** . *Nature* 2012, 485, 651-5.

Schlenzig D, Rönicke R, Cynis H, Ludwig HH, Scheel E, Reymann K, Saido T, Hause G, Schilling S*, Demuth HU. **N-Terminal pyroglutamate formation of A β 38 and A β 40 enforces oligomer formation and potency to disrupt hippocampal long-term potentiation**. *J Neurochem* 2012, 121, 774-84.

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

Schlenzig D, Wermann M, Ramsbeck D, Moenke-Wedler T, Schilling S*. **Expression, purification and initial characterization of human meprin β from *Pichia pastoris***. *Protein Expr Purif* 2015, 116, 75-81.

3.2 Pharmakologische Untersuchungen zur Unterdrückung von pGlu-modifizierten Amyloidpeptiden

Die Aktivität der tierischen QCs wird durch Imidazol-, Benzimidazol- oder Cysteaminderivate kompetitiv gehemmt (Schilling et al., 2003b; Schilling et al., 2005). Die Inhibition beruht dabei auf der reversiblen Bindung dieser Substanzen am Zinkion im aktiven Zentrum von QC bzw. isoQC. Darüber hinaus wiesen die Untersuchungen darauf hin, dass eine Derivatisierung von Imidazol, insbesondere an einem Ringstickstoff, zu einer Verringerung der Dissoziationskonstante führt (Schilling et al., 2003b). Auf Basis dieser Untersuchungen wurde in der Folge eine Reihe von Verbindungen hergestellt, die K_i -Werte im niedrigen nM-Bereich aufwiesen (Buchholz et al., 2006). Eine erste Substanzklasse, welche eine hohe inhibitorische Potenz bei sehr geringer Zelltoxizität aufwies und daher für pharmakologische Untersuchungen an Zellkulturmodellen genutzt wurde, beruhte auf Thioharnstoff-Derivaten. Eine dieser Verbindungen, PBD150 (1-(3-(1H-imidazol-1-yl)propyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-Thioharnstoff), wurde aufgrund ihrer inhibitorischen Eigenschaften für eine Behandlung von Tiermodellen ausgewählt. PBD150 hemmt die Aktivität der menschlichen QC mit einem K_i -Wert von $60,0 \pm 0,2$ nM (Buchholz et al., 2006).

Die Hemmkonstante wurde zu 100 ± 5 nM mittels QC aus Ratte bestimmt, das Enzym aus Maus wird mit sehr ähnlicher Aktivität gehemmt (*Schilling et al., 2008b*).

Eine erste Versuchsreihe zum Nachweis der Wirkung von PBD150, die Entstehung von pGlu-modifiziertem A β zu unterdrücken, basierte auf der Injektion von A β 3-40 bzw. A β 1-40 in den Cortex von Ratten (*Schilling et al., 2008b*). Dabei wurde nach Applikation von A β 3-40 eine Bildung von pGlu-A β 3-40 mittels immunochemischer Methoden nachgewiesen. Eine Co-Injektion von PBD150 führte zu einer Unterdrückung der pGlu-Bildung, die Wirkung des Inhibitors war dosisabhängig. Anhand dieser Untersuchung konnte erstmals gezeigt werden, dass die physiologischen Konzentrationen an QC ausreichen, um eine Bildung von pGlu-A β 3-40 zu bewirken. Dieses Ergebnis war eine wichtige Voraussetzung für weiterführende Untersuchungen an transgenen Mäusen. Die Eigenschaften von PBD150 ermöglichten bei diesen Tierversuchen die Verabreichung über das Trinkwasser bzw. über das Futter. Die Verbindung weist ein Molekulargewicht von 354 Da und eine orale Bioverfügbarkeit von ca. 30% auf. Der logBB, d.h. die Verteilung der Substanz zwischen Plasma und Hirn, lag unter -1, ca. 1-2% der Substanz war nach 1-wöchiger Gabe im Hirn nachweisbar. Aufgrund dessen und einer kurzen Plasma-Halbwertszeit der Verbindung von <1h wurden für Behandlungsstudien 2,4 und 7,2 g Substanz pro kg Futter verabreicht, was einer Dosis von ca. 600 und 1800 mgkg⁻¹d⁻¹ entspricht.

Die Wirkung der Substanz wurde in drei Studien an einem transgenen Mausmodell der AD (Tg2576) geprüft (*Schilling et al., 2008c*). Die präventive Gabe von PBD150 von 4-10 Monaten führte zu einer signifikanten, dosisabhängigen Verringerung von pGlu-A β 3-42 im Hirn der Mäuse. Dies betraf auch die Abnahme des Gesamt-A β (A β x-42). In einer weiteren Studie wurden Tiere von 6-16 Monaten behandelt. Auch unter diesen Bedingungen konnte eine dosisabhängige Verringerung von pGlu-A β 3-42 sowie Gesamt-A β nachgewiesen werden. Begleitet war dies von einer kognitiven Verbesserung der Tiere nach Behandlung mit der hohen Dosis, was mittels Furchtkonditionierung (*contextual fear conditioning*) untersucht wurde. Die Ergebnisse konnten für die hohe Dosis in einem weiteren transgenen Modell (TASD41) bestätigt werden. Auch hier führte die Gabe der Substanz über 3 Monate zu einer Verbesserung des Lernverhaltens und des Gedächtnisses, was mittels Furchtkonditionierung und *Morris water maze* -Test festgestellt wurde (*Schilling et al., 2008c*). Nebenwirkungen von PBD150 waren nicht zu beobachten.

Die Untersuchungen von Tg2576- und TASD41-Mäusen wiesen somit darauf hin, dass die Hemmung von QC zu einer Verringerung von pGlu-A β führt und dies eine Verbesserung der Kognition der Tiere zur Folge hat. Die Ergebnisse lassen sich mit den im vorangegangenen

Kapitel dargelegten Untersuchungen, bei denen QC *knockout*-Mäuse eingesetzt wurden, in Einklang bringen. Alle Untersuchungen an Tiermodellen belegen somit, dass über die Hemmung von QC Einfluss auf die Progression der Erkrankung genommen werden könnte. Die Regulierung der QC-Aktivität und demzufolge die Wirkung von Inhibitoren des Enzyms wird in Abschnitt 3.4 zusammengefasst.

Zitierte Beiträge mit eigener Beteiligung

Schilling S., Cynis H., von Bohlen A., Hoffmann T., Wermann M., Heiser U., Buchholz M., Zunkel K., and Demuth H. U.* **Isolation, catalytic properties, and competitive inhibitors of the zinc-dependent murine glutaminyl cyclase.** *Biochemistry* 2005, 44, 13415-13424.

Buchholz M., Heiser U*, Schilling S, Niestroj AJ, Zunkel K, Demuth HU. **The first potent inhibitors for human glutaminyl cyclase: synthesis and structure-activity relationship.** *J Med Chem* 2006, 49, 664-677.

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 HU*, Rossner S. **Glutaminyl Cyclase Inhibition Attenuates Pyroglutamate A β and Alzheimer's Disease-like Pathology.** *Nat Med* 2008, 14, 1106-11.

Schilling S, Appl T, Hoffmann T, Cynis H, Schulz K, Wermann M, Buchholz M, Heiser U, von HörstenS*, Demuth HU*. **Inhibition of Glutaminyl Cyclase Prevents pGlu-A β Formation after Intracortical/hippocampal Microinjection in vivo/in situ.** *J Neurochem* 2008, 106, 1225-1236.

3.3 Der Einfluss von QC-Inhibitoren auf die Reifung und Aktivität von CC-Chemokine

Ligand 2 (CCL2)

Wie in den Kapiteln 2.1 und 3.1 erläutert, spielt der N-terminale Pyroglutamyrest nicht nur eine Rolle für die pathophysiologischen Eigenschaften von Amyloidpeptiden, sondern vermittelt auch die Ausbildung der biologisch aktiven Struktur von Peptidhormonen und Chemokinen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde, neben der Wirkung von QC-Inhibitoren auf die Bildung von pGlu-A β , auch die Unterdrückung von pGlu-CCL2 (MCP-1) untersucht (Cynis *et al.*, 2011). Wie bereits in Kapitel 2 dargelegt, vermittelt der pGlu-Rest bei CCL2 und den anderen Mitgliedern der MCP-Familie die Bindung an den Rezeptor und stabilisiert das Peptid gegenüber Abbau durch Aminopeptidasen wie DP4 und Aminopeptidase P. Es bestand daher die Hypothese, dass eine Hemmung von QC bzw. isoQC zu einer Abschwächung der chemotaktischen Aktivität von CCL2 führt, da das nicht-modifizierte Peptid abgebaut wird bzw. nur abgeschwächt an den Rezeptor auf Immunzellen bindet.

CCL2 spielt eine Rolle bei verschiedenen akuten und chronisch-entzündlichen Prozessen wie zum Beispiel Arteriosklerose (Charo und Taubman, 2004; Charo und Ransohoff, 2006; Charo und Taub, 2011), Krebserkrankungen (Qian *et al.*, 2011) oder der Alzheimer-Krankheit (Yamamoto *et al.*, 2005; Galimberti *et al.*, 2006a; Galimberti *et al.*, 2006b). Makromolekulare Wirkstoffe, die die Aktivität von CCL2 unterbinden, sogenannte Spiegelmer (Aptamere),

befinden sich derzeit in der klinischen Testung. Oral verfügbare Wirkstoffe zur Unterdrückung der Chemokinwirkung von CCL2, wie es die Inhibitoren von QC darstellen würden, sind zurzeit nicht in der klinischen Entwicklung.

Zur Untersuchung der N-terminalen Reifung von CCL2 wurden verschiedene zelluläre Modelle sowie Tiermodelle eingesetzt (*Cynis et al., 2011*). Die Tiermodelle beruhen auf der Injektion von Lipopolysacchariden oder Thioglykolat in das Peritoneum. Mittels spezifischer ELISAs, die zwischen pGlu-CCL2 und nicht-modifiziertem CCL2 unterschieden, wurde der Einfluss von QC und isoQC auf die Bildung der pGlu-Modifikation untersucht. Darüber hinaus ist die Wirkung von CCL2 auf die Migration von Immunzellen, insbesondere Granulozyten und Monozyten, charakterisiert worden. Anhand genetisch modifizierter Mäuse (*knockout* von QC oder isoQC, siehe Kapitel 2.3.4) konnte dabei gezeigt werden, dass ein Verlust von isoQC zu einer signifikanten Beeinträchtigung der Einwanderung von Monozyten führt. Ein *knockout* von QC beeinflusste weder die pGlu-Entstehung noch die Migration von Monozyten (*Cynis et al. 2011*). Die Bildung von pGlu-CCL2 und die Einwanderung von Immunzellen konnte zudem durch die Gabe von QC-Inhibitoren unterdrückt werden. Eine genetisch oder pharmakologisch verursachte Störung der pGlu-Modifikation korreliert demnach mit der therapeutischen Wirkung. In der Folge wurde das neue therapeutische Konzept in einem Mausmodell der Arteriosklerose geprüft. Eine chronische, orale Gabe des Inhibitors PBD150 führte hier zu einer reduzierten Anheftung von Monozyten an die Gefäßwand und in der Folge zu einer Erweiterung des Gefäßinnendurchmessers. Diese Ergebnisse belegen, dass eine Gabe von QC-Inhibitoren den Verlauf von chronischen Entzündungskrankheiten, die maßgeblich durch Einwanderung von Monozyten bedingt sind, modifizieren kann. Das Prinzip wurde in der Folge in zwei weiteren Modellen, der Leberentzündung/Zirrhose (*non-alcoholic fatty liver disease*) sowie der septischen Arthritis belegt. Auch bei diesen Studien führte die Gabe von QC-Inhibitoren zu einer Abschwächung der Symptome und der Gewebeeränderungen (*Cynis et al., 2013*). Im Fall der septischen Arthritis wurde zudem eine verringerte Lethalität der Tiere beobachtet (*Hellvard et al., 2013*). Die pharmakologische Wirkung von Inhibitoren der Glutaminyl-Cyclasen QC und isoQC bei Modellen der chronischen Entzündung und Amyloidpathologie (Kapitel 3.2) stellen somit zwei mögliche Ansätze zur Entwicklung neuer Therapeutika dar. Allerdings sind neurodegenerative Erkrankungen stets von einer entzündlichen Reaktion begleitet, bei der auch CCL2 involviert ist. Inhibitoren der QC könnten somit auf verschiedene pathobiochemische Veränderungen bei Neurodegeneration Einfluss nehmen. Der mögliche Zusammenhang wird im folgenden Abschnitt erläutert.

Zitierte Beiträge mit eigener Beteiligung

Cynis H, Hoffmann T, Friedrich D, Kehlen A, Gans K, Kleinschmidt M, Rahfeld JU, Wolf R, Wermann M, Stephan A, Haegele M, Sedlmeier R, Graubner S, Jagla W, Müller A, Eichentopf R, Heiser U, Seifert F, Quax PH, de Vries MR, Hesse I, Trautwein D, Wollert U, Berg S, Freyse EJ, Schilling S*, Demuth HU. **The isoenzyme of glutaminyl cyclase is an important regulator of monocyte infiltration under inflammatory conditions.** EMBO Mol Med 2011, 3, 545-58.

Hellvard A, Maresz K, Schilling S, Graubner S, Heiser U, Jonsson R, Cynis H, Demuth HU, Potempa J, Mydel P*. **Glutaminyl cyclases as novel targets for the treatment of septic arthritis.** J Infect Dis 2013, 207, 768-77.

Cynis H*, Kehlen A, Haegele M, Hoffmann T, Heiser U, Fujii M, Shibazaki Y, Yoneyama H, Schilling S, Demuth HU. **Inhibition of Glutaminyl Cyclases alleviates CCL2-mediated inflammation of non-alcoholic fatty liver disease in mice.** Int J Exp Pathol 2013, 94, 217-25.

3.4 QC und isoQC: Bildung von pGlu-modifizierten Peptiden als zentraler Teil des Pathomechanismus der Alzheimer-Krankheit

Wie in den vorangegangenen Abschnitten dargelegt, weisen zahlreiche Tierversuche darauf hin, dass die Glutaminyl-Cyclasen QC und isoQC für die Bildung von pGlu-modifizierten Peptiden unter pathophysiologischen Bedingungen verantwortlich sind. In diesem Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit insbesondere die Modifikation von A β und CCL2 untersucht. Interessanterweise könnte die Bildung dieser beiden Peptide im Fall der Alzheimer-Krankheit miteinander verknüpft sein. Die Konzentration von CCL2 ist im CSF von Alzheimer-Patienten erhöht (Galimberti et al., 2006b). Ausgelöst wird dies höchstwahrscheinlich durch die Stimulation von Mikroglia, Astrocyten und auch Neuronen, die aufgrund der Akkumulation von Amyloidpeptiden sowie durch Gewebeschädigung CCL2 sezernieren.

Eine gesteigerte Sekretion von CCL2 geht offenbar mit einer Stimulation der Expression von QC einher (Hägele, 2012). Untersuchungen an Astrocyten weisen darauf hin, dass die Expression von QC durch Amyloidpeptide stimuliert wird (Waniek et al., 2015). Eine verstärkte Bildung von QC konnte auch im Hirn von AD-Patienten nachgewiesen werden (Schilling et al., 2008c; De Kimpe et al., 2012; Morawski et al., 2014). Offensichtlich verläuft dies über einen Ca²⁺-abhängigen, intrazellulären Signalweg (De Kimpe et al., 2012). Die Expression von CCL2 (und anderen Vertretern der MCP-Familie) könnte mit der von QC kausal verbunden sein, da die Generierung von pGlu-modifizierten, aktiven Chemokinen eine höhere zelluläre Konzentration des umsetzenden Enzyms erfordert. Die Stimulation setzt mutmaßlich eine Kaskade in Gang, die zu einer Bildung von pGlu-modifizierten A β -Peptiden führt (Abbildung 7). Diese wiederum wirken neurotoxisch und verstärken das pro-inflammatorische Milieu. Die Bildung von CCL2 und pGlu-A β im Krankheitsprozess sind somit offenbar miteinander verknüpft: Mit einer erhöhten Produktion pGlu-modifizierter

Peptide geht die Stimulation der QC-Expression einher, wodurch in der Folge pGlu-A β 3-42 gebildet wird. Diese Hypothese wird durch folgende Beobachtungen gestützt:

1. QC und pGlu-A β sind im Hirn von Alzheimer-Patienten erhöht, die gesteigerte Expression von QC korreliert mit der pGlu-A β 3-42-Konzentration (Morawski et al., 2014).
2. CCL2 ist im Hirn von AD-Patienten erhöht, im Tiermodell zeigt eine Expression von CCL2 eine Verstärkung der pathologischen Effekte (Yamamoto et al., 2005; Galimberti et al., 2006a; Galimberti et al., 2006b).
3. Eine Stimulation von Astrocyten mit A β bzw. pGlu-A β bewirkt die CCL2-Sekretion *in vitro* (Hartlage-Rubsamen et al., 2015), QC sowie TRH werden ebenfalls verstärkt gebildet (Waniek et al., 2015).
4. Die Stimulation der Expression von CCL2 in verschiedenen Zelllinien geht mit einer Erhöhung der QC-Expression einher (Hägele, 2012).
5. Die QC-Expression ist auch bei anderen entzündlichen Prozessen erhöht, z.B. septischer Arthritis (Hellvard et al., 2013). Es könnte sich daher um einen grundsätzlichen Regulationsmechanismus handeln.

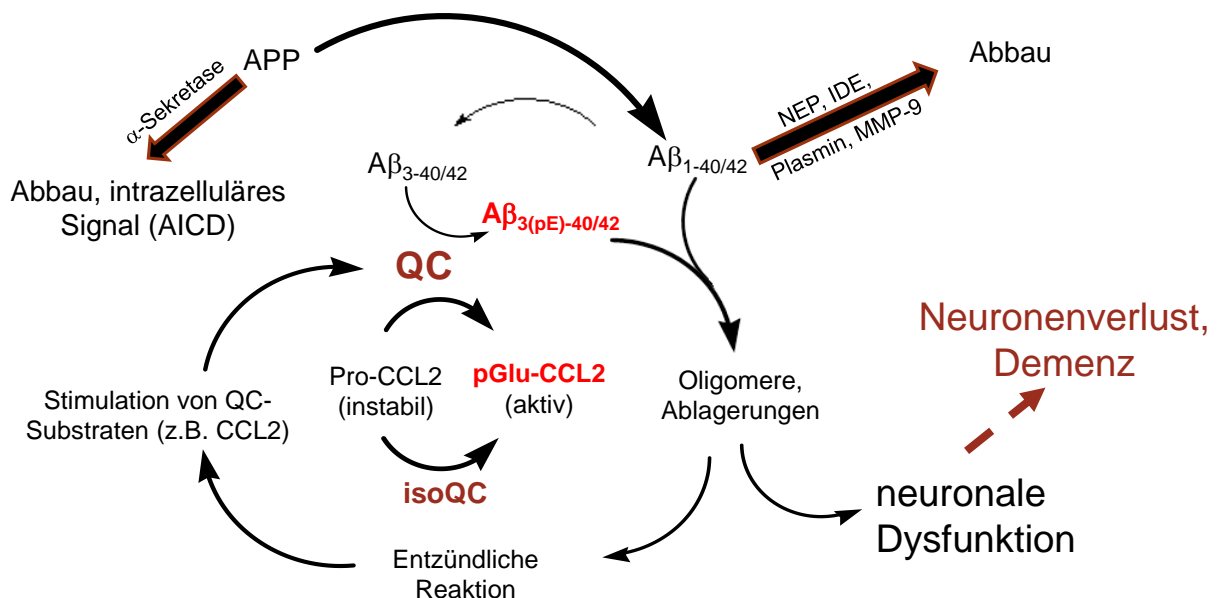


Abbildung 7: Mutmaßlicher Zusammenhang zwischen QC bzw. isoQC, CCL2 und pGlu-A β . Der Abbau des neuronalen Transmembranproteins APP (oben links) kann auf zwei verschiedenen Wegen verlaufen: Die Spaltung durch α -Sekretase führt nicht zur Bildung amyloidogener Peptide, spielt aber eine Rolle für intrazelluläre Signalwege (vermittelt über AICD) und somit für neuronale Regelkreisläufe. Ein alternativer Weg

der Prozessierung, welcher auf Spaltung durch β -Sekretase (z.B. BACE oder Meprin β) beruht, führt zur Entstehung von A β -Peptiden. Unter physiologischen Bedingungen unterliegen diese Peptide dem Abbau durch Endoproteasen (oben rechts). N-terminal verkürzte A β -Formen (A β 3-40/42 oder 11-40/42), die durch die Aktivität von Aminopeptidasen oder direkt infolge der β -Sekretasespaltung entstehen, können durch QC zu pGlu-A β umgesetzt werden (siehe hierzu Kapitel 4.2). Die pGlu-Modifikation verstärkt die Aggregationsneigung und Toxizität von A β (siehe hierzu Kapitel 4.1), fördert die Bildung oligomerer Strukturen und wirkt als entzündlicher Stimulus, in dessen Folge CCL2 verstärkt gebildet wird (zentraler Teil). CCL2 ist Substrat von isoQC, die den N-Terminus in pGlu überführt. Mit der Stimulation von CCL2 geht auch eine verstärkte Expression von QC einher, was wiederum die Bildung von pGlu-modifizierten, toxischen A β -Peptiden vermittelt. In der Folge entsteht ein Kreislauf, der zu einer Anreicherung von pGlu-A β im Krankheitsverlauf der AD führt. Die Bildung und Anreicherung von pGlu-A β ist somit mutmaßlich ein Nebenprodukt einer physiologisch getriebenen Reaktion des erkrankten Gewebes, initiiert durch einen entzündlichen Stimulus.

Andere Untersuchungen weisen auch auf eine schwach erhöhte Expression von isoQC im AD-Hirn hin, was mit der Reifung von CCL2 in Verbindung zu stehen scheint (*Hartlage-Rübsamen et al., 2015*). In welchem Zusammenhang dies mit der Bildung von pGlu-A β steht, ist jedoch noch unklar. Tierversuche hatten auf einen Zusammenhang von QC mit der pGlu-Bildung hingewiesen (*Jawhar et al., 2011*).

Die zuvor genannten und in Abbildung 7 zusammengefassten Prozesse bilden mutmaßlich einen Kreislauf, in dessen Zentrum die QC-Aktivität steht. Das pro-inflammatorische Milieu ist die Ursache für die Stimulation der QC-Expression, infolgedessen pGlu-modifizierte A β Peptide verstärkt gebildet werden. Die Modifikation von A β verändert die an sich physiologische Regelkaskade, d.h. die Co-Regulation von QC-Aktivität und deren Substraten, zu einem pathophysiologischen Prozess.

Zitierte Beiträge mit eigener Beteiligung

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 HU*, Rossner S. **Glutaminyl Cyclase Inhibition Attenuates Pyroglutamate A β and Alzheimer's Disease-like Pathology.** Nat Med 2008, 14, 1106-11.

Jawhar S#, Wirths O#, Schilling S#, Graubner S, Demuth HU*, Bayer TA*. **Overexpression of glutaminyl cyclase, the enzyme responsible for pyroglutamate A β formation, induces behavioral deficits, and glutaminyl cyclase knock-out rescues the behavioral phenotype in 5XFAD mice.** J Biol Chem 2011, 286, 4454-60.

Hellvard A, Maresz K, Schilling S, Graubner S, Heiser U, Jonsson R, Cynis H, Demuth HU, Potempa J, Mydel P*. **Glutaminyl cyclases as novel targets for the treatment of septic arthritis.** J Infect Dis 2013, 207, 768-77.

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

Hartlage-Rübsamen M, Waniek A, Meissner J, Morawski M, Schilling S, Jäger C, Kleinschmidt M, Cynis H, Kehlen A, Arendt T, Demuth HU*, Rossner S*. **Isoglutaminyl cyclase contributes to CCL2-driven neuroinflammation in Alzheimer's disease.** Acta Neuropathol 2015, 129, 565-83.

Waniek A, Hartlage-Rübsamen M, Höfling C, Kehlen A, Schilling S, Demuth HU*, Roßner S*. **Identification of thyrotropin-releasing hormone as hippocampal glutaminyl cyclase substrate in neurons and reactive astrocytes.** Biochim Biophys Acta 2015, 1852, 146-55.

4 Weitere Modifikationen von Amyloidpeptiden – die Bildung von isoAspartat am N-Terminus von Amyloid- β (A β)

Neben der Bildung von Pyroglutamat sind auch andere posttranslationale Modifikationen von A β beschrieben (siehe auch das folgende Kapitel 5). Unter diesen stellt die Entstehung von Isoaspartat (isoAsp) eine Veränderung des Peptidrückgrates dar. IsoAsp entsteht in Peptiden und Proteinen aus Aspartyl- oder Asparaginylnresten (Robinson et al., 1970; Robinson und Rudd, 1974). Wie bei der intramolekularen Cyclisierung von Glutamin oder Glutamat handelt es sich dabei um eine Acyltransfer-Reaktion (Abbildung 8). Der Amidstickstoff des Peptidrückgrates (genauer der auf Asx C-terminal folgenden Aminosäure in der Kette) greift die Carbonylgruppe der Asx-Seitenkette an. Wasser bzw. Ammoniumionen werden unter Bildung eines Succinimid-Intermediats abgespalten. Bei der Hydrolyse dieses Intermediats kommt es zur Generierung von Aspartat und Isoaspartat in einem Verhältnis von ca. 1:3 bis 1:5 (Meinwald et al., 1986; Geiger und Clarke, 1987; Patel und Borchardt, 1990) (Abbildung 8). Auf der Stufe des Intermediats kann es auch zu einer Konfigurationsumkehr am Ca kommen, in diesem Fall bildet sich D-Asp bzw. D-isoAsp (Lowenson und Clarke, 1991; Lowenson und Clarke, 1992).

Die Produkte der Isomerisierung von Asx innerhalb der Peptidketten konnten bei zahlreichen Peptiden und Proteinen nachgewiesen werden (George-Nascimento et al., 1990; Aswad et al., 2000; Alfaro et al., 2008; Sargaeva et al., 2011). Bevorzugt tritt die Isoaspartyl-Bildung bei Sequenzen auf, bei denen Asx C-terminal mit einer Aminosäure verknüpft ist, welche eine wenig raumgreifende Seitenkette aufweist (Geiger und Clarke, 1987; Stephenson und Clarke, 1989; Lowenson und Clarke, 1991). Die Entstehung von isoAsp in Proteinen und Peptiden spielt vermutlich keine physiologische Rolle, obgleich eine Ausnahme beschrieben ist (Corti und Curnis, 2011). In der überwiegenden Mehrzahl führt die durch isoAsp induzierte Strukturänderung zum Verlust der Funktion (George-Nascimento et al., 1990; Young et al., 2001). Das Auftreten von isoAsp wird daher als eine Art „molekularer Schalter“ angesehen, der das Alter von Proteinen widerspiegelt und diese für einen Abbau zugänglich macht (Robinson et al., 1970; Robinson und Robinson, 2001). Die im Cytosol von Bakterien, Pflanzen und Tieren lokalisierte Isoaspartyl-Methyltransferase (PIMT) methyliert Isoaspartylreste, die nach Bildung eines Succinimid-Intermediates in Aspartat überführt werden (Clarke, 1985). Dies wird als Reparaturmechanismus angesehen. Für weitergehende Studien zur Bildung von isoAsp und dessen Reparatur sei an dieser Stelle auf die Literatur verwiesen (Clarke, 1985; Lowenson et al., 1994; Clarke, 2003; Shimizu et al., 2005; Vigneswara et al., 2006).

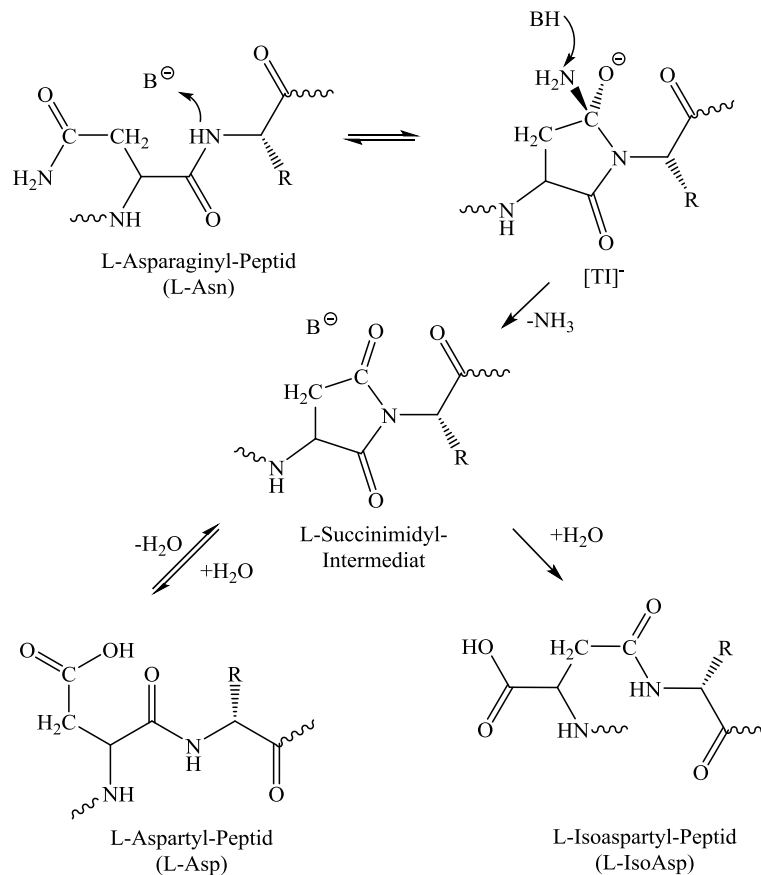


Abbildung 8: Bildung von Isoaspartat aus Asparaginylresten (spontane Deamidierung). Innerhalb der Peptidkette oder am N-terminus kommt es zur Bildung eines Succinimid-Intermediates, welches zu Aspartyl- bzw. Isoaspartylresten hydrolysiert wird. Es wird vermutet, dass die Bildung des Succinimid-Intermediates geschwindigkeitsbestimmend für die Reaktion ist. Beschleunigt wird dies durch Protonenakzeptoren in Lösung (hier B-). Der Übergang eines Protons ist geschwindigkeitsbestimmend (Güttler *et al.*, 2013), was durch die Deprotonierung des angreifenden Stickstoffs begründet sein könnte. Das Succinimidyl-Intermediat neigt zur Epimerisierung am $C\alpha$, dadurch entstehen auch geringe Mengen an D-Aspartyl- und D-Isoaspartyl-Peptiden (hier nicht dargestellt).

Die isoAsp-Modifikation ist auch für A β -Peptide beschrieben worden. A β weist in seiner Primärstruktur drei Aspartylreste und einen Asparaginylrest auf. Eine Bildung von Isoaspartat konnte an den Positionen 1, 7 und 23 nachgewiesen werden (Roher *et al.*, 1993; Lowenson *et al.*, 1994; Saido *et al.*, 1996; Shimizu *et al.*, 2000). Zum Einfluss der Modifikation auf die Eigenschaften und das Aggregationsverhalten ist wenig bekannt. Eine Beschleunigung der Aggregation durch isoAsp7 wurde beschrieben (Roher *et al.*, 1993). Interessanterweise unterscheiden sich isoAsp7-A β und isoAsp23-A β offenbar in Bezug auf die Ablagerung im Hirngewebe. IsoAsp7-A β kommt vorrangig im Hirnparenchym vor, isoAsp23-A β ist vor

allem in vaskulären Ablagerungen nachgewiesen worden. Zur Toxizität der modifizierten Peptide im Vergleich zu anderen A β -Formen gibt es noch keine Untersuchungen.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Bildung von isoAsp am N-Terminus von Modellpeptiden untersucht, deren Sequenzen von humanem A β abgeleitet wurden (Güttler *et al.*, 2013). Die Untersuchungen ergaben, dass aus N-terminalem Asx, wie bereits zuvor für Reste innerhalb der Kette beschrieben, isoAsp hervorgehen kann. Die Geschwindigkeit der isoAsp-Bildung war dabei ähnlich zu Resten innerhalb der Kette. Limitierend für die Reaktion ist ein Protonenübergang, dies ergab die Untersuchung des Lösungsmittel-Isotopieeffektes über die Reaktion. Im Vergleich zur Cyclisierung von Glutamat verläuft die N-terminale isoAsp-Bildung aus Aspartat deutlich schneller, die Halbwertszeit lag bei 78 Tagen (pH7.0 und 30°C), wohingegen unter gleichen Bedingungen eine Halbwertszeit von N-terminalem Glu von ca. 10 Jahren ermittelt wurde (Seifert *et al.*, 2009; Güttler *et al.*, 2013).

Es konnte somit nachgewiesen werden, dass eine Bildung von isoAsp am N-Terminus stattfindet. Die Reaktion unterliegt dabei den gleichen Prinzipien wie die Isomerisierung innerhalb der Kette. Dieses Ergebnis war bedeutsam, da bisher angenommen wurde, dass sich die Entstehung von isoAsp ausschließlich vor der Spaltung durch β -Sekretase vollzieht (Böhme *et al.*, 2008a; Böhme *et al.*, 2008b).

Zitierte Beiträge mit eigener Beteiligung

Seifert F, Schulz K, Koch B, Manhart S, Demuth HU*, Schilling S. **Glutaminyl cyclases display significant catalytic proficiency for glutamyl substrates.** *Biochemistry* 2009, 48, 11831-3.

Güttler BH, Cynis H, Seifert F, Ludwig HH, Porzel A, Schilling S*. **A quantitative analysis of spontaneous isoaspartate formation from N-terminal asparaginyl and aspartyl residues.** *Amino Acids* 2013, 44, 1205-14.

5 Therapeutische Antikörper gegen modifiziertes A β

5.1 Untersuchungen zur passiven Immunisierung von transgenen Mäusen mit pGlu-A β -spezifischen Antikörpern

Neben der Veränderung des N-Terminus durch isoAsp- bzw. pGlu-Bildung sind auch andere posttranslationale Modifikationen von A β beschrieben worden. Zum Beispiel betrifft dies den Tyrosylrest an Position 10, welcher nitriert vorliegen kann sowie die Phosphorylierung an Serylresten. Einen Überblick über die bisher bekannten kovalenten Modifikationen bzw. Veränderungen des Peptidrückgrates von A β gibt Abbildung 9.

Für die meisten A β -Modifikationen ist ein Einfluss auf die Aggregation und/oder Toxizität beschrieben worden. Eine Unterbindung dieser – und dies u.U. nicht beschränkt auf die pGlu-

Bildung – wäre daher von pharmakologischem Interesse. Eine Möglichkeit dafür könnte der Einsatz von monoklonalen Antikörpern bieten, welche spezifisch die modifizierten Peptide binden und einem Abbau durch Microglia oder Monozyten/Macrophagen zuführen. Das Verfahren der Immuntherapie ist bereits für eine mögliche Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen vorgeschlagen worden. Für einen Überblick über die Struktur und Funktionsweise von Antikörpern sowie immuntherapeutische Studien wird auf folgende Übersichtsartikel verwiesen (Schenk et al., 1999; Schenk et al., 2000; Schenk, 2002; Lemere und Masliah, 2010; Schenk et al., 2012).

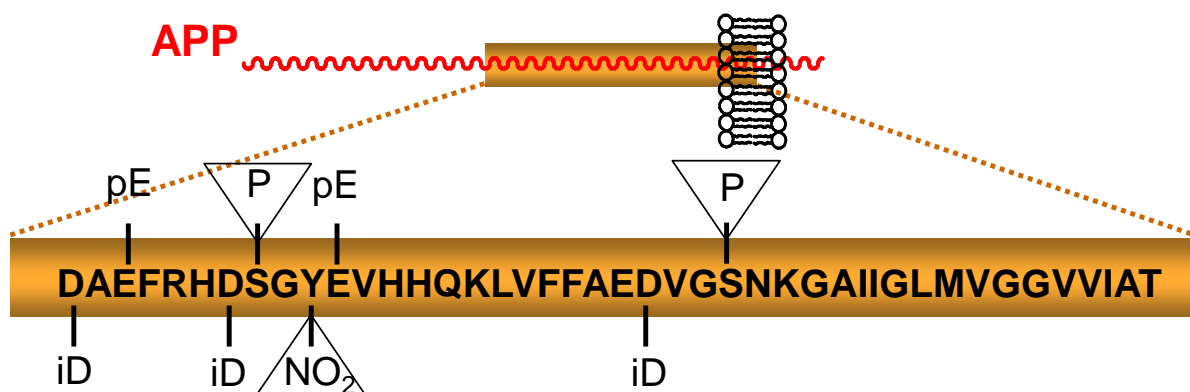


Abbildung 9: Posttranslationale Modifikationen von A β . Abkürzungen: iD, Isoaspartat; pE, Pyroglutamat; P, Phosphorylierung; NO₂, Nitrierung. Die Modifikation durch pGlu an Position 3 oder 11 führt zu einer Beschleunigung der Aggregation (He und Barrow, 1999; Schilling et al., 2006; Schlenzig et al., 2009). Auch eine Phosphorylierung an Position 8 sowie die Nitrierung von Tyr10 verstärken die Aggregationsneigung (Kummer et al., 2011; Kumar et al., 2011; Kumar und Walter, 2011; Kumar et al., 2012; Ashby et al., 2015). Im Gegensatz hierzu verhindert die Phosphorylierung an Ser26 die Aggregation (Rezaei-Ghaleh et al., 2014).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Prof. Cynthia Lemere (Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School) geprüft, ob monoklonale Antikörper, die gegen pGlu-modifiziertes A β gerichtet sind, eine therapeutische Wirkung in Mausmodellen ausüben. Die Untersuchungen ergaben, dass die chronische Behandlung von transgenen Mäusen mit einem monoklonalen pGlu3-A β -spezifischen Antikörper sowohl die Ablagerung von A β signifikant reduzierten als auch zu einer Verbesserung von Lernvermögen und Gedächtnis führten (Frost et al., 2012; Frost et al., 2015). Die Ergebnisse stützen zum einen die Hypothese, dass dem pGlu-modifizierten A β -Peptid eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression der Erkrankung zukommen könnte. Zum anderen wird aufgezeigt, dass die Bindung einer (in transgenen Mäusen) gering konzentrierten A β -Spezies ausreicht, um sowohl eine Linderung der Histopathologie als auch einen

funktionellen Therapieeffekt zu erzielen. In diesem Punkt könnte die spezifisch gegen modifiziertes A β gerichtete Immuntherapie Vorteile gegenüber anderen Antikörpern aufweisen:

1. Die pGlu-modifizierten Peptide zeigen eine gesteigerte Aggregationsneigung und Toxizität. Die pGlu-A β -Anreicherung im Hirn von AD-Patienten korreliert mit der Schwere der Erkrankung (siehe Kapitel 1 und 3). Eine Bindung dieser Formen erscheint daher wichtig für eine Therapie. Andere Antikörper, die sich in der klinischen Entwicklung befanden oder derzeit befinden (z.B. der Antikörper Bapineuzumab), wiesen dies nicht auf.
2. Die Bildung von pGlu-A β ist offensichtlich auf das Hirn beschränkt, nicht-modifiziertes A β ist auch im Blut und peripheren Organen vorzufinden. Dies führt dazu, dass der Antikörper bei intravenöser Gabe nicht bereits im Blut mit Antigen abgesättigt wird, was eine geringere Dosierung ermöglichen könnte.
3. Zahlreiche Studien weisen auf eine physiologische Rolle von A β hin (Puzzo et al., 2008; Soscia et al., 2010; Puzzo et al., 2011; Puzzo und Arancio, 2013). Eine spezifische Bindung modifizierter, krankheitsspezifischer A β -Formen würde somit nicht mit diesen Funktionen interferieren.
4. Die Bildung von pGlu am N-Terminus von A β generiert ein Neopepitop für die Antikörper. Dadurch wird Spezifität gegenüber A β vermittelt und eine Bindung an das Vorläuferprotein APP ausgeschlossen, was ebenfalls das Risiko von Nebenwirkungen aufgrund zellulärer Toxizität verringern sollte.

Die Untersuchungen zur Wirkung monoklonaler Antikörper in transgenen Mäusen eröffnen einen weiteren Weg zur Verhinderung der Ausprägung der pGlu-A β -vermittelten Toxizität. Dabei ist der Mechanismus der Wirkung zu dem von QC-Inhibitoren abzugrenzen. Während eine Hemmung von QC die Neubildung von pGlu-Peptiden unterbindet, bewirken Antikörper den beschleunigten Abbau durch Initiierung von Phagozytose. Beide Ansätze lassen sich daher voneinander abgrenzen, woraus Vor- und Nachteile resultieren können. Die Impulse, die sich daraus für eine Wirkstoffentwicklung ergeben könnten, werden im folgenden Abschnitt dargestellt.

Zitierte Beiträge mit eigener Beteiligung

Schilling S, Lauber T, Schaupp M, Manhart S, Scheel E, Böhm G, Demuth HU*. **On the Seeding and Oligomerization of pGlu-Amyloid Peptides (in vitro)**. *Biochemistry* 2006, 45, 12393-12399.

Schlenzig D, Manhart S, Cinar Y, Kleinschmidt M, Hause G, Willbold D, Funke SA, Schilling S*, Demuth HU. **Pyroglutamate formation influences solubility and amyloidogenicity of amyloid peptides**. *Biochemistry* 2009, 48, 7072-8.

Frost JL, Liu B, Kleinschmidt M, Schilling S, Demuth HU, Lemere CA*. **Passive immunization against pyroglutamate-3 amyloid- β reduces plaque burden in Alzheimer-like transgenic mice: a pilot study.** *Neurodegener Dis* 2012, 10, 265-70.

Frost JL, Liu B, Rahfeld JU, Kleinschmidt M, O'Nuallain B, Le KX, Lues I, Caldarone BJ, Schilling S, Demuth HU, Lemere CA*. **An anti-pyroglutamate-3 A β vaccine reduces plaques and improves cognition in APP^{swE}/PS1 Δ E9 mice.** *Neurobiol Aging*. 2015, 36, 3187-99.

5.2 QC-Inhibitoren oder Proteinwirkstoffe zur Verhinderung der Bildung von pGlu-A β ; Vergleich der therapeutischen Konzepte

Der Nachweis des therapeutischen Effektes bei Unterdrückung von pGlu-A β , der über monoklonale Antikörper oder Inhibitoren der QC vermittelt werden kann, eröffnet die Möglichkeit eines Vergleiches von Vor- und Nachteilen des jeweiligen Ansatzes:

1. Gegenüber Inhibitoren der QC haben Antikörper den Vorteil, dass bereits gebildetes und abgelagertes pGlu-A β gebunden und einem Abbau zugeführt wird. Dies ist auch bedeutsam, da bisher nicht bekannt ist, in welchem Ausmaß abgelagertes Amyloid durch Proteasen noch abgebaut wird. Da Plaques auch als Reservoir für toxisches, oligomeres A β angesehen werden, könnte eine Bindung von bereits gebildetem pGlu-A β wichtig sein. Dem steht jedoch entgegen, dass eine Behandlung mit QC-Inhibitor für drei Wochen zu einer Verbesserung des räumlichen Lernvermögens in transgenen Tieren führte (*Hoffmann et al., 2017*). Es könnte daher sein, dass vor allem die *de novo*-Synthese von pGlu-A β zur Oligomerenbildung und deren Toxizität führt.
2. Antikörper als Makromoleküle weisen den Nachteil auf, dass die Blut-Hirn Schranke, eine den Stoffaustausch zwischen Hirn und Blut regulierende zelluläre Barriere, nur unzureichend durchdrungen wird. Es wurde beobachtet, dass nur ca. 0,1-0,2 % der applizierten Antikörper im Hirn nachgewiesen werden können. Offensichtlich genügt diese geringe Konzentration im Hirn jedoch, um die Phagozytose durch Antikörper auszulösen. Allerdings führt dies auch dazu, dass sehr hohe Konzentrationen appliziert werden müssen, um eine Wirksamkeit zu erzielen. Die periphere Belastung ist dadurch erhöht und es steigt das Risiko von Nebenwirkungen wie z.B. Bildung von Ödemen. Auch hier ist die spezifische Erkennung von pGlu-A β mutmaßlich von Vorteil, da das Peptid nur im Hirn vorkommt und keine Bindung in Blut bzw. peripheren Organen zu erwarten ist. Dies könnte zu einer Verringerung der Dosis und möglicher Nebenwirkungen beitragen. Tatsächlich wurde in ersten Studien mit einem pGlu-A β Antikörper keine Dosisabhängigkeit beobachtet (*Frost et al., 2015*). Dieses Ergebnis könnte die Schlussfolgerung zulassen, dass eine Absättigung der pGlu-A β -Epitope

und eine maximale Wirkung bereits bei geringerer Dosierung im Vergleich zu anderen Antikörpern erreicht werden kann.

3. Die Penetration der Blut-Hirn Schranke und somit das Erreichen einer effektiven Wirkstoffkonzentration am Wirkort konnte für niedermolekulare Inhibitoren der QC nachgewiesen werden (*Hoffmann et al., 2017*). Die Hemmung der Glutaminyl-Cyclase im ZNS hat *de facto* den Nachteil, dass auch die Synthese verschiedener pGlu-Peptidhormone, z.B. TRH und GnRH sowie Neurensin, beeinflusst werden könnte. Wie bereits in Kapitel 3 dargelegt, ruft ein *knockout* von QC, offensichtlich aufgrund eines Einflusses auf die Reifung von TRH, den Phänotyp einer milden Hypothyreose hervor. Der Phänotyp trat jedoch nur bei Tieren mit homozygotem Hintergrund auf. Ebenfalls zeigten Tiere, denen der QC-Inhibitor PQ912 weit oberhalb einer effektiven Dosierung zur Verhinderung der pGlu-A β Bildung verabreicht wurde, keine Hypothyreose (*Hoffmann et al., 2017*). Ursache für diese scheinbare Spezifität der Wirkung von QC-Inhibitoren für die Unterdrückung der pGlu-Bildung aus Glutamat könnte die bevorzugte Umsetzung von Glutaminylsubstraten durch das Enzym sein, da die Spezifitätskonstanten des Umsatzes von Glutamin und Glutamat mehrere Größenordnungen auseinander liegen. Daher sind offenbar geringere Konzentrationen des Inhibitors notwendig, um eine Absenkung der pGlu-A β -Bildung zu erreichen. Dies konnte im zellulären Modell bestätigt werden (*Hoffmann et al., 2017*). Dementsprechend wurde die HPT-Achse auch in klinischen Studien nicht beeinträchtigt (unpublizierte Daten).
4. Eine weitere Eigenschaft, hinsichtlich der sich die beiden Ansätze zur Verringerung der pGlu3-A β -Bildung unterscheiden, ist die mögliche Stimulation einer Entzündungsreaktion nach Wirkstoffgabe. Während eine Gabe von QC-Inhibitoren, wie in Kapitel 3 dargelegt, aufgrund der Unterdrückung der Reifung von Chemokinen eine anti-inflammatorische Wirkung ausübt, stimulieren Antikörper durch die Bindung an phagozytisch aktive Zellen einen Ausstoß von Cytokinen. Es ist noch unklar, inwieweit dies eine Neuronenschädigung hervorrufen könnte. Die Fähigkeit zur Auslösung der pro-inflammatorischen Cytokinfreisetzung unterscheidet sich bei den verschiedenen Antikörperklassen und auch bei IgG-Subtypen, die bei der Immuntherapie bevorzugt sind. Einige Antikörper, die sich zurzeit in der klinischen Entwicklung befinden, weisen daher einen IgG4-Subtyp auf, welcher eine verringerte Effektorfunktion aufweist. Es ist jedoch noch unklar, inwieweit eine effektive Bindung von A β -Antikörper-Komplexen für den Abbau und die neuroprotektive

Wirkung verantwortlich ist. Die Antikörper, die eine kognitive Stabilisierung in klinischen Studien bewirken konnten, wiesen einen IgG1-Subtyp auf.

5. Die Bildung von pGlu tritt nicht nur an Position 3 des A β -Peptides auf, sondern auch an Position 11 (siehe auch Abbildung 9). Die Bedeutung von pGlu-A β (11-x) ist im Gegensatz zu pGlu-A β (3-x) weit weniger gut untersucht worden. Die Hemmung der QC-Aktivität würde die Bildung von pGlu an beiden Positionen unterbinden, Antikörper wirken spezifisch.

Die vorangegangenen Ausführungen legen dar, dass eine Unterdrückung der pGlu3-A β -Anreicherung mittels verschiedener Mechanismen möglich ist. Sowohl die Bindung durch Antikörper als auch die Hemmung des Enzyms QC weisen dabei potentielle Nachteile auf, deren Relevanz für einen Erfolg in der klinischen Phase der Testung auf Basis des derzeitigen Wissensstandes keinen der Ansätze klar bevorzugt. Aufgrund des unterschiedlichen Potentials für mögliche Nebenwirkungen, dies betrifft die Spezifität der Wirkung (siehe Punkt 3) und die Stimulation einer pro-inflammatorischen Reaktion (siehe Punkt 4), könnte eine auf einer simultanen Gabe von Antikörper und QC-Inhibitor basierende Kombinationstherapie eine mögliche Strategie darstellen. Dadurch wäre eine niedrigere Dosierung der jeweiligen Komponente verbunden mit einer Minimierung der Nebenwirkungen vorstellbar. Dieser Ansatz wird zurzeit durch die Probiobdrug AG in präklinischen Untersuchungen evaluiert.

Zitierte Beiträge mit eigener Beteiligung

Frost JL, Liu B, Rahfeld JU, Kleinschmidt M, O’Nuallain B, Le KX, Lues I, Caldarone BJ, Schilling S, Demuth HU, Lemere CA*. **An anti-pyroglutamate-3 A β vaccine reduces plaques and improves cognition in APP^{swE}/PS1 Δ E9 mice.** Neurobiol Aging. 2015, 36, 3187-99.

Hoffmann T, Meyer A, Heiser U, Kurat S, Böhme L, Kleinschmidt M, Bühring KU, Hutter-Paier B, Farcher M, Demuth HU, Lues I*, Schilling S. **Glutamyl Cyclase Inhibitor PQ912 Improves Cognition in Mouse Models of Alzheimer's Disease-Studies on Relation to Effective Target Occupancy.** J Pharmacol Exp Ther, 2017, 362, 119-130.

6 Zusammenfassung

Die weltweit steigende Lebenserwartung bedingt eine Zunahme von neurodegenerativen Erkrankungen, allen voran der Alzheimer-Krankheit (AD). Zurzeit stehen keine Therapien zur Verfügung, welche den fortschreitenden Nervenzellverlust aufhalten könnten. Die Alzheimer-Krankheit ist durch die Ablagerung der Proteine A β und Tau im Hirn der Patienten gekennzeichnet. Zahlreiche Untersuchungen weisen auf posttranslationale Modifikationen, z.B. durch Phosphorylierung, Nitrierung oder Pyroglutamat-Bildung (pGlu-), dieser Peptide hin. Diese Veränderungen können die Ablagerung beschleunigen, sie stehen daher mutmaßlich mit dem Fortschreiten der Demenz in einem kausalen Zusammenhang.

Die posttranslationale Modifikation ist ein wesentlicher Mechanismus zur Regulation der biologischen Funktion von Proteinen und Peptiden. Darüber können z.B. zelluläre Signalkaskaden gesteuert, die Genaktivität reguliert oder auch Enzyme aktiviert oder gehemmt werden. Die Regulation beruht dabei vorwiegend auf der Veränderung von biochemischen Eigenschaften der Proteine, z.B. der Struktur und Ladung oder der Hydrophobizität. Genau diese Eigenschaften spielen offenbar auch eine Rolle bei Proteinfaltungserkrankungen wie AD. Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die Bildung und Funktion N-terminaler Modifikationen von Amyloidpeptiden zu untersuchen und daraus mögliche Strategien für eine therapeutische Intervention abzuleiten. Im Vordergrund stand dabei die Entstehung pGlu-modifizierter Peptide. Die wesentlichen Ergebnisse dieser Untersuchungen waren:

1. Die N-terminale pGlu-Modifikation beschleunigt die Aggregation der Amyloidpeptide A β , ADan und ABri. Am Beispiel von pGlu-A β (3-40/42) wurde gezeigt, dass das Peptid im Vergleich zu nicht-modifizierten Formen beschleunigt neurotoxische Oligomere ausbildet, was offensichtlich auf eine gesteigerte Hydrophobizität des Peptides zurückzuführen ist. Die Struktur sowie die neurotoxischen Eigenschaften der pGlu-A β -Oligomere können auf andere Spezies übertragen werden, wie Untersuchungen zur Co-Aggregation aufgezeigt haben. Diese Struktur-Wirkungsbeziehung bildet die wesentliche Grundlage für eine Ableitung von Strategien einer therapeutischen Intervention bei neurodegenerativen Erkrankungen, die auf der Verhinderung der Bildung bzw. Bindung der modifizierten Peptide beruht.
2. Die Bildung von pGlu am N-Terminus von A β ist enzymkatalysiert. Das Enzym Glutaminyl-Cyclase (QC) katalysiert die Cyclisierung von Glutamylresten am N-Terminus von A β . Eine Überexpression von QC in transgenen Mäusen verstärkt die

Anreicherung von pGlu-A β und induziert Verhaltensstörungen. Ein *knockout* von QC in Mäusen verringert die pGlu-Bildung. Diese QC *knockout*-Mäuse zeigen jedoch kaum phänotypische Veränderungen, was einer Hemmung von QC als pharmakologischem Prinzip nicht entgegensteht.

3. Die Gabe von QC-Inhibitoren verhindert die Bildung von pGlu-A β in zellulären Modellsystemen sowie in transgenen Tieren. Eine intrazerebrale Injektion oder die orale Applikation des QC-Inhibitors PBD150 bewirkt eine Reduktion von pGlu- sowie Gesamt-A β in den zwei transgenen Mausmodellen T ASD41 und Tg2576. Behandelte transgene Mäuse weisen zudem ein verbessertes Lernvermögen und Gedächtnis auf.
4. Glutaminyl-Cyclasen kommen in Isoformen vor. Erstmals wurden Glutaminyl-Cyclasen von Invertebraten sowie einheimischen Pflanzen isoliert und charakterisiert. *Drosophila* bildet zwei QCs, ein mitochondrial lokalisiertes und ein sezerniertes Enzym. Die QCs der Säuger werden sezerniert (QC) oder im Golgi-Apparat (isoQC) zurückgehalten. Die Retention im Golgi-Apparat wird, zumindest partiell, über eine Sequenz im cytosolischen Bereich des Transmembranproteins vermittelt. Der Mechanismus beruht auf einer Interaktion mit dem *Golgi phosphoprotein 3* (GOLPH3).
5. Die unterschiedliche Lokalisation der QC-Isoenzyme von Säugern bedingt eine differentielle Substratumsetzung innerhalb der Zelle. Anhand von QC- und isoQC-*knockout*-Mäusen konnte gezeigt werden, dass QC unter physiologischen Bedingungen Peptide im regulierten sekretorischen Weg umsetzt, welche einer Prozessierung durch Prohormon-Convertasen unterliegen. IsoQC hingegen setzt vorwiegend Substrate um, deren Präkursor nur durch Signalpeptidase-Spaltung generiert wird und daher im Golgi-Apparat durch das Enzym umgesetzt werden kann. Das bei entzündlichen Prozessen und Gewebeschädigung stimulierte Chemokin CCL2 ist ein Substrat der isoQC. Der QC-Inhibitor PBD150 hemmt, vermittelt über die Unterdrückung der Reifung von CCL2, die Einwanderung von Monocyten in geschädigtes Gewebe.
6. Die Bildung von CCL2 und pGlu-A β sind bei der Pathogenese der AD mutmaßlich kausal miteinander verknüpft. In zellulären Modellen konnte gezeigt werden, dass eine pro-inflammatorische Stimulation von Astrocyten, z.B. durch A β -Peptide, zur erhöhten Expression von QC und CCL2 führt. Die Expression von QC ist bei AD im Hirn signifikant erhöht. Vermutlich hängt die Stimulation von QC mit der verstärkten Expression von z.B. CCL2 und TRH zusammen. Als Folge der verstärkten Bildung von QC entsteht jedoch auch neurotoxisches pGlu-A β , das sich im Verlauf der

Erkrankung anreichert. Eine Hemmung von QC und isoQC könnte somit zur Unterdrückung der Inflammation und der Bildung von pGlu-A β führen.

7. Monoklonale Antikörper, die gegen pGlu-A β (3-x) gerichtet sind, zeigen eine analoge Wirkung wie QC-Inhibitoren in transgenen Mäusen mit Alzheimer-Pathologie. Die Applikation von spezifischen monoklonalen Antikörpern im transgenen Mausmodell reduzierte A β -Ablagerungen und bewirkte eine Verbesserung des räumlichen Gedächtnisses. Die Ergebnisse stützen die Hypothese, dass modifizierte Peptide, obgleich diese nicht die Hauptspezies darstellen, eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von AD spielen könnten.
8. N-terminale Aspartyl- und Asparaginyln-Reste neigen zur Bildung von Isoaspartat. Die Untersuchungen weisen darauf hin, dass eine N-terminale isoAsp-Entstehung aus Aspartat gegenüber der nicht-enzymkatalysierten Bildung von pGlu schneller verläuft. Die in den menschlichen Amyloidablagerungen vorzufindenden, am N-Terminus durch isoAsp modifizierten A β -Peptide entstehen somit wahrscheinlich nach der Freisetzung von A β aus dem Vorläuferprotein APP.

In der vorliegenden Arbeit konnten somit neue Erkenntnisse in Bezug auf die Bildung und die Rolle N-terminaler Modifikationen von Proteinen und Peptiden gewonnen werden. Die Untersuchungen mündeten in der Ableitung von neuen Wirkmechanismen, die auf der Unterbindung der N-terminalen pGlu-Modifikation durch Hemmung des modifizierenden Enzyms oder der spezifischen Bindung der modifizierten Peptide durch Antikörper beruhen. Beide Ansätze wurden in präklinischen Studien erfolgreich getestet, derzeit befindet sich ein QC-Inhibitor in der klinischen Prüfung am Menschen.

7 Literaturverzeichnis

1. 2014 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* **10**, e47-e92.
2. Aarsland D., Zuccai J., and Brayne C. (2005) A systematic review of prevalence studies of dementia in Parkinson's disease. *Mov Disord* **20**, 1255-1263.
3. Abraham G. N. and 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 Spec No**, 181-190.
4. Aguzzi A. and O'Connor T. (2010) Protein aggregation diseases: pathogenicity and therapeutic perspectives. *Nat Rev Drug Discov* **9**, 237-248.
5. Aguzzi A. and Falsig J. (2012) Prion propagation, toxicity and degradation. *Nat Neurosci* **15**, 936-939.
6. Aguzzi A. and Lakkaraju A. K. (2016) Cell Biology of Prions and Prionoids: A Status Report. *Trends Cell Biol* 2016 **26**, 40-51.
7. Alfaro J. F., Gillies L. A., Sun H. G., Dai S., Zang T., Klaene J. J., Kim B. J., Lowenson J. D., Clarke S. G., Karger B. L., and Zhou Z. S. (2008) Chemo-enzymatic detection of protein isoaspartate using protein isoaspartate methyltransferase and hydrazine trapping. *Anal Chem* **80**, 3882-3889.
8. Ashby E. L., Miners J. S., Kumar S., Walter J., Love S., and Kehoe P. G. (2015) Investigation of Abeta phosphorylated at serine 8 (pAbeta) in Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies and vascular dementia. *Neuropathol Appl Neurobiol* **41**, 428-444.
9. Aswad D. W., Paranandi M. V., and Schurter B. T. (2000) Isoaspartate in peptides and proteins: formation, significance, and analysis. *J Pharm Biomed Anal* **21**, 1129-1136.
10. Awade A. C., Cleuziat P., Gonzales T., and 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.
11. Azarkan M., Clantin B., Bompard C., Belrhali H., Baeyens-Volant D., Looze Y., Villeret V., and Wintjens R. (2005) Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the glutaminyl cyclase from *Carica papaya* latex. *Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun* **61**, 59-61.
12. Bang J., Spina S., and Miller B. L. (2015) Frontotemporal dementia. *Lancet* **386**, 1672-1682.

13. Bateman A., Solomon S., and Bennett H. P. (1990) Post-translational modification of bovine pro-opiomelanocortin. Tyrosine sulfation and pyroglutamate formation, a mass spectrometric study. *J Biol Chem* **265**, 22130-22136.
14. Bateman R. J., Xiong C., Benzinger T. L., Fagan A. M., Goate A., Fox N. C., Marcus D. S., Cairns N. J., Xie X., Blazey T. M., Holtzman D. M., Santacruz A., Buckles V., Oliver A., Moulder K., Aisen P. S., Ghetti B., Klunk W. E., McDade E., Martins R. N., Masters C. L., Mayeux R., Ringman J. M., Rossor M. N., Schofield P. R., Sperling R. A., Salloway S., and Morris J. C. (2012) Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *N Engl J Med* **367**, 795-804.
15. Becker A., Eichentopf R., Sedlmeier R., Waniek A., Cynis H., Koch B., Stephan A., Bauscher C., Kohlmann S., Hoffmann T., Kehlen A., Berg S., Freyse E. J., Osmand A., Plank A. C., Rossner S., von Horsten S., Graubner S., Demuth H. U., and Schilling S. (2016) IsoQC (QPCTL) knock-out mice suggest differential substrate conversion by glutaminyl cyclase isoenzymes. *Biol Chem* **397**, 45-55.
16. Bicker J., Alves G., Fortuna A., and Falcao A. (2014) Blood-brain barrier models and their relevance for a successful development of CNS drug delivery systems: a review. *Eur J Pharm Biopharm* **87**, 409-432.
17. Bien J., Jefferson T., Causevic M., Jumpertz T., Munter L., Multhaup G., Weggen S., Becker-Pauly C., and Pietrzik C. U. (2012) The metalloprotease meprin beta generates amino terminal-truncated amyloid beta peptide species. *J Biol Chem* **287**, 33304-33313.
18. Blennow K., Zetterberg H., and Fagan A. M. (2012a) Fluid biomarkers in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, a006221.
19. Blennow K., Zetterberg H., Rinne J. O., Salloway S., Wei J., Black R., Grundman M., and Liu E. (2012b) Effect of immunotherapy with bapineuzumab on cerebrospinal fluid biomarker levels in patients with mild to moderate Alzheimer disease. *Arch Neurol* **69**, 1002-1010.
20. Blennow K., Dubois B., Fagan A. M., Lewczuk P., de Leon M. J., and Hampel H. (2015) Clinical utility of cerebrospinal fluid biomarkers in the diagnosis of early Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* **11**, 58-69.
21. Bockers T. M., Kreutz M. R., and Pohl T. (1995) Glutaminyl-cyclase expression in the bovine/porcine hypothalamus and pituitary. *J Neuroendocrinol* **7**, 445-453.

22. Böhme L., Bär J. W., Hoffmann T., Manhart S., Ludwig H. H., Rosche F., and Demuth H. U. (2008a) Isoaspartate residues dramatically influence substrate recognition and turnover by proteases. *Biol Chem* **389**, 1043-1053.
23. Böhme L., Hoffmann T., Manhart S., Wolf R., and Demuth H. U. (2008b) Isoaspartate-containing amyloid precursor protein-derived peptides alter efficacy and specificity of potential beta-secretases. *Biol Chem* **389**, 1055-1066.
24. Bolognesi B., Kumita J. R., Barros T. P., Esbjorner E. K., Luheshi L. M., Crowther D. C., Wilson M. R., Dobson C. M., Favrin G., and Yerbury J. J. (2010) ANS binding reveals common features of cytotoxic amyloid species. *ACS Chem Biol* **5**, 735-740.
25. Booth R. E., Lovell S. C., Misquitta S. A., and Bateman R. C., Jr. (2004) Human glutaminyl cyclase and bacterial zinc aminopeptidase share a common fold and active site. *BMC Biol* **2**, 2.
26. Brookmeyer R., Johnson E., Ziegler-Graham K., and Arrighi H. M. (2007) Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* **3**, 186-191.
27. Buchholz M., Heiser U., Schilling S., Niestroj A. J., Zunkel K., and Demuth H. U. (2006) The first potent inhibitors for human glutaminyl cyclase: synthesis and structure-activity relationship. *J Med Chem* **49**, 664-677.
28. Buchholz M., Hamann A., Aust S., Brandt W., Bohme L., Hoffmann T., Schilling S., Demuth H. U., and Heiser U. (2009) Inhibitors for human glutaminyl cyclase by structure based design and bioisosteric replacement. *J Med Chem* **52**, 7069-7080.
29. Burns A. and Iliffe S. (2009a) Alzheimer's disease. *BMJ* **338**, b158.
30. Burns A. and Iliffe S. (2009b) Dementia. *BMJ* **338**, b75.
31. Campioni S., Mannini B., Zampagni M., Pensalfini A., Parrini C., Evangelisti E., Relini A., Stefani M., Dobson C. M., Cecchi C., and Chiti F. (2010) A causative link between the structure of aberrant protein oligomers and their toxicity. *Nat Chem Biol* **6**, 140-147.
32. 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., and Rahfeld J. U. (2010) Kinetic and structural characterization of bacterial glutaminyl cyclases from *Zymomonas mobilis* and *Myxococcus xanthus*. *Biol Chem* **391**, 1419-1428.
33. Carter M. D., Simms G. A., and Weaver D. F. (2010) The development of new therapeutics for Alzheimer's disease. *Clin Pharmacol Ther* **88**, 475-486.
34. Charo I. F. and Taubman M. B. (2004) Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res* **95**, 858-866.

35. Charo I. F. and Ransohoff R. M. (2006) The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* **354**, 610-621.
36. Charo I. F. and Taub R. (2011) Anti-inflammatory therapeutics for the treatment of atherosclerosis. *Nat Rev Drug Discov* **10**, 365-376.
37. Christensen H. N. (1988) Amino acids are not un-charged (lipid-soluble) substances. Why we might as well forget pyroglutamate as an amino acid. *Trends Pharmacol Sci* **9**, 430.
38. Clarke S. (1985) Protein carboxyl methyltransferases: two distinct classes of enzymes. *Annu Rev Biochem* **54**, 479-506.
39. Clarke S. (2003) Aging as war between chemical and biochemical processes: protein methylation and the recognition of age-damaged proteins for repair. *Ageing Res Rev* **2**, 263-285.
40. Clavaguera F., Bolmont T., Crowther R. A., Abramowski D., Frank S., Probst A., Fraser G., Stalder A. K., Beibel M., Staufenbiel M., Jucker M., Goedert M., and Tolnay M. (2009) Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol* **11**, 909-913.
41. Click E. M. and 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.
42. Colley K. J. (1997) Golgi localization of glycosyltransferases: more questions than answers. *Glycobiology* **7**, 1-13.
43. Corti A. and Curnis F. (2011) Isoaspartate-dependent molecular switches for integrin-ligand recognition. *J Cell Sci* **124**, 515-522.
44. Cruz I. P. and Nillni E. A. (1996) Intracellular sites of prothyrotropin-releasing hormone processing. *J Biol Chem* **271**, 22736-22745.
45. Cummins P. M. and O'Connor B. (1998) Pyroglutamyl peptidase: an overview of the three known enzymatic forms. *Biochim Biophys Acta* **1429**, 1-17.
46. Cynis H., Rahfeld J. U., Stephan A., Kehlen A., Koch B., Wermann M., Demuth H. U., and 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.
47. Cynis H., Scheel E., Saido T. C., Schilling S., and 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.
48. 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., Muller 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., and 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.
 49. Cynis H., Kehlen A., Haegele M., Hoffmann T., Heiser U., Fujii M., Shibazaki Y., Yoneyama H., Schilling S., and 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.
 50. Dana C. M., Dotson-Fagerstrom A., Roche C. M., Kal S. M., Chokhawala H. A., Blanch H. W., and Clark D. S. (2014) The importance of pyroglutamate in cellulase Cel7A. *Biotechnol Bioeng* **111**, 842-847.
 51. De Kimpe L., Bennis A., Zwart R., van Haastert E. S., Hoozemans J. J., and Scheper W. (2012) Disturbed Ca²⁺ homeostasis increases glutaminyl cyclase expression; connecting two early pathogenic events in Alzheimer's disease in vitro. *PLoS One* **7**, e44674.
 52. De Strooper B. (2010) Proteases and proteolysis in Alzheimer disease: a multifactorial view on the disease process. *Physiol Rev* **90**, 465-494.
 53. Dippold H. C., Ng M. M., Farber-Katz S. E., Lee S. K., Kerr M. L., Peterman M. C., Sim R., Wiharto P. A., Galbraith K. A., Madhavarapu S., Fuchs G. J., Meerloo T., Farquhar M. G., Zhou H., and Field S. J. (2009) GOLPH3 bridges phosphatidylinositol-4-phosphate and actomyosin to stretch and shape the Golgi to promote budding. *Cell* **139**, 337-351.
 54. Ehrnhoefer D. E., Wong B. K., and Hayden M. R. (2011) Convergent pathogenic pathways in Alzheimer's and Huntington's diseases: shared targets for drug development. *Nat Rev Drug Discov* **10**, 853-867.
 55. El Moussaoui A., Nijs M., Paul C., Wintjens R., Vincentelli J., Azarkan M., and 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.

56. Eldjarn L., Jellum E., and Stokke O. (1972) Pyroglutamic aciduria: studies on the enzymic block and on the metabolic origin of pyroglutamic acid. *Clin Chim Acta* **40**, 461-476.
57. Eldjarn L., Jellum E., and Stokke O. (1973) Pyroglutamic aciduria: rate of formation and degradation of pyroglutamate. *Clin Chim Acta* **49**, 311-323.
58. Extance A. (2010) Alzheimer's failure raises questions about disease-modifying strategies. *Nat Rev Drug Discov* **9**, 749-751.
59. Fenteany F. H. and Colley K. J. (2005) Multiple signals are required for alpha2,6-sialyltransferase (ST6Gal I) oligomerization and Golgi localization. *J Biol Chem* **280**, 5423-5429.
60. Franco M. C. and Estevez A. G. (2014) Tyrosine nitration as mediator of cell death. *Cell Mol Life Sci* **71**, 3939-3950.
61. Friedman T. C., Loh Y. P., Cawley N. X., Birch N. P., Huang S. S., Jackson I. M., and Nillni E. A. (1995) Processing of prothyrotropin-releasing hormone (Pro-TRH) by bovine intermediate lobe secretory vesicle membrane PC1 and PC2 enzymes. *Endocrinology* **136**, 4462-4472.
62. Frost J. L., Liu B., Kleinschmidt M., Schilling S., Demuth H. U., and Lemere C. A. (2012) Passive immunization against pyroglutamate-3 amyloid-beta reduces plaque burden in Alzheimer-like transgenic mice: a pilot study. *Neurodegener Dis* **10**, 265-270.
63. Frost J. L., Liu B., Rahfeld J. U., Kleinschmidt M., O'Nuallain B., Le K. X., Lues I., Caldarone B. J., Schilling S., Demuth H. U., and Lemere C. A. (2015) An anti-pyroglutamate-3 Abeta vaccine reduces plaques and improves cognition in APP^{swe}/PS1^{DeltaE9} mice. *Neurobiol Aging* **36**, 3187-3199.
64. Galimberti D., Fenoglio C., Lovati C., Venturelli E., Guidi I., Corra B., Scalabrini D., Clerici F., Mariani C., Bresolin N., and Scarpini E. (2006a) Serum MCP-1 levels are increased in mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **27**, 1763-1768.
65. Galimberti D., Schoonenboom N., Scheltens P., Fenoglio C., Bouwman F., Venturelli E., Guidi I., Blankenstein M. A., Bresolin N., and Scarpini E. (2006b) Intrathecal chemokine synthesis in mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Arch Neurol* **63**, 538-543.

66. Garcia-Pardo A., Pearlstein E., and Frangione B. (1983) Primary structure of human plasma fibronectin. The 29,000-dalton NH₂-terminal domain. *J Biol Chem* **258**, 12670-12674.
67. Geiger T. and Clarke S. (1987) Deamidation, isomerization, and racemization at asparaginyl and aspartyl residues in peptides. Succinimide-linked reactions that contribute to protein degradation. *J Biol Chem* **262**, 785-794.
68. George-Nascimento C., Lowenson J., Borissenko M., Calderon M., Medina-Selby A., Kuo J., Clarke S., and Randolph A. (1990) Replacement of a labile aspartyl residue increases the stability of human epidermal growth factor. *Biochemistry* **29**, 9584-9591.
69. Giacobini E. and Gold G. (2013) Alzheimer disease therapy--moving from amyloid-beta to tau. *Nat Rev Neurol* **9**, 677-686.
70. Gilbert J. B., Price V. E., and Greenstein J. P. (1949) Effect of anions on the non-enzymatic desamidation of glutamine. *J Biol Chem* **180**, 209-218.
71. Golde T. E. (2014) Open questions for Alzheimer's disease immunotherapy. *Alzheimers Res Ther* **6**, 3.
72. Gong J. H. and Clark-Lewis I. (1995) Antagonists of monocyte chemoattractant protein 1 identified by modification of functionally critical NH₂-terminal residues. *J Exp Med* **181**, 631-640.
73. Goren H. J., Bauce L. G., and 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.
74. Guevara T., Mallorqui-Fernandez N., Garcia-Castellanos R., Garcia-Pique S., Ebert P. G., Lauritzen C., Pedersen J., Arnau J., Gomis-Ruth F. X., and Sola M. (2006) Papaya glutamine cyclotransferase shows a singular five-fold beta-propeller architecture that suggests a novel reaction mechanism. *Biol Chem* **387**, 1479-1486.
75. Guntert A., Dobeli H., and Bohrmann B. (2006) High sensitivity analysis of amyloid-beta peptide composition in amyloid deposits from human and PS2APP mouse brain. *Neuroscience* **143**, 461-475.
76. Güttler B. H., Cynis H., Seifert F., Ludwig H. H., Porzel A., and Schilling S. (2013) A quantitative analysis of spontaneous isoaspartate formation from N-terminal asparaginyl and aspartyl residues. *Amino Acids* **44**, 1205-1214.
77. Hägele, M. (2012) Physiologische Relevanz der Pyroglutamat-Bildung am N-Terminus von CCL2 und CX3CL1. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

78. Haitinger L. (1882) Vorläufige Mittheilung über Glutaminsäure und Pyrrol. *Monatsh Chem* **3**, 228-229.
79. Hartlage-Rubsamen M., Waniek A., Meissner J., Morawski M., Schilling S., Jager C., Kleinschmidt M., Cynis H., Kehlen A., Arendt T., Demuth H. U., and Rossner S. (2015) Isoglutaminyl cyclase contributes to CCL2-driven neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* **129**, 565-583.
80. Hazenberg B. P. (2013) Amyloidosis: a clinical overview. *Rheum Dis Clin North Am* **39**, 323-345.
81. He W. and Barrow C. J. (1999) The A beta 3-pyroglutamyl and 11-pyroglutamyl peptides found in senile plaque have greater beta-sheet forming and aggregation propensities in vitro than full-length A beta. *Biochemistry* **38**, 10871-10877.
82. Hebert L. E., Weuve J., Scherr P. A., and Evans D. A. (2013) Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 census. *Neurology* **80**, 1778-1783.
83. Hellvard A., Maresz K., Schilling S., Graubner S., Heiser U., Jonsson R., Cynis H., Demuth H. U., Potempa J., and Mydel P. (2013) Glutaminyl cyclases as novel targets for the treatment of septic arthritis. *J Infect Dis* **207**, 768-777.
84. Hoffmann, T., Meyer, A., Heiser, U., Kurat, S., Böhme, L., Kleinschmidt, M., Bühring, K.U., Hutter-Paier, B., Farcher, M., Demuth, H.U., Lues, I., and Schilling, S. (2017) Glutaminyl Cyclase Inhibitor PQ912 Improves Cognition in Mouse Models of Alzheimer's Disease-Studies on Relation to Effective Target Occupancy. *J Pharmacol Exp Ther* **362**, 119-130.
85. Horlein D., Fietzek P. P., Wachter E., Lapiere C. M., and Kuhn K. (1979) Amino acid sequence of the aminoterminal segment of dermatosparactic calf-skin procollagen type I. *Eur J Biochem* **99**, 31-38.
86. Hosoda R., Saido T. C., Otvos L. J., Arai T., Mann D. M., Lee V. M., Trojanowski J. Q., and Iwatsubo T. (1998) Quantification of modified amyloid beta peptides in Alzheimer disease and Down syndrome brains. *J Neuropathol Exp Neurol* **57**, 1089-1095.
87. Huang K. F., Liu Y. L., Cheng W. J., Ko T. P., and 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.

88. Huang W. L., Wang Y. R., Ko T. P., Chia C. Y., Huang K. F., and Wang A. H. (2010) Crystal structure and functional analysis of the glutaminyl cyclase from *Xanthomonas campestris*. *J Mol Biol* **401**, 374-388.
89. Hubbard R. E. (2011) Structure-based drug discovery and protein targets in the CNS. *Neuropharmacology* **60**, 7-23.
90. Hugo J. and Ganguli M. (2014) Dementia and cognitive impairment: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Clin Geriatr Med* **30**, 421-442.
91. Iqbal K., Liu F., and Gong C. X. (2016) Tau and neurodegenerative disease: the story so far. *Nat Rev Neurol*. **12**, 15-27.
92. Iwatsubo T., Odaka A., Suzuki N., Mizusawa H., Nukina N., and Ihara Y. (1994) Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron* **13**, 45-53.
93. Iwatsubo T., Mann D. M., Odaka A., Suzuki N., and Ihara Y. (1995) Amyloid beta protein (A beta) deposition: A beta 42(43) precedes A beta 40 in Down syndrome. *Ann Neurol* **37**, 294-299.
94. Jack C. R., Jr., Knopman D. S., Jagust W. J., Shaw L. M., Aisen P. S., Weiner M. W., Petersen R. C., and Trojanowski J. Q. (2010) Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol* **9**, 119-128.
95. Jack C. R., Jr. (2012) Alzheimer disease: new concepts on its neurobiology and the clinical role imaging will play. *Radiology* **263**, 344-361.
96. Jawhar S., Wirths O., Schilling S., Graubner S., Demuth H. U., and Bayer T. A. (2011) 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.
97. Johnson K. A., Fox N. C., Sperling R. A., and Klunk W. E. (2012) Brain imaging in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, a006213.
98. Johnson R. T. (2005) Prion diseases. *Lancet Neurol* **4**, 635-642.
99. Karn R. C., Petersen T. E., Hjorth J. P., Nieves J. T., and Roepstorff P. (1981) Characterization of the amino termini of mouse salivary and pancreatic amylases. *FEBS Lett* **126**, 293-296.

100. Karten M. J. and Rivier J. E. (1986) Gonadotropin-releasing hormone analog design. Structure-function studies toward the development of agonists and antagonists: rationale and perspective. *Endocr Rev* **7**, 44-66.
101. Klein C. and Westenberger A. (2012) Genetics of Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, a008888.
102. Koch B., Kolenko P., Buchholz M., Carrillo D. R., Parthier C., Wermann M., Rahfeld J. U., Reuter G., Schilling S., Stubbs M. T., and 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.
103. Kumar S., Rezaei-Ghaleh N., Terwel D., Thal D. R., Richard M., Hoch M., McDonald J. M., Wullner U., Glebov K., Heneka M. T., Walsh D. M., Zweckstetter M., and Walter J. (2011) Extracellular phosphorylation of the amyloid beta-peptide promotes formation of toxic aggregates during the pathogenesis of Alzheimer's disease. *EMBO J* **30**, 2255-2265.
104. Kumar S. and Walter J. (2011) Phosphorylation of amyloid beta (A β) peptides - a trigger for formation of toxic aggregates in Alzheimer's disease. *Aging (Albany NY)* **3**, 803-812.
105. Kumar S., Singh S., Hinze D., Josten M., Sahl H. G., Siepmann M., and Walter J. (2012) Phosphorylation of amyloid-beta peptide at serine 8 attenuates its clearance via insulin-degrading and angiotensin-converting enzymes. *J Biol Chem* **287**, 8641-8651.
106. Kummer M. P., Hermes M., Delekarte A., Hammerschmidt T., Kumar S., Terwel D., Walter J., Pape H. C., König S., Roeber S., Jessen F., Klockgether T., Korte M., and Heneka M. T. (2011) Nitration of tyrosine 10 critically enhances amyloid beta aggregation and plaque formation. *Neuron* **71**, 833-844.
107. Kuo Y. M., Emmerling M. R., Woods A. S., Cotter R. J., and Roher A. E. (1997) Isolation, chemical characterization, and quantitation of A β 3-pyroglutanyl peptide from neuritic plaques and vascular amyloid deposits. *Biochem Biophys Res Commun* **237**, 188-191.
108. Laccone F., Engel U., Holinski-Feder E., Weigell-Weber M., Marczinek K., Nolte D., Morris-Rosendahl D. J., Zuhlke C., Fuchs K., Weirich-Schwaiger H., Schluter G., von Beust G., Vieira-Saecker A. M., Weber B. H., and Riess O. (1999) DNA analysis of Huntington's disease: five years of experience in Germany, Austria, and Switzerland. *Neurology* **53**, 801-806.

109. LaFerla F. M. and Green K. N. (2012) Animal models of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, a006320.
110. Lambert M. P., Barlow A. K., Chromy B. A., Edwards C., Freed R., Liosatos M., Morgan T. E., Rozovsky I., Trommer B., Viola K. L., Wals P., Zhang C., Finch C. E., Krafft G. A., and Klein W. L. (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6448-6453.
111. Landles C., Sathasivam K., Weiss A., Woodman B., Moffitt H., Finkbeiner S., Sun B., Gafni J., Ellerby L. M., Trotter Y., Richards W. G., Osmand A., Paganetti P., and Bates G. P. (2010) Proteolysis of mutant huntingtin produces an exon 1 fragment that accumulates as an aggregated protein in neuronal nuclei in Huntington disease. *J Biol Chem* **285**, 8808-8823.
112. Lange H. W. (2002) Morbus Huntington-Klinik, Diagnose und Therapie. In: *Psycho*, 28. Jg., S. 479-486.
113. Lemere C. A. and Masliah E. (2010) Can Alzheimer disease be prevented by amyloid-beta immunotherapy? *Nat Rev Neurol* **6**, 108-119.
114. Lipscomb W. N. and Strater N. (1996) Recent Advances in Zinc Enzymology. *Chem Rev* **96**, 2375-2434.
115. Lowenson J. D. and Clarke S. (1991) Structural elements affecting the recognition of L-isoaspartyl residues by the L-isoaspartyl/D-aspartyl protein methyltransferase. Implications for the repair hypothesis. *J Biol Chem* **266**, 19396-19406.
116. Lowenson J. D. and Clarke S. (1992) Recognition of D-aspartyl residues in polypeptides by the erythrocyte L-isoaspartyl/D-aspartyl protein methyltransferase. Implications for the repair hypothesis. *J Biol Chem* **267**, 5985-5995.
117. Lowenson J. D., Roher A. E., and Clarke S. (1994) Protein aging Extracellular amyloid formation and intracellular repair. *Trends Cardiovasc Med* **4**, 3-8.
118. Malencik D. A. and Anderson S. R. (1994) Dityrosine formation in calmodulin: conditions for intermolecular cross-linking. *Biochemistry* **33**, 13363-13372.
119. Malencik D. A. and Anderson S. R. (2003) Dityrosine as a product of oxidative stress and fluorescent probe. *Amino Acids* **25**, 233-247.
120. Mandler M., Walker L., Santic R., Hanson P., Upadhaya A. R., Colloby S. J., Morris C. M., Thal D. R., Thomas A. J., Schneeberger A., and Attems J. (2014) Pyroglutamylated amyloid-beta is associated with hyperphosphorylated tau and severity of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* **128**, 67-79.

121. Mason A. J., Hayflick J. S., Zoeller R. T., Young W. S., III, Phillips H. S., Nikolics K., and Seeburg P. H. (1986) A deletion truncating the gonadotropin-releasing hormone gene is responsible for hypogonadism in the hpg mouse. *Science* **234**, 1366-1371.
122. Matsubayashi Y. (2014) Posttranslationally modified small-peptide signals in plants. *Annu Rev Plant Biol* **65**, 385-413.
123. Meinwald Y. C., Stimson E. R., and Scheraga H. A. (1986) Deamidation of the asparaginyl-glycyl sequence. *Int J Pept Protein Res* **28**, 79-84.
124. Meister A. (1985) Glutamine synthetase from mammalian tissues. *Methods Enzymol* **113**, 185-199.
125. Menten P., Wuyts A., and Van Damme J. (2001) Monocyte chemotactic protein-3. *Eur Cytokine Netw* **12**, 554-560.
126. Messer M. (1963) Enzymatic cyclization of L-glutamine and L-glutaminyl peptides. *Nature* **4874**, 1299.
127. Momoi T., Suzuki M., Titani K., Hisanaga S., Ogawa H., and 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.
128. Morawski M., Schilling S., Kreuzberger M., Waniek A., Jager C., Koch B., Cynis H., Kehlen A., Arendt T., Hartlage-Rubsamen M., Demuth H. U., and 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.
129. Moret C. and Briley M. (1988) The "forgotten" amino acid pyroglutamate. *Trends Pharmacol Sci* **9**, 278-279.
130. Morty R. E., Bulau P., Pelle R., Wilk S., and 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.
131. Mowen K. A. and David M. (2014) Unconventional post-translational modifications in immunological signaling. *Nat Immunol* **15**, 512-520.
132. Munro S. and Pelham H. R. (1987) A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* **48**, 899-907.
133. Munro S. (1995) An investigation of the role of transmembrane domains in Golgi protein retention. *EMBO J* **14**, 4695-4704.

134. Nillni E. A., Sevarino K. A., and Jackson I. M. (1993) Processing of proTRH to its intermediate products occurs before the packing into secretory granules of transfected AtT20 cells. *Endocrinology* **132**, 1271-1277.
135. Nussbaum J. M., Schilling S., Cynis H., Silva A., Swanson E., Wangsanut T., Tayler K., Wiltgen B., Hatami A., Ronicke R., Reymann K., Hutter-Paier B., Alexandru A., Jagla W., Graubner S., Glabe C. G., Demuth H. U., and Bloom G. S. (2012) Prion-like behaviour and tau-dependent cytotoxicity of pyroglutamylated amyloid-beta. *Nature* **485**, 651-655.
136. Okada Y., Kitamura K., Baba Y., Arimura A., and Schally A. V. (1973) Luteinizing hormone-releasing hormone analogs lacking N-terminal pGlu ring structure. *Biochem Biophys Res Commun* **53**, 1180-1186.
137. Panee J. (2012) Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) in obesity and diabetes. *Cytokine* **60**, 1-12.
138. Parrish K. E., Sarkaria J. N., and Elmquist W. F. (2015) Improving drug delivery to primary and metastatic brain tumors: strategies to overcome the blood-brain barrier. *Clin Pharmacol Ther* **97**, 336-346.
139. Patel K. and Borchardt R. T. (1990) Chemical pathways of peptide degradation. III. Effect of primary sequence on the pathways of deamidation of asparaginyl residues in hexapeptides. *Pharm Res* **7**, 787-793.
140. Patterson G. H., Hirschberg K., Polishchuk R. S., Gerlich D., Phair R. D., and Lippincott-Schwartz J. (2008) Transport through the Golgi apparatus by rapid partitioning within a two-phase membrane system. *Cell* **133**, 1055-1067.
141. Paulson J. C. and Colley K. J. (1989) Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation. *J Biol Chem* **264**, 17615-17618.
142. Pedersen J. T. and Sigurdsson E. M. (2015) Tau immunotherapy for Alzheimer's disease. *Trends Mol Med* **21**, 394-402.
143. Prince M., Bryce R., Albanese E., Wimo A., Ribeiro W., and Ferri C. P. (2013) The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimers Dement* **9**, 63-75.
144. Prince, M., Albanese, E., Guerchet, M., and Prina, M. World Alzheimer report 2014. <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2014.pdf>. 2014.
145. Pringsheim T., Wiltshire K., Day L., Dykeman J., Steeves T., and Jette N. (2012) The incidence and prevalence of Huntington's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov Disord* **27**, 1083-1091.

146. Proost P., Struyf S., Couvreur M., Lenaerts J. P., Conings R., Menten P., Verhaert P., Wuyts A., and 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.
147. Puoti G., Bizzi A., Forloni G., Safar J. G., Tagliavini F., and Gambetti P. (2012) Sporadic human prion diseases: molecular insights and diagnosis. *Lancet Neurol* **11**, 618-628.
148. Puzzo D., Privitera L., Leznik E., Fa M., Staniszewski A., Palmeri A., and Arancio O. (2008) Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J Neurosci* **28**, 14537-14545.
149. Puzzo D., Privitera L., Fa' M., Staniszewski A., Hashimoto G., Aziz F., Sakurai M., Ribe E. M., Troy C. M., Mercken M., Jung S. S., Palmeri A., and Arancio O. (2011) Endogenous amyloid-beta is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory. *Ann Neurol* **69**, 819-830.
150. Puzzo D. and Arancio O. (2013) Amyloid-beta Peptide: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? *J Alzheimers Dis.* **33**, S111–S120.
151. Qian B. Z., Li J., Zhang H., Kitamura T., Zhang J., Campion L. R., Kaiser E. A., Snyder L. A., and Pollard J. W. (2011) CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* **475**, 222-225.
152. Querfurth H. W. and LaFerla F. M. (2010) Alzheimer's disease. *N Engl J Med* **362**, 329-344.
153. Ramasubbu N., Paloth V., Luo Y., Brayer G. D., and Levine M. J. (1996) Structure of human salivary alpha-amylase at 1.6 Å resolution: implications for its role in the oral cavity. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **52**, 435-446.
154. Ramsbeck D., Buchholz M., Koch B., Bohme L., Hoffmann T., Demuth H. U., and Heiser U. (2013) Structure-activity relationships of benzimidazole-based glutaminyl cyclase inhibitors featuring a heteroaryl scaffold. *J Med Chem* **56**, 6613-6625.
155. Rankovic Z. (2015) CNS drug design: balancing physicochemical properties for optimal brain exposure. *J Med Chem* **58**, 2584-2608.
156. Rauterberg J., Timpl R., and Furthmayr H. (1972) Structural characterization of N-terminal antigenic determinants in calf and human collagen. *Eur J Biochem* **27**, 231-237.

157. Rezaei-Ghaleh N., Amininasab M., Giller K., Kumar S., Stundl A., Schneider A., Becker S., Walter J., and Zweckstetter M. (2014) Turn plasticity distinguishes different modes of amyloid-beta aggregation. *J Am Chem Soc* **136**, 4913-4919.
158. Ribo M., Bosch M., Torrent G., Benito A., Beaumelle B., and Vilanova M. (2004) Quantitative analysis, using MALDI-TOF mass spectrometry, of the N-terminal hydrolysis and cyclization reactions of the activation process of onconase. *Eur J Biochem* **271**, 1163-1171.
159. Rijal U. A., Kosterin I., Kumar S., von Arnim C. A., Yamaguchi H., Fandrich M., Walter J., and Thal D. R. (2014) Biochemical stages of amyloid-beta peptide aggregation and accumulation in the human brain and their association with symptomatic and pathologically preclinical Alzheimer's disease. *Brain* **137**, 887-903.
160. Ringman J. M., Goate A., Masters C. L., Cairns N. J., Danek A., Graff-Radford N., Ghetti B., and Morris J. C. (2014) Genetic heterogeneity in Alzheimer disease and implications for treatment strategies. *Curr Neurol Neurosci Rep* **14**, 499.
161. Robinson A. B., McKerrow J. H., and Cary P. (1970) Controlled deamidation of peptides and proteins: an experimental hazard and a possible biological timer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **66**, 753-757.
162. Robinson A. B. and Rudd C. J. (1974) Deamidation of glutaminyl and asparaginyll residues in peptides and proteins. *Curr Top Cell Regul* **8**, 247-295.
163. Robinson N. E. and Robinson A. B. (2001) Molecular clocks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 944-949.
164. Roher A. E., Lowenson J. D., Clarke S., Wolkow C., Wang R., Cotter R. J., Reardon I. M., Zurcher N., Heinrikson R. L., and Ball M. J. (1993) Structural alterations in the peptide backbone of beta-amyloid core protein may account for its deposition and stability in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* **268**, 3072-3083.
165. Rollnik J. D. (2015) Huntington's disease. *Nervenarzt* **86**, 725-735.
166. Ross C. A. and Tabrizi S. J. (2011) Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurol* **10**, 83-98.
167. Rosso S. M., Donker K. L., Baks T., Joosse M., de K., I, Pijnenburg Y., de Jong D., Dooijes D., Kamphorst W., Ravid R., Niermeijer M. F., Verheij F., Kremer H. P., Scheltens P., van Duijn C. M., Heutink P., and van Swieten J. C. (2003) Frontotemporal dementia in The Netherlands: patient characteristics and prevalence estimates from a population-based study. *Brain* **126**, 2016-2022.

168. Rostagno A., Holton J. L., Lashley T., Revesz T., and Ghiso J. (2010) Cerebral amyloidosis: amyloid subunits, mutants and phenotypes. *Cell Mol Life Sci* **67**, 581-600.
169. 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., and Demuth H. U. (2011) Structures of glycosylated mammalian glutaminyl cyclases reveal conformational variability near the active center. *Biochemistry* **50**, 6280-6288.
170. Russo C., Saido T. C., DeBusk L. M., Tabaton M., Gambetti P., and Teller J. K. (1997) Heterogeneity of water-soluble amyloid beta-peptide in Alzheimer's disease and Down's syndrome brains. *FEBS Lett* **409**, 411-416.
171. Saido T. C., Iwatsubo T., Mann D. M., Shimada H., Ihara Y., and Kawashima S. (1995) Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, A beta N3(pE), in senile plaques. *Neuron* **14**, 457-466.
172. Saido T. C., Yamao H., Iwatsubo T., and Kawashima S. (1996) Amino- and carboxyl-terminal heterogeneity of beta-amyloid peptides deposited in human brain. *Neurosci Lett* **215**, 173-176.
173. Sambamurti K., Greig N. H., Utsuki T., Barnwell E. L., Sharma E., Mazell C., Bhat N. R., Kindy M. S., Lahiri D. K., and Pappolla M. A. (2011) Targets for AD treatment: conflicting messages from gamma-secretase inhibitors. *J Neurochem* **117**, 359-374.
174. Sanchez Mejia R. O. and Friedlander R. M. (2001) Caspases in Huntington's disease. *Neuroscientist* **7**, 480-489.
175. Sargaeva N. P., Lin C., and O'Connor P. B. (2011) Differentiating N-terminal aspartic and isoaspartic acid residues in peptides. *Anal Chem* **83**, 6675-6682.
176. Schapira A. H., Olanow C. W., Greenamyre J. T., and Bevard E. (2014) Slowing of neurodegeneration in Parkinson's disease and Huntington's disease: future therapeutic perspectives. *Lancet* **384**, 545-555.
177. Schenk D., Barbour R., Dunn W., Gordon G., Grajeda H., Guido T., Hu K., Huang J., Johnson-Wood K., Khan K., Kholodenko D., Lee M., Liao Z., Lieberburg I., Motter R., Mutter L., Soriano F., Shopp G., Vasquez N., Vandeventer C., Walker S., Wogulis M., Yednock T., Games D., and Seubert P. (1999) Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* **400**, 173-177.

178. Schenk D. B., Seubert P., Lieberburg I., and Wallace J. (2000) beta-peptide immunization: a possible new treatment for Alzheimer disease. *Arch Neurol* **57**, 934-936.
179. Schenk D. (2002) Amyloid-beta immunotherapy for Alzheimer's disease: the end of the beginning. *Nat Rev Neurosci* **3**, 824-828.
180. Schenk D., Basl G. S., and Pangalos M. N. (2012) Treatment strategies targeting amyloid beta-protein. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, a006387.
181. Schilling S., Hoffmann T., Rosche F., Manhart S., Wasternack C., and 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.
182. Schilling S., Manhart S., Hoffmann T., Ludwig H.-H., Wasternack C., and Demuth H.-U. (2003a) Substrate specificity of glutaminyl cyclases from plants and animals. *Biol Chem* **384**, 1583-1592.
183. Schilling S., Niestroj A. J., Rahfeld J.-U., Hoffmann T., Wermann M., Zunkel K., Wasternack C., and Demuth H.-U. (2003b) Identification of Human Glutaminyl Cyclase as a Metalloenzyme: Inhibition by Imidazole Derivatives and Heterocyclic Chelators. *J Biol Chem* **278**, 49773-49779.
184. Schilling S., Cynis H., von Bohlen A., Hoffmann T., Wermann M., Heiser U., Buchholz M., Zunkel K., and Demuth H. U. (2005) Isolation, catalytic properties, and competitive inhibitors of the zinc-dependent murine glutaminyl cyclase. *Biochemistry* **44**, 13415-13424.
185. Schilling S., Lauber T., Schaupp M., Manhart S., Scheel E., Bohm G., and Demuth H. U. (2006) On the seeding and oligomerization of pGlu-amyloid peptides (in vitro). *Biochemistry* **45**, 12393-12399.
186. Schilling S., Stenzel I., von Bohlen A., Wermann M., Schulz K., Demuth H. U., and Wasternack C. (2007a) Isolation and characterization of the glutaminyl cyclases from *Solanum tuberosum* and *Arabidopsis thaliana*: implications for physiological functions. *Biol Chem* **388**, 145-153.
187. Schilling S., Lindner C., Koch B., Wermann M., Rahfeld J. U., Bohlen A. V., Rudolph T., Reuter G., and Demuth H. U. (2007b) Isolation and Characterization of Glutaminyl Cyclases from *Drosophila*: Evidence for Enzyme Forms with Different Subcellular Localization. *Biochemistry* **46**, 10921-10930.

188. Schilling S., Wasternack C., and Demuth H. U. (2008a) Glutaminyl cyclases from animals and plants: a case of functionally convergent protein evolution. *Biol Chem* **389**, 983-991.
189. Schilling S., Appl T., Hoffmann T., Cynis H., Schulz K., Jagla W., Friedrich D., Wermann M., Buchholz M., Heiser U., von Horsten S., and 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.
190. 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., and Rossner S. (2008c) Glutaminyl cyclase inhibition attenuates pyroglutamate Abeta and Alzheimer's disease-like pathology. *Nat Med* **14**, 1106-1111.
191. Schilling S., Kohlmann S., Bauscher C., Sedlmeier R., Koch B., Eichertopf R., Becker A., Cynis H., Hoffmann T., Berg S., Freyse E. J., von Horsten S., Rossner S., Graubner S., and 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.
192. Schlenzig D., Manhart S., Cinar Y., Kleinschmidt M., Hause G., Willbold D., Funke S. A., Schilling S., and Demuth H. U. (2009) Pyroglutamate formation influences solubility and amyloidogenicity of amyloid peptides. *Biochemistry* **48**, 7072-7078.
193. Schlenzig D., Ronicke R., Cynis H., Ludwig H. H., Scheel E., Reymann K., Saido T., Hause G., Schilling S., and Demuth H. U. (2012) N-Terminal pyroglutamate formation of Abeta38 and Abeta40 enforces oligomer formation and potency to disrupt hippocampal long-term potentiation. *J Neurochem* **121**, 774-784.
194. Schlenzig D., Wermann M., Ramsbeck D., Moenke-Wedler T., and Schilling S. (2015) Expression, purification and initial characterization of human meprin beta from *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* **116**, 75-81.
195. Schmitz K. R., Liu J., Li S., Setty T. G., Wood C. S., Burd C. G., and Ferguson K. M. (2008) Golgi localization of glycosyltransferases requires a Vps74p oligomer. *Dev Cell* **14**, 523-534.
196. Schneider L. S., Mangialasche F., Andreasen N., Feldman H., Giacobini E., Jones R., Mantua V., Mecocci P., Pani L., Winblad B., and Kivipelto M. (2014) Clinical trials and late-stage drug development for Alzheimer's disease: an appraisal from 1984 to 2014. *J Intern Med* **275**, 251-283.

197. Sealfon S. C., Weinstein H., and Millar R. P. (1997) Molecular mechanisms of ligand interaction with the gonadotropin-releasing hormone receptor. *Endocr Rev* **18**, 180-205.
198. Seifert F., Schulz K., Koch B., Manhart S., Demuth H. U., and Schilling S. (2009) Glutaminyl cyclases display significant catalytic proficiency for glutamyl substrates. *Biochemistry* **48**, 11831-11833.
199. Seifert F., Demuth H. U., Weichler T., Ludwig H. H., Tittmann K., and Schilling S. (2015) Phosphate ions and glutaminyl cyclases catalyze the cyclization of glutaminyl residues by facilitating synchronized proton transfers. *Bioorg Chem* **60**, 98-101.
200. Selkoe D. J. (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* **81**, 741-766.
201. Selkoe D. J. (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* **298**, 789-791.
202. Selkoe D. J. (2008) Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behav Brain Res* **192**, 106-113.
203. The Biology of Alzheimer Disease; Selkoe D. J., Mandelkow E., and Holtzman D. M., eds., (2012), Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 978-1-936113-44-6.
204. Sevalle J., Amoyel A., Robert P., Fournie-Zaluski M. C., Roques B., and Checler F. (2009) Aminopeptidase A contributes to the N-terminal truncation of amyloid beta-peptide. *J Neurochem* **109**, 248-256.
205. Shankar G. M., Li S., Mehta T. H., Garcia-Munoz A., Shepardson N. E., Smith I., Brett F. M., Farrell M. A., Rowan M. J., Lemere C. A., Regan C. M., Walsh D. M., Sabatini B. L., and Selkoe D. J. (2008) Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* **14**, 837-842.
206. Shimizu T., Watanabe A., Ogawara M., Mori H., and Shirasawa T. (2000) Isoaspartate formation and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Arch Biochem Biophys* **381**, 225-234.
207. Shimizu T., Matsuoka Y., and Shirasawa T. (2005) Biological significance of isoaspartate and its repair system. *Biol Pharm Bull* **28**, 1590-1596.
208. Sipe J. D., Benson M. D., Buxbaum J. N., Ikeda S., Merlini G., Saraiva M. J., and Westermark P. (2010) Amyloid fibril protein nomenclature: 2010 recommendations from the nomenclature committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid* **17**, 101-104.

209. Sipe J. D., Benson M. D., Buxbaum J. N., Ikeda S., Merlini G., Saraiva M. J., and Westermark P. (2014) Nomenclature 2014: Amyloid fibril proteins and clinical classification of the amyloidosis. *Amyloid* **21**, 221-224.
210. 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., and Moir R. D. (2010) The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide. *PLoS One* **5**, e9505.
211. Spillantini M. G. and Goedert M. (2013) Tau pathology and neurodegeneration. *Lancet Neurol* **12**, 609-622.
212. Stephan A., Wermann M., von Bohlen A., Koch B., Cynis H., Demuth H. U., and Schilling S. (2009) Mammalian glutaminyl cyclases and their isoenzymes have identical enzymatic characteristics. *FEBS J* **276**, 6522-6536.
213. Stephenson R. C. and Clarke S. (1989) Succinimide formation from aspartyl and asparaginyl peptides as a model for the spontaneous degradation of proteins. *J Biol Chem* **264**, 6164-6170.
214. Tekirian T. L. (2001) Commentary: Abeta N- Terminal Isoforms: Critical contributors in the course of AD pathophysiology. *J Alzheimers Dis* **3**, 241-248.
215. Terry R. D., Masliah E., Salmon D. P., Butters N., DeTeresa R., Hill R., Hansen L. A., and Katzman R. (1991) Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* **30**, 572-580.
216. Thomas B. and Beal M. F. (2007) Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* **16 Spec No. 2**, R183-R194.
217. Tomidokoro Y., Lashley T., Rostagno A., Neubert T. A., Bojsen-Moller M., Braendgaard H., Plant G., Holton J., Frangione B., Revesz T., and Ghiso J. (2005) Familial Danish dementia: co-existence of Danish and Alzheimer amyloid subunits (ADan AND A{beta}) in the absence of compact plaques. *J Biol Chem* **280**, 36883-36894.
218. Tompa P., Davey N. E., Gibson T. J., and Babu M. M. (2014) A million peptide motifs for the molecular biologist. *Mol Cell* **55**, 161-169.
219. Tu L., Tai W. C., Chen L., and Banfield D. K. (2008) Signal-mediated dynamic retention of glycosyltransferases in the Golgi. *Science* **321**, 404-407.
220. Twardzik D. R. and Peterkofsky A. (1972) Glutamic acid as a precursor to N-terminal pyroglutamic acid in mouse plasmacytoma protein (protein synthesis-initiation-

- immunoglobulins-pyrrolidone carboxylic acid). *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**, 274-277.
221. Van Dam D. and De Deyn P. P. (2011) Animal models in the drug discovery pipeline for Alzheimer's disease. *Br J Pharmacol* **164**, 1285-1300.
222. Van Damme J., Proost P., Lenaerts J. P., and Opdenakker G. (1992) Structural and functional identification of two human, tumor-derived monocyte chemotactic proteins (MCP-2 and MCP-3) belonging to the chemokine family. *J Exp Med* **176**, 59-65.
223. Van Der Werf, P., Orłowski M., and Meister A. (1971) Enzymatic conversion of 5-oxo-L-proline (L-pyrrolidone carboxylate) to L-glutamate coupled with cleavage of adenosine triphosphate to adenosine diphosphate, a reaction in the -glutamyl cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**, 2982-2985.
224. Van Der Werf P. and Meister A. (1975) The metabolic formation and utilization of 5-oxo-L-proline (L-pyroglutamate, L-pyrrolidone carboxylate). *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **43**, 519-556.
225. Vann Jones S. A. and O'Brien J. T. (2014) The prevalence and incidence of dementia with Lewy bodies: a systematic review of population and clinical studies. *Psychol Med* **44**, 673-683.
226. Vidal R., Frangione B., Rostagno A., Mead S., Revesz T., Plant G., and Ghiso J. (1999) A stop-codon mutation in the BRI gene associated with familial British dementia. *Nature* **399**, 776-781.
227. Vidal R., Revesz T., Rostagno A., Kim E., Holton J. L., Bek T., Bojsen-Moller M., Braendgaard H., Plant G., Ghiso J., and Frangione B. (2000) A decamer duplication in the 3' region of the BRI gene originates an amyloid peptide that is associated with dementia in a Danish kindred. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4920-4925.
228. Vigneswara V., Lowenson J. D., Powell C. D., Thakur M., Bailey K., Clarke S., Ray D. E., and Carter W. G. (2006) Proteomic identification of novel substrates of a protein isoaspartyl methyltransferase repair enzyme. *J Biol Chem* **281**, 32619-32629.
229. Villemagne V. L., Burnham S., Bourgeat P., Brown B., Ellis K. A., Salvado O., Szoëke C., Macaulay S. L., Martins R., Maruff P., Ames D., Rowe C. C., and Masters C. L. (2013) Amyloid beta deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: a prospective cohort study. *Lancet Neurol* **12**, 357-367.
230. Walker Z., Possin K. L., Boeve B. F., and Aarsland D. (2015) Lewy body dementias. *Lancet* **386**, 1683-1697.

231. Posttranslational Modification of Proteins: Expanding Nature's Inventory; Walsh C., (2005) 1st Edition, Roberts & Co, ISBN 9780974707730.
232. Wang J., Dickson D. W., Trojanowski J. Q., and Lee V. M. (1999) The levels of soluble versus insoluble brain Abeta distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging. *Exp Neurol* **158**, 328-337.
233. Waniek A., Hartlage-Rubsamen M., Hofling C., Kehlen A., Schilling S., Demuth H. U., and Rossner S. (2015) Identification of thyrotropin-releasing hormone as hippocampal glutaminyl cyclase substrate in neurons and reactive astrocytes. *Biochim Biophys Acta* **1852**, 146-155.
234. Welker E., Hathaway L., Xu G., Narayan M., Pradeep L., Shin H. C., and Scheraga H. A. (2007) Oxidative folding and N-terminal cyclization of onconase. *Biochemistry* **46**, 5485-5493.
235. Wetsel W. C. and Srinivasan S. (2002) Pro-GnRH processing. *Prog Brain Res* **141**, 221-241.
236. Williamson J. M. and Meister A. (1981) Stimulation of hepatic glutathione formation by administration of L-2-oxothiazolidine-4-carboxylate, a 5-oxo-L-prolinase substrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 936-939.
237. Wintjens R., Belrhali H., Clantin B., Azarkan M., Bompard C., Baeyens-Volant D., Looze Y., and Villeret V. (2006) Crystal structure of papaya glutaminyl cyclase, an archetype for plant and bacterial glutaminyl cyclases. *J Mol Biol* **357**, 457-470.
238. Wood C. S., Schmitz K. R., Bessman N. J., Setty T. G., Ferguson K. M., and Burd C. G. (2009) PtdIns4P recognition by Vps74/GOLPH3 links PtdIns 4-kinase signaling to retrograde Golgi trafficking. *J Cell Biol* **187**, 967-975.
239. Woodsmith J. and Stelzl U. (2014) Studying post-translational modifications with protein interaction networks. *Curr Opin Struct Biol* **24**, 34-44.
240. Wortmann M. (2012) Dementia: a global health priority - highlights from an ADI and World Health Organization report. *Alzheimers Res Ther* **4**, 40.
241. Wu G., Miller R. A., Connolly B., Marcus J., Renger J., and Savage M. J. (2014) Pyroglutamate-Modified Amyloid-beta Protein Demonstrates Similar Properties in an Alzheimer's Disease Familial Mutant Knock-In Mouse and Alzheimer's Disease Brain. *Neurodegener Dis.* **14**, 53-66.
242. Yamada M., Saga Y., Shibusawa N., Hirato J., Murakami M., Iwasaki T., Hashimoto K., Satoh T., Wakabayashi K., Taketo M. M., and Mori M. (1997) Tertiary

- hypothyroidism and hyperglycemia in mice with targeted disruption of the thyrotropin-releasing hormone gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 10862-10867.
243. Yamada M., Satoh T., and Mori M. (2003) Mice lacking the thyrotropin-releasing hormone gene: what do they tell us? *Thyroid* **13**, 1111-1121.
244. Yamamoto M., Horiba M., Buescher J. L., Huang D., Gendelman H. E., Ransohoff R. M., and Ikezu T. (2005) Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1/CCL2 in beta-amyloid precursor protein transgenic mice show accelerated diffuse beta-amyloid deposition. *Am J Pathol* **166**, 1475-1485.
245. Yoshimura T. and Leonard E. J. (1992) Human monocyte chemoattractant protein-1: structure and function. *Cytokines* **4**, 131-152.
246. Young A. L., Carter W. G., Doyle H. A., Mamula M. J., and Aswad D. W. (2001) Structural integrity of histone H2B in vivo requires the activity of protein L-isoaspartate O-methyltransferase, a putative protein repair enzyme. *J Biol Chem* **276**, 37161-37165.
247. Yu L., Vizel A., Huff M. B., Young M., Remmele R. L., Jr., and He B. (2006) Investigation of N-terminal glutamate cyclization of recombinant monoclonal antibody in formulation development. *J Pharm Biomed Anal* **42**, 455-463.
248. Zaccai J., McCracken C., and Brayne C. (2005) A systematic review of prevalence and incidence studies of dementia with Lewy bodies. *Age Ageing* **34**, 561-566.
249. Zhang Q., Kim Y. C., and Narayanan N. S. (2015) Disease-modifying therapeutic directions for Lewy-Body dementias. *Front Neurosci* **9**, 293.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H.-U. Demuth für die Anregung zu dieser Thematik, die vielen intensiven Diskussionen und das in mich gesetzte Vertrauen beim Aufbau der dafür notwendigen Arbeitsgruppen „Enzymologie“ (bei Probiodrug AG) sowie „Protein- und Wirkstoffbiochemie“ (Fraunhofer IZI-MWT). Seine langjährige großzügige Förderung und die stetige Ermutigung, neue wissenschaftliche Bereiche zu erkunden, waren maßgebend für die Realisierung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. M. Pietzsch danke ich für das rege Interesse an der Fertigstellung der Habilitationsschrift, das entgegengebrachte Vertrauen und die gute Zusammenarbeit im Rahmen des internationalen Studienganges „Pharmaceutical Biotechnology“.

Herrn Prof. Dr. C. Wasternack danke ich für die Kooperation und rege Diskussion zur Untersuchung pflanzlicher Glutaminyl-Cyclasen.

Darüber hinaus danke ich den fördernden Einrichtungen und der Probiodrug AG, insbesondere Frau Dr. Lues und Herrn Dr. Glund, die durch ihre finanzielle Unterstützung, wertvolle Diskussionen und mancherlei Ratschläge die hier vorgestellten Arbeiten ermöglicht haben.

Mein besonderer Dank gilt den Mitarbeitern der o.g. Arbeitsgruppen der Probiodrug AG und des Fraunhofer IZI-MWT für die angenehme Zusammenarbeit sowie die experimentellen und intellektuellen Beiträge zu den in dieser Arbeit vorgestellten und zusammengefaßten Ergebnissen. Insbesondere danke ich Frau Dr. Schlenzig, Herrn Wermann, Herrn Dr. Cynis, Herrn Dr. Rahfeld, Herrn Dr. Buchholz, Herrn Jäger sowie Herrn Dr. Hoffmann für die gute Zusammenarbeit. Herrn Wermann danke ich zudem für Kommentare bei der Abfassung der Habilitationsschrift.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei den langjährigen auswärtigen Kooperations- und Projektpartnern, insbesondere Herrn Prof. Dr. Roßner, Herrn Prof. Dr. von Hörsten, Herrn Prof. Dr. Bayer, Herrn Prof. Dr. Tittmann, Herrn Prof. Bloom und Frau Prof. Lemere, für die schöpferische Zusammenarbeit und zahlreiche Diskussionen bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meiner Frau, für die mir entgegengebrachte Geduld und Unterstützung im Alltag, was maßgeblich zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen hat.

Lebenslauf

Dr. rer. nat. Stephan Schilling

Geburtsdatum: 30.05.1976
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet, 2 Kinder

Beruflicher Werdegang

Seit 11/2013 Leiter der Arbeitsgruppe Protein- und Wirkstoffbiochemie am Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie (IZI), Außenstelle Halle; stellv. Leiter der Außenstelle (Leiter: Prof. Dr. H.-U. Demuth)

01/2007-10/2013 Leiter der Abteilung Enzymologie der Probiodrug AG

04/2008 – 12/2008 Gastwissenschaftler am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in Halle/Saale
Thema: „Rolle pflanzlicher Glutaminyl-Cyclasen bei der Pathogenabwehr“, Arbeitsgruppe Prof. C. Wasternack

04/2008-06/2008 Gastwissenschaftler am Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston
Thema: "Immunohistochemical characterization of glutaminyl cyclase expression in brains from Alzheimer's disease patients", Arbeitsgruppe Prof. C. A. Lemere

05/2004 - 12/2006 Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Probiodrug AG

Ausbildung

10/2000 - 05/2004 Doktorand, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, gleichzeitig beschäftigt bei der Probiodrug AG, Thema der Dissertation: „Charakterisierung der humanen Glutaminyl-Cyclase im Vergleich mit dem analogen Enzym aus *C. papaya*“, angefertigt bei der Probiodrug AG unter Betreuung von Prof. Dr. Hans-Ulrich Demuth, am Fachbereich Biochemie vertreten durch Prof. Dr. C. Wasternack, Note: „summa cum laude“

10/1994 – 10/2000 Studium der Biochemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, beurlaubt von 07/1995 – 09/1996 wegen Zivildienst, ev. Kirchengemeinde Halle-Silberhöhe

Abschluss Diplom, Note „sehr gut“ (1,0), Thema der Diplomarbeit: „Isolierung und Charakterisierung von

Glutaminyl-Cyclase aus tierischem und pflanzlichem Material“, angefertigt am Leibniz- Institut für Pflanzenbiochemie und der Probiodrug AG, Prof. C. Wasternack und PD Dr. H.-U. Demuth

1990 -1994

Gymnasium „Adolf Reichwein“, Halle (Saale)
Abschluß: Abitur (Note 1,4)

Halle, den 01.12.2017

Stephan Schilling

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 als solche kenntlich gemacht wurden.

Die Arbeit wurde nur an der Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg eingereicht.

Halle, den 01.12.2017

Stephan Schilling