



„Phantasie ist wichtiger als Wissen, denn Wissen ist begrenzt“

Albert Einstein

Meiner Frau Antje und meinen Söhnen Oskar & Michel.

Untersuchungen zur Bildung von Isoaspartat am Peptid-N-Terminus sowie zur Reparatur durch die Protein-L-isoaspartyl-O-methyltransferase

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Herrn Bert Hans-Otto Güttler

geb. am 12. Juni 1982 in Potsdam

Gutachter:

1. Prof. Dr. Hans-Ulrich Demuth

2. PD Dr. Ralph Golbik

3. Prof. Dr. Steffen Roßner

Promotionsgesuch eingereicht am: 02.07.2015

Tag der öffentlichen Verteidigung: 14.04.2016

Abkürzungsverzeichnis

A ₆₀₀	Absorption bei 600 nm
Abb.	Abbildung
AcN	Acetonitril
AdoMet, SAM	Adenosyl-methionin = <i>S</i> -Adenosyl-L-methionin
AK	Alzheimer-Krankheit
AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
APN	Aminopeptidase N
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Asx	Asparaginsäure oder Asparagin (Asp oder Asn)
A β	Beta-amyloid
CE	<i>capillary electrophoresis</i> , (Kapillarelektrophorese)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
D _{iso} , isoAsp	Isoaspartat
DTE	1,4-Dithioerythritol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EBA	<i>expanded bed adsorption</i>
EDTA	Ethylendiamintertraacetat, Ethylendiamintetraessigsäure
FBS	<i>fetal bovine serum</i> , (Fötales Kälberserum)
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IEC	<i>ion exchange chromatography</i> , (Ionenaustauschchromatographie)
IMAC	<i>immobilized metal affinity chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
ITC	<i>isothermal titration calorimetry</i> , (Isothermale Titrationskalorimetrie)
Mes	2-(<i>N</i> -Morpholino)-ethansulfonsäure
NaN ₃	Natriumazid

NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
PBS	<i>phosphat buffered saline</i> , (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PIMT	Protein-L-isoaspartyl- <i>O</i> -methyltransferase
<i>rh</i> PIMT	rekombinante humane PIMT
<i>rm</i> PIMT	rekombinante murine PIMT
psi	<i>pound per square inch</i> (1 psi ~ 6895 Pascal)
PTM	posttranslationale Modifikation
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
SAH	<i>S</i> -Adenosyl-L-homocystein
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolett
OD	optische Dichte

Bemerkungen:

Die in der Fachliteratur allgemein verwendeten Abkürzungen für chemische oder biochemische Sachverhalte und Begriffe sind nicht im Abkürzungsverzeichnis enthalten. Die im Text verwendeten Anglizismen sind durch *kursive* Schreibweise gekennzeichnet. Sie sind auch genannt, wenn ein äquivalenter deutscher Ausdruck oder Fachbegriff existiert. Teilweise sind diese Anglizismen Bestandteil der deutschen Fachsprache in zusammengesetzten Wörtern und sind in diesen ebenfalls durch *kursive* Schreibweise gekennzeichnet. Zahlen mit Dezimalstellen sind durch einen Punkt getrennt.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die posttranslationale Modifikation L-Isoaspartat und deren Bedeutung für die Funktion von Proteinen	3
1.2 Alzheimer-Krankheit (Morbus Alzheimer)	6
1.3 Protein-L-isoaspartyl-(D-aspartyl)- <i>O</i> -methyltransferase	9
1.4 PIMT als Zielprotein der Wirkstoffentwicklung	15
1.5 Zielstellung der Dissertation.....	16
2. Materialien & Methoden.....	18
2.1 Materialien.....	18
2.1.1 Chemikalien, Peptide, Enzyme, Mikroorganismen, Oligonukleotide	18
2.1.2 Geräte.....	21
2.2 Methoden.....	23
2.2.1 Untersuchungen zur Isoaspartat-Bildung	23
2.2.1.1 Synthese der Modellpeptide.....	23
2.2.1.2 Analyse der isoAsp-Bildung mittels Kapillarelektrophorese (CE-UV).....	23
2.2.1.3 Kernspinresonanzspektroskopie	25
2.2.1.4 Bestimmung des pK_S der freien N-Termini von Modellpeptiden mittels pH-Titration.....	26
2.2.1.5 Lösungsmittel-Isotopie-Effekt (KIE) und <i>proton inventory</i>	26
2.2.2 Präparation von rekombinanter humaner PIMT (<i>rhPIMT</i>)	27
2.2.3 Präparation von rekombinanter muriner PIMT (<i>rmPIMT</i>).....	28
2.2.4 PIMT-Aktivitätsassays	29
2.2.4.1 Gekoppelter optischer Test mit Aminopeptidase N.....	29
2.2.4.2 Analyse mittels Kapillarelektrophorese	30
2.2.4.3 Nachweis von <i>S</i> -Adenosyl-L-homocystein mittels HPLC-UV	30
2.2.5 Molekulare und biochemische Charakterisierung von PIMT.....	30
2.2.5.1 Klonierung der Plasmide.....	31
2.2.5.2 Lokalisation von PIMT	33
2.2.5.3 Biochemische Charakterisierung von PIMT	35
3. Ergebnisse.....	37
3.1 Untersuchungen zur Isoaspartat-Bildung	37
3.2 Präparation von <i>rhPIMT</i>	47
3.3 Präparation von <i>rmPIMT</i>	49
3.4 PIMT-Aktivitätsassay	53
3.4.1 APN-gekoppelter PIMT-Aktivitätsassay.....	53

3.4.2	Trennung von H-AEDA-AMC und H-AED _{iso} A-AMC <i>via</i> CE-UV	58
3.4.3	Nachweis von S-Adenosyl-L-homocystein mittels HPLC-UV	61
3.4.4	Bestimmung von pH- und Temperaturoptimum der durch PIMT katalysierten Reaktion mittels CE-UV, HPLC-UV und APN-gekoppelten PIMT- Aktivitätsassay	66
3.4.5	Strukturelle Untersuchungen mittels Circular dichroismus.....	67
3.4.6	Thermodynamische Analyse der Bindung von SAM sowie SAH an PIMT mittels Isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC)	71
3.5	Lokalisierungsstudien von PIMT mittels RT-PCR, <i>Western Blot</i> -Analyse und Fluoreszenzmikroskopie	73
3.5.1	Zelluläre und Subzelluläre Lokalisation von PIMT	73
3.5.2	Lokalisierungsstudien mittels Immunfluoreszenz	75
4.	Diskussion.....	78
5.	Zusammenfassung & Ausblick.....	88
6.	Anhang.....	101
6.1	Kontinuierlicher MDH-gekoppelter PIMT-Aktivitätsassay	101
6.2	Titration der N-Termini von NGEF, DGEF, NAEF & DAEF	103
6.3	Kinetischer Isotopieeffekt von NGEF in Tricinpuffer	105

Einleitung

1. Einleitung

Die gesteigerte Lebenserwartung der Menschen in den Industrieländern von knapp 49 Jahre auf 76 Jahre im 20. Jahrhundert und die laut dem Bundesministerium für Bevölkerungsforschung weiterhin steigende Lebenserwartung der Menschen in Deutschland und der Welt lässt die altersbedingten Krankheiten in der heutigen Zeit stark ansteigen (Selkoe 2001). Hierzu gehört auch die Alzheimer-Krankheit, die durch weitere alterstypische Erkrankungen wie Diabetes begünstigt wird (Querfurth, LaFerla 2010). Da in Zukunft mit mehr älteren und mehr erkrankten Menschen gerechnet werden muss, ergibt sich die Notwendigkeit, neben Erkrankung-vorbeugenden Lebensgewohnheiten auch eine wirksame multifaktorielle Therapie der Alzheimer-Erkrankung zu entwickeln. Die Probiodrug AG forscht seit vielen Jahren an Wirkstoffen, die bei Erkrankungen wie Diabetes und Alzheimer helfen können. Als potentiell *target* für die Entwicklung von Therapien der Alzheimer-Krankheit wird die Glutaminylzyklase (QC, EC 2.3.2.5) in den Laboratorien der Probiodrug AG untersucht. Die QC modifiziert den N-Terminus verschiedener Proteine und Peptide, indem sie die Umwandlung von N-terminalem Glutamin oder Glutaminsäure in zyklisches Pyroglutamat katalysiert (Abb. 1). Hierbei handelt es sich um eine posttranslationale Protein-

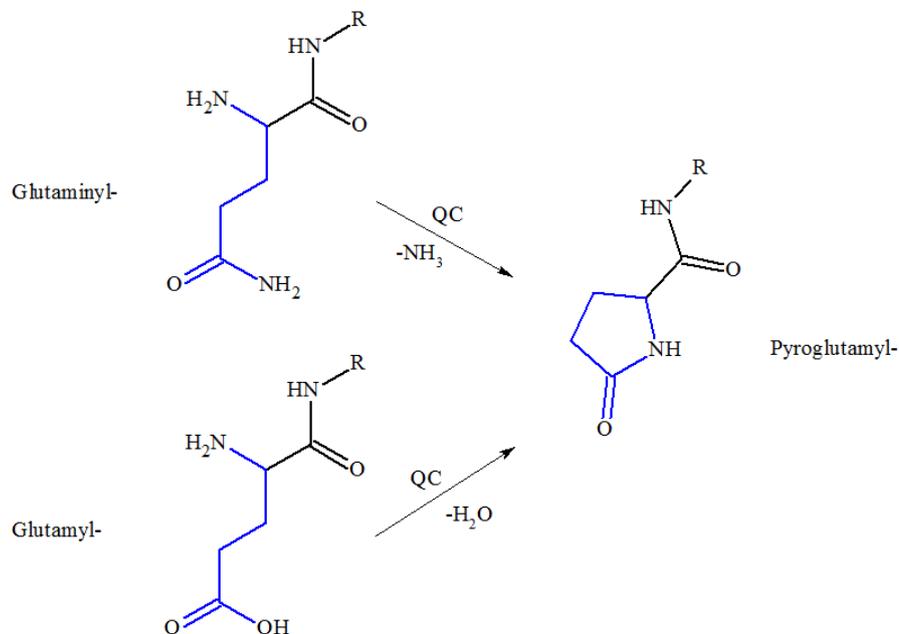


Abb. 1: Die durch die QC katalysierte Reaktion. Durch die Zyklisierung von N-terminalen Glutaminyl- oder Glutamylresten entsteht ein 5-gliedriger Lactamring, der generisch auch Pyroglutamat oder 5-Oxo-Prolin genannt wird. Diese Reaktion spielt in der Reifung von Hormonen eine wichtige Rolle (Dissertation Stephan Schilling von 2004).

Einleitung

modifikation. Die Alzheimer-Krankheit ist eine neurodegenerative Erkrankung, die mit dem Verlust von Neuronen einhergeht. Als eine Ursache für das Sterben der Neuronen werden Ablagerungen von A β angesehen. A β entsteht durch die Prozessierung des membranständigen *amyloid precursor protein*. Dabei entsteht zum Großteil das A β mit einer Länge von 40 Aminosäuren. Durch N-terminalen Aminosäure-Abbau können aber auch verkürzte Formen auftreten. Im Fall von A $\beta_{3-40/42}$ führt die Umwandlung des N-Terminus zu Pyroglutamat zu einer stärkeren Fibrillenbildung und einem erschwerten Peptidabbau (He, Barrow 1999). Eine Inhibierung der QC hilft somit A β -Ablagerungen zu verhindern (Dissertation Stephan Schilling von 2004). Ein weiterer potentieller Therapieansatz ist ebenfalls eine posttranslationale Proteinmodifikation, das Isoaspartat (isoAsp, D_{iso}) bzw. dessen Reparaturenzym, die Protein-L-isoaspartyl-O-methyltransferase (PIMT, EC 2.1.1.77). In Abb. 2 ist die durch PIMT katalysierte Reaktion vereinfacht dargestellt.

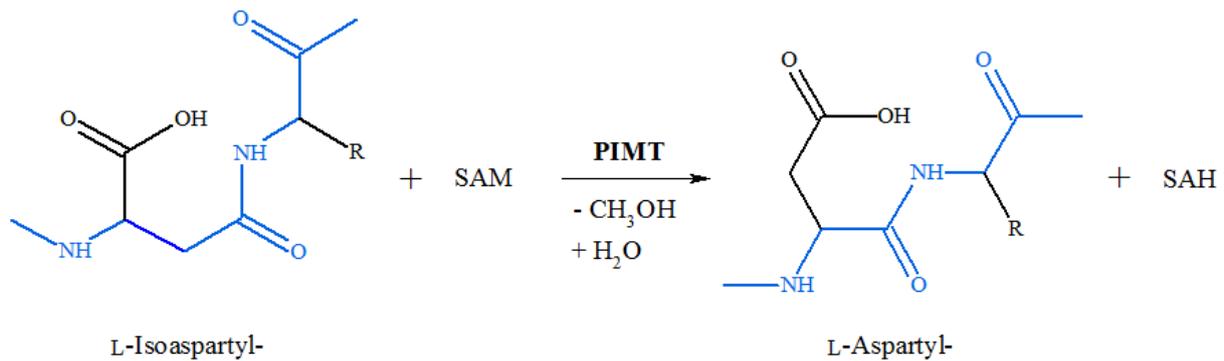


Abb. 2: Vereinfachte Darstellung der durch PIMT katalysierten Reaktion. PIMT bringt das isoAsp-Substrat und den Cofaktor SAM in räumliche Nähe. Das SAM überträgt eine Methylgruppe auf die Seitenkette des isoAsp-Restes, welcher spontan Methanol abspaltet. Nach weiteren Schritten entstehen L-Aspartyl- und SAH.

Posttranslationale Modifikationen können durch eine Vielzahl heterogener chemischer Reaktionen entstehen. Zu den posttranslationalen Modifikationen zählen: das Anfügen einzelner funktioneller Gruppen (z.B. Methylierung, Phosphorylierung), die Abspaltung von einzelnen Aminosäuren oder ganzer Signalsequenzen (z.B. Prokollagen zu Kollagen) und die Anlagerung großer Moleküle (z.B. Anlagerung der Häm-Gruppe). Dabei wirken sich posttranslationale Modifikationen nicht immer positiv auf die biologische Funktion von Proteinen aus. Das spiegelt sich in diversen Krankheitsbildern, wie Krebs, Katarakt oder, wie bereits erwähnt, der Alzheimer-Krankheit wider. In dieses Feld reiht sich die Bildung von Isoaspartat aus Asparagin oder Asparaginsäure ein. Um den Schaden ungewollter posttranslationaler Modifikationen zu verringern, hat die Natur verschiedene Reparaturmechanismen hervorgebracht. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der

Einleitung

posttranslationalen Modifikation isoAsp, deren Reparatursystem PIMT, die Verbindung beider zur Alzheimer-Krankheit, sowie Überlegungen zu therapeutischen Ansätzen und Charakterisierungsmöglichkeiten von isoAsp und PIMT-Effektoren.

1.1 Die posttranslationale Modifikation L-Isoaspartat und deren Bedeutung für die Funktion von Proteinen

Asparagin (Asn) und Asparaginsäure (Asp) innerhalb einer Peptidkette sind unter physiologischen Bedingungen relativ instabil. Die Seitenketten dieser Aminosäuren neigen dazu, spontan Ammoniak bzw. Wasser abzuspalten und ein zyklisches Intermediat, Succinimidyl, zu bilden. Begünstigt wird die Deamidierung bzw. Dehydratation durch kleine, unpolare Aminosäuren (Gly, Ala) auf der C-terminalen Seite von Asx. Eine quantitative Analyse wurde durch Robinson *et al.* im Jahr 2001 vorgelegt, nachdem sie 800 synthetische Pentapeptide auf ihre Isomerisierungsgeschwindigkeit hin untersucht haben. Demnach gilt die Reihenfolge der Geschwindigkeit: Gly > His > Ser > Ala (Robinson, Robinson 2001). Auch beschleunigen erhöhte pH-Werte, eine erhöhte Ionenstärke und eine erhöhte Temperatur die Zyklisierung (Patel, Borchardt 1990; Meinwald et al. 1986). In Sekundärstrukturen wie α -Helix oder β -Faltblatt entstehen kaum isoAsp-Reste (Xie, Schowen 1999). Das Succinimidyl-Intermediat hydrolysiert dann spontan zu Asp oder zu isoAsp in einem Verhältnis von 30:70 (Brennan, Clarke 1995; Geiger, Clarke 1987; Stephenson, Clarke 1989). Genauer konnte das Verhältnis von L-isoAsp : L-Asp : D-isoAsp : D-Asp durch Vigneswara und Kollegen mit 70:20:5:5 bestimmt werden (Vigneswara et al. 2006). IsoAsp fügt eine zusätzliche Methylengruppe in das Peptidrückgrat des betroffenen Proteins ein und bedingt dadurch eine Strukturänderung, die gegebenenfalls die Funktion des Proteins beeinflusst. Aufgrund dessen haben sich zwei verschiedene Hypothesen entwickelt: die *DAMAGE&REPAIR*- und die *DEGRADATION®ULATION*-Hypothese (Reissner, Aswad 2003). Im Fall der *DAMAGE&REPAIR*-Hypothese wird davon ausgegangen, dass isoAsp eine ungewollte Proteinmodifikation ist, die durch das Enzym PIMT repariert werden kann. Hingegen wird in der *DEGRADATION®ULATION*-Hypothese vermutet, dass isoAsp-Reste in Peptiden und Proteinen „bewusst“ durch die Natur eingefügt wurden, um Proteine gezielt an- und abzustellen bzw. nach einer gewissen Zeit abzubauen zu können. Dabei sprechen die meisten Veröffentlichungen für die *DAMAGE&REPAIR*-Hypothese, obwohl eine Tatsache die Ergebnisse relativiert: isoAsp kann nur zu Asp „repariert“ werden, egal ob es aus Asn oder Asp entstanden ist.

Einleitung

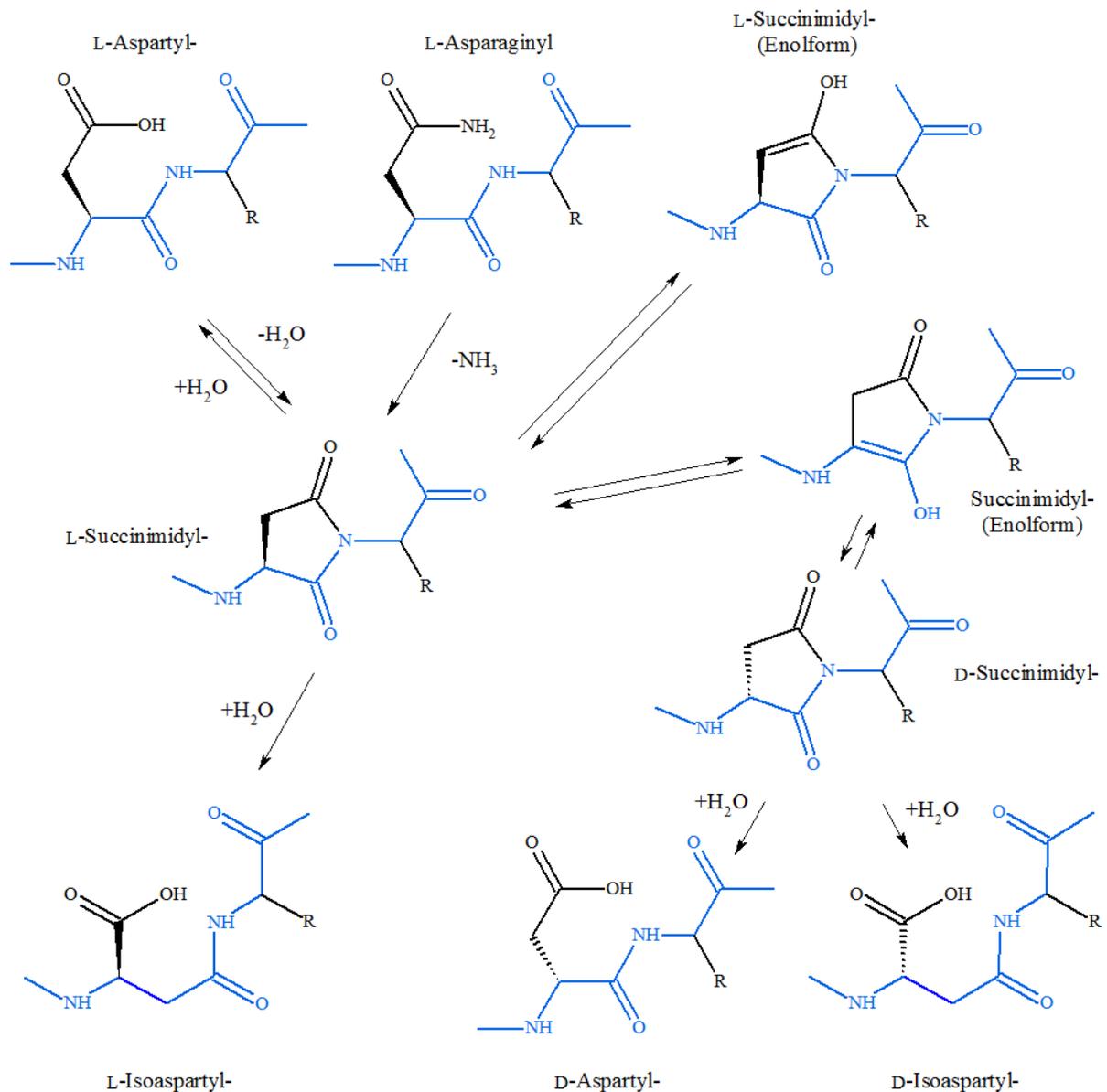


Abb. 3: Entstehung von Isoaspartyl- aus Asparagin- oder Asparaginsäureresten. Das Peptidrückgrat ist in Blau und die Aminosäurereste sind in Schwarz dargestellt. Durch Abspaltung von Wasser oder Ammoniak entsteht ein zyklisches Intermediat, L-Succinimidyl-. Dieses kann in zwei Enolformen vorliegen, wobei die prochirale L-Form thermodynamisch begünstigt ist. Das Succinimidyl- hydrolysiert spontan zu Aspartyl- oder Isoaspartylresten in L- oder D-Konfiguration. Thermodynamisch entstehen circa 70 % L-Isoaspartyl-, 20 % L-Aspartylreste und jeweils 5 % der beiden Aminosäurereste in der D-Konfiguration.

Argumente für die *DEGRADATION®ULATION*-Hypothese liefern die Beobachtungen der Arbeitsgruppe um Robinson. Die Bildung von isoAsp bzw. isoGlu kann die biologische Lebensdauer von Proteinen herabsetzen bzw. biologische Prozesse zeitabhängig an- oder abschalten (Robinson et al. 1970). Das konnte *in vivo* für den Umsatz von Cytochrom C (Flatmark, Sletten 1968; McKerrow, Robinson 1974) und der Aldolase aus Hasenmuskel (McKerrow, Robinson 1974; Midelfort, Mehler 1972) gezeigt werden. Weiterhin konnten

Einleitung

Kinzel *et al.* zeigen, dass die Deamidierung von PKA-C (cAMP-abhängige Proteinkinase) keinen Einfluss auf deren Aktivität, aber auf deren zelluläre Lokalisierung hat, so ist die native Form stärker im Zellkern vertreten als die deamidierte Form (Kinzel et al. 2000; Kinzel et al. 1987). Corti und Curnis konnten 2011 ein neues Argument für diese Hypothese liefern. Die beiden Autoren hatten beobachtet, dass die Deamidierung der NGR-Sequenz zur isoDGR-Sequenz das RGD-Motiv imitiert, welches ein bekanntes Integrin-Bindemotiv ist (Corti, Curnis 2011). So können Stimuli bestimmter Zelltypen zeitabhängig initiiert werden.

In den meisten Fällen bedeutet die Bildung von isoAsp den Funktionsverlust für das betreffende Protein, denn die Bildung von isoAsp bedingt nicht nur eine strukturelle Änderung des Proteins, sondern im Fall der Deamidierung von Asn auch eine Ladungsänderung (Desrosiers, Fanelus 2011). Mit der Zeit sammeln sich diese nicht funktionalen Proteine in der Zelle an, was ein Grund des Alterungsprozesses und vieler Erkrankungen ist. So bedingt akkumuliertes D-isoAsp-haltiges α -A-Crystallin möglicherweise das Krankheitsbild Katarakt (Fujii et al. 2000). Das α -A-Crystallin arbeitet normalerweise als Chaperon. Bilden sich nun vermehrt isoAsp-Reste in diesem Chaperon aus, steigt die Tendenz zur Akkumulation, wodurch die Linse nach und nach getrübt wird. IsoAsp-Reste in Proteinen konnten ebenfalls mit Autoimmunerkrankungen, Krebs und Morbus Alzheimer in Verbindung gebracht werden (Cimmino et al. 2008; Doyle et al. 2007; Mamula et al. 1999; Shimizu et al. 2000; Zhao et al. 2008; Roher et al. 1993; Lee et al. 2012). So beobachteten Mamula *et al.* eine starke Autoimmunantwort von B- und T-Zellen der Maus, wenn sie das murine Cytochrom-Peptid 90-104 mit einem isoAsp an Position 93 einsetzten. Die Arbeitsgruppe um Lee konnte 2012 zeigen, dass hohe Mengen PIMT den Ausgang einer Krebserkrankung verschlechtert (Lee et al. 2012). Dabei reguliert PIMT die Menge an p53 durch Methylierung von N29 (isoD29) und N30 (isoD30). Hier konnte eine schnelle Deamidierung an einer untypischen Aminosäuresequenz beobachtet werden. Die Methylierung erhöht die Interaktion von p53 mit HDM2 und somit den Grad der Ubiquitylierung und letztendlich die Stabilität von p53. Damit konnte PIMT nicht nur als potentielles Onkogen und Regulator der p53-Aktivität, sondern auch als Zielprotein der Wirkstoffforschung dargestellt werden. Des Weiteren konnten Roher *et al.* 1993 größere Mengen isoAsp an Position 1 und 7 von A β in dessen *plaques* per RP-HPLC detektieren. Die einhergehende Strukturänderung des A β wurde mit seiner Tendenz zur Ablagerung und der weiteren Stabilität gegenüber Proteasen in Verbindung gebracht.

Einleitung

1.2 Alzheimer-Krankheit (Morbus Alzheimer)

Alois Alzheimer beschrieb 1905 den ersten Fall einer neurodegenerativen Erkrankung, die später als Alzheimer-Krankheit bekannt wurde. Die Symptome sind eine voranschreitende Verschlechterung des Erinnerungsvermögens und der kognitiven Fähigkeiten, ein verändertes soziales Verhalten, Paranoia und Wahnvorstellungen, sowie eine zunehmende Verringerung der sprachlichen Fähigkeiten. Die histologischen Merkmale der Krankheit sind amyloide (senile) *plaques* aus A β und neurofibrilläre *tangles* aus dem Tau-Protein. Offensichtlich spielen eine Vielzahl von pathophysiologischen Veränderungen bei der Entstehung des Krankheitsbildes eine Rolle: Entzündungsreaktionen, oxidative Prozesse, Fehlfunktion von Mitochondrien, vaskuläre Effekte und Abbau von Neurotrophin und Neurotransmittern um nur einige zu nennen (Selkoe 2001; Querfurth, LaFerla 2010). Diese Prozesse verursachen offenbar den Verlust von Synapsen und schließlich die Degeneration von Neuronen (Abb. 4), was langfristig zum Verlust der kognitiven Fähigkeiten und letztendlich zum Tod führt.

Laut der „Amyloid-Hypothese“ wird angenommen, dass das Amyloid β der Auslöser der Erkrankung ist (Abb. 5). A β entsteht durch mehrstufige Proteolyse des *amyloid precursor protein* (APP), welches in der Zellmembran lokalisiert ist. In der physiologischen Reaktion wird das APP zunächst durch die α -Sekretase zu einem extrazellulären Teil, sAPP α , und einem membranständigen C83-Fragment hydrolysiert. Anschließend spaltet die innerhalb der Zellmembran lokalisierte γ -Sekretase das C83-Fragment in das intrazelluläre AICD (*amyloid intracellular domain*), welches in den Zellkern transloziert und dort eine Transkriptionsaktivierung vermittelt, und das extrazelluläre p3-Peptid. Diesen Weg der APP-Spaltung nennt man auch den nicht-amyloidogenen Weg, weil keine unlöslichen oder aggregationsanfälligen Produkte entstehen. Eine alternative Prozessierung beruht auf der APP-Spaltung durch eine β -Sekretase, wie z.B. BACE-1 (*β -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1*) oder Cathepsin B (Böhme et al. 2008b; Hook et al. 2008). Durch die Spaltung entstehen ein verkürztes extrazelluläres sAPP β und ein membranständiges C99-Fragment. Dieses ist ebenfalls ein Substrat der γ -Sekretase, welche es in die AICD und das A β hydrolysiert. Das lösliche A β kann sowohl in das Zellinnere als auch in die extrazelluläre Matrix entlassen werden.

Einleitung

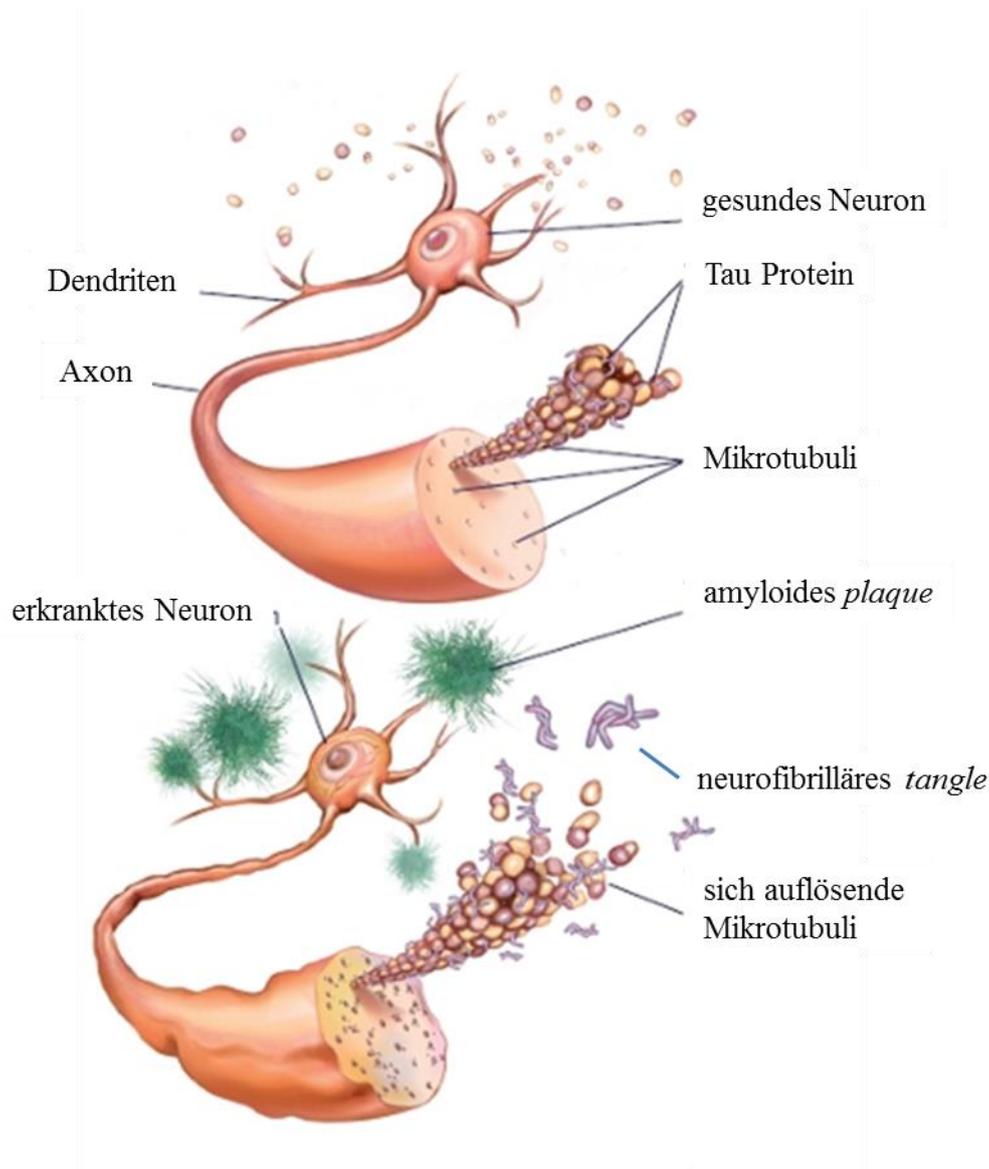


Abb. 4: Darstellung von gesundem und erkranktem Neuron (www.alzheimer-forschung.de, modifiziert).

Physiologisch soll das A β vermutlich die excitatorische Transmission dämpfen, um vor einer neuronalen Hyperaktivität zu schützen (Kamenetz et al. 2003). A β wird durch zwei Proteasen, dem Nepilysin (monomeres und oligomeres A β) und dem Insulin-abbauenden Enzym (monomeres A β), weiter proteolytisch prozessiert. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Reduzierung der beiden Proteasen in vermehrtes Auftreten von A β bzw. deren Überexpression in einem Schutz vor *plaque*-Bildung mündet (Kanemitsu et al. 2003; Iwata et al. 2001; Qiu et al. 1998; Farris et al. 2003; Leissring et al. 2003).

Einleitung

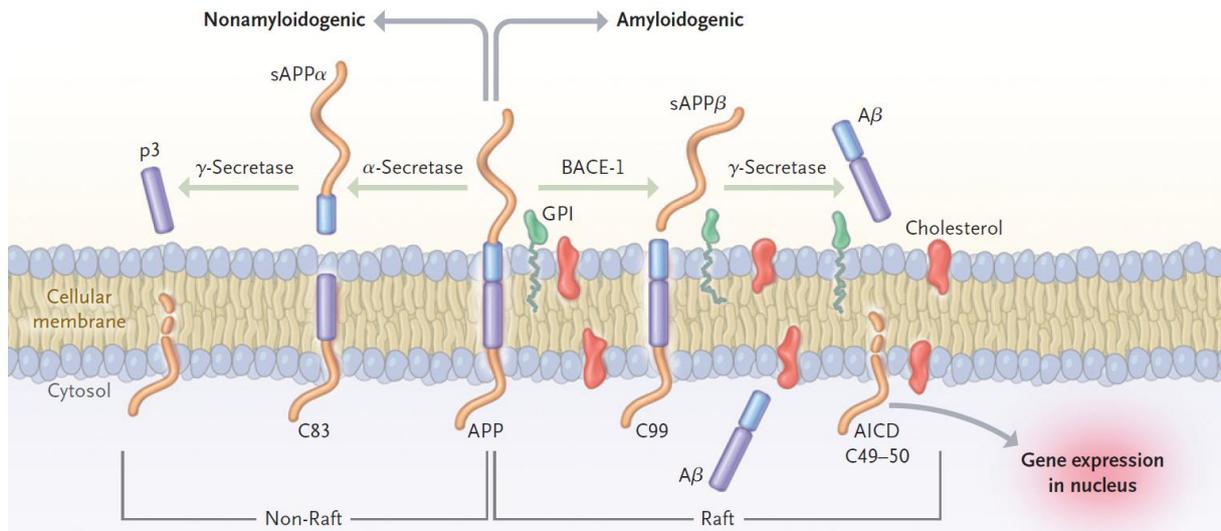


Abb. 5: Amyloid-Hypothese nach Querfurth & LaFerla (Querfurth, LaFerla 2010).

Im gesunden Organismus liegt ein Gleichgewicht von A β -Produktion und A β -Abbau vor. Wird dieses Gleichgewicht gestört, kann das aggregationsanfällige A β Fibrillen bilden. Dabei haben sich verschiedene A β -Spezies als besonders aggregationsanfällig herauskristallisiert, wie das A β_{1-42} oder N-terminal modifizierte A β -Spezies, wie das pGlu-A β_{3-X} oder das isoAsp-A β_{1-X} (Schilling et al. 2006; Saido et al. 1996). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass nicht die A β -Fibrillen, sondern vielmehr die A β -Oligomere cytotoxisch für die Synapsen sind (Klyubin et al. 2008; Walsh et al. 2005). A β -Oligomere und die sich daraus bildenden intermediären Formen korrelieren mit dem Schweregrad der Alzheimer-Erkrankung und nicht die Menge an A β an sich (Lue et al. 1999). Nichtsdestotrotz zielen klinische Studien darauf ab die Menge an A β zu reduzieren. So werden γ -Sekretase-Inhibitoren, A β -Antikörper aber auch Aggregationsblocker erforscht (McGeer, McGeer 2003; Siemers et al. 2006; Hock et al. 2003).

Ein weiteres Merkmal der Alzheimer-Erkrankung und anderer Tauopathien ist das Auftreten von neurofibrillären *tangles*, die hauptsächlich aus dem hyperphosphorylierten Protein Tau bestehen. Tau sorgt vermutlich für den Aufbau und die Stabilisierung der Mikrotubuli und des Vesikeltransportes. Hyperphosphoryliertes Tau hingegen ist unlöslich und verliert die Fähigkeit an Mikrotubuli zu binden und lagert sich zu PHFs (*paired helical filaments*) zusammen. Wie bei dem Peptid A β sind nicht die unlöslichen Ablagerungen die cytotoxische Spezies, sondern die löslichen intermediären Aggregate des hyperphosphorylierten Tau Proteins. Die PHFs sind sogar in der Lage, die intermediären Aggregate zu binden und wirken somit möglicherweise protektiv (Lee et al. 2005). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die Akkumulation von

Einleitung

A β die Aggregation von Tau bedingt und vorantreibt (Gotz et al. 2001; Oddo et al. 2003; Lewis et al. 2001).

Neben dem N-terminalen Pyroglutamat im A β ₃₋₄₂, das zu 51 % in neuritischen A β - und zu 20 % in vaskulären A β -Ablagerungen von Alzheimer-Patienten zu detektieren ist (Roher et al. 1993; Kuo et al. 1998; Kuo et al. 1997), soll ein weiteres potentiell *target* der Alzheimer-Erkrankung, das Protein PIMT, in dem nachfolgenden Abschnitt vorgestellt werden. In Abb. 6 sind die drei Aminosäurereste innerhalb des A β ₁₋₄₂-Peptids, welche Ziele der PIMT-Reparatur sein können, dargestellt.



Abb. 6: A β ₁₋₄₂-Peptid mit den Isoaspartat-*hotspots* (rote Buchstaben)

Durch die Arbeiten von Kuo *et al.* und Roher *et al.* konnten in neuritischen A β -Ablagerungen 20 % und in vaskulären A β -Ablagerungen 6 % der A β -Spezies mit einem isoAsp an Position 1 detektiert werden (Kuo et al. 1997; Roher et al. 1993). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass in neuritischen A β -Ablagerungen an Position 1 und 7 des A β ~75 % isoAsp vorhanden ist, wovon ~25 % in der D-Konfiguration vorkommen (Lowenson et al. 1994; Roher et al. 1993). Darüber hinaus konnte eine schnellere Aggregation (Fabian et al. 1994) und eine erhöhte Protease-Resistenz (Kuo et al. 1998) mit Pyroglutamat und isoAsp am N-Terminus von A β in Verbindung gebracht werden. Neben dem A β konnten auch in Tau-Ablagerungen isoAsp-Modifikationen detektiert werden, die möglicherweise zu dessen Aggregation geführt haben (Shimizu et al. 2000).

Diese Ergebnisse spiegeln die Relevanz der beiden posttranslationalen Modifikationen in der Alzheimer-Krankheit wider und begründen die Notwendigkeit einer genauen Analyse von Pyroglutamat und isoAsp bzw. der QC und der PIMT.

1.3 Protein-L-isoaspartyl-(D-aspartyl)-O-methyltransferase

Die isoAsp-Modifikation stellt offenbar einen wesentlichen Schritt in der Proteinalterung und -inaktivierung dar. Um dem Funktionsverlust entgegenzuwirken, werden isoAsp-Reste spezifisch methyliert und spontan zu Asp umgebildet. Die Methylierungsreaktion wird durch das Enzym PIMT katalysiert, wobei SAM zu SAH verbraucht und Methanol gebildet wird.

Einleitung

Bereits 1965 entdeckten die beiden Wissenschaftler Axelrod und Daly ein Methanol-bildendes Enzym in Extrakten aus der Hypophyse (lat.: Glandula pituitaria) (Axelrod, Daly 1965). In den nächsten fünf Jahren entdeckten zwei weitere Arbeitsgruppen die gleiche Enzymaktivität und konnten zeigen, dass die Methylierungsreaktion an den Carboxylgruppen von Asp und Glu geschieht. Dabei nahmen sie an, dass die Carboxylgruppen der Seitenketten methyliert werden (Liss et al. 1969; Kim, Paik 1970). Im Jahr 1984 zeigten zwei Studien über die Methylierung von Adrenocorticotropin (ACTH) und synthetischen Peptiden, dass die freie α -Carboxylgruppe von isoAsp methyliert wird (Murray, Jr., Clarke 1984; Aswad 1984). Ab diesem Zeitpunkt spricht man in der Literatur von Protein-L-isoaspartyl-O-methyltransferase (PIMT oder PCMT, EC 2.1.1.77). PIMT ist ein ubiquitär exprimiertes Reparaturenzym. Es konnte sowohl in Tieren, Pflanzen, Bakterien als auch in Archaeobakterien identifiziert werden (O'Connor 1987; Ichikawa, Clarke 1998; Griffith et al. 2001; Li, Clarke 1992; Villa et al. 2006). Im Menschen sind bis heute fünf verschiedene Isoformen bekannt (Abb. 8). Ob es Funktionsunterschiede zwischen den verschiedenen Isoformen gibt, ist dabei noch ungeklärt. PIMT benötigt für die Katalyse den Cofaktor *S*-Adenosyl-L-methionin (SAM). Bei der Katalyse bringt PIMT den Cofaktor und das isoAsp-Substrat in räumliche Nähe, so dass eine Methylgruppe des SAM auf die Seitenkette des isoAsp-Substrates übertragen werden kann. Die dadurch aktivierte Seitenkette spaltet schnell Methanol ab und bildet das cyclische Succinimidyl-Intermediat, welches zu einem Asp- oder isoAsp-Peptid hydrolysiert. Das cyclische Intermediat, Succinimidyl-, kann in zwei Enolformen vorliegen. Eine Enolform unterliegt der Racemisierung, so dass Asp und isoAsp sowohl in der D- als auch der L-Konfiguration auftreten können. In Abb. 7 ist der Mechanismus der isoAsp-Entstehung und der Zeitpunkt der PIMT-Reparatur veranschaulicht.

Bisher sind fünf Isoformen der humanen PIMT identifiziert worden. Diese sind in Abb. 8 zusammen mit der murinen Isoform 1 verglichen. Die unterstrichenen Sequenzen der humanen Isoform 1 und 2 wurden in der Literatur hauptsächlich untersucht. Wobei die Isoform 1 von PIMT in der Literatur am häufigsten erwähnt wird. Dabei handelt es sich um ein monomeres Protein von 226 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 24.6 kDa. Der N-Terminus der PIMT ist dabei acetyliert (Ingrosso et al. 1989). Die Isoform 2 endet mit den Aminosäuren RDEL und ist damit um eine Aminosäure länger. Da RDEL wie KDEL eine bekannte Retentionssequenz für das Endoplasmatische Retikulum ist, wird vermutet, dass die Isoform 2 unter anderem im Endoplasmatischen Retikulum oder einem anderen Kompartiment lokalisiert ist und dort isoAsp-haltige Proteine „repariert“ (Potter et al. 1992).

Einleitung

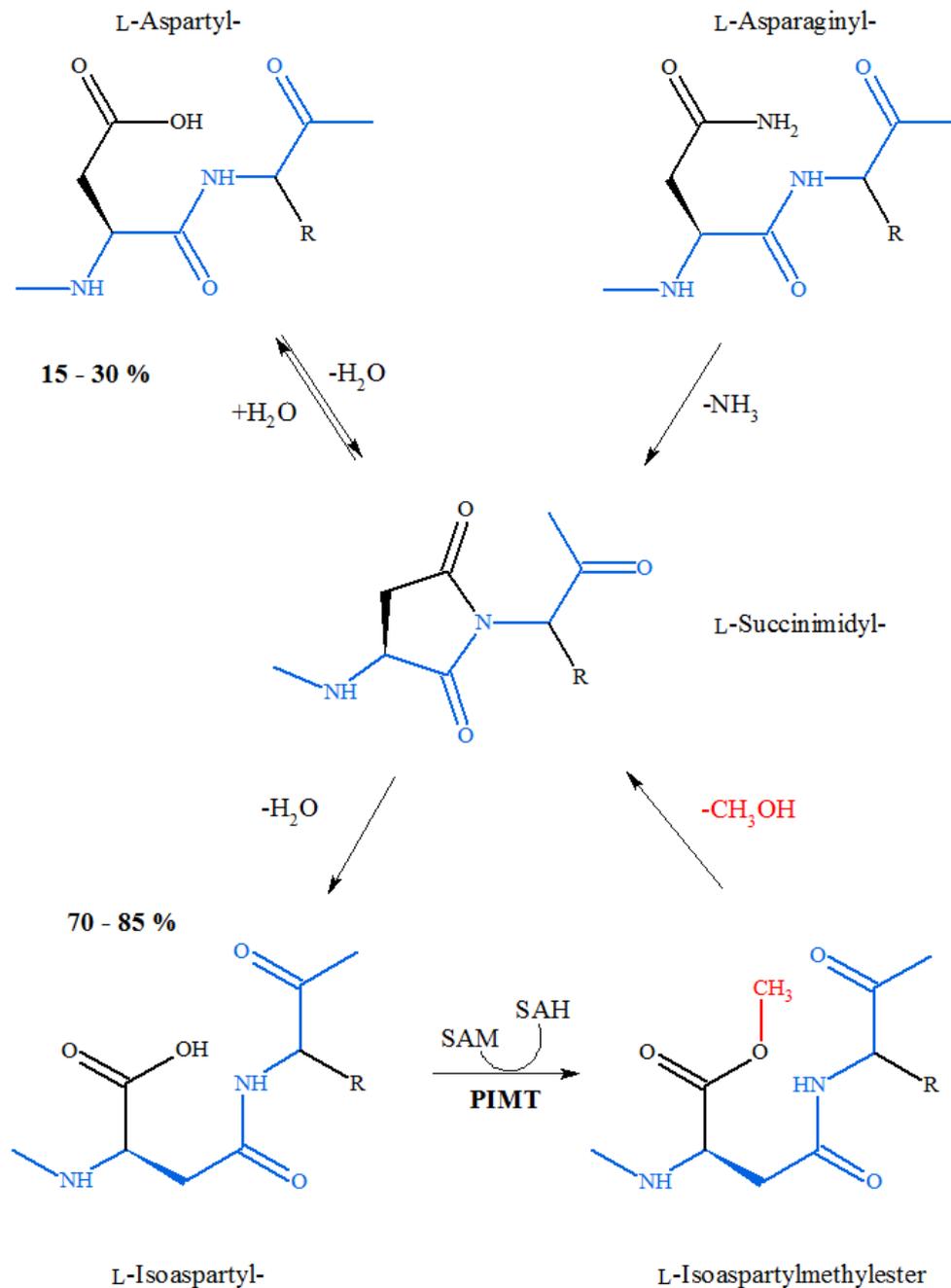


Abb. 7: Mechanismus der Isoaspartat-Entstehung und Zeitpunkt der PIMT-Reaktion. Das Succinimidyl-Intermediat entsteht durch Deamidierung von Asn oder Dehydratation von Asp. Dieses kann über eine Enolform von der L- in die D-Konfiguration wechseln und durch Hydrolyse zu Asp oder isoAsp zerfallen. PIMT katalysiert die Übertragung einer Methylgruppe vom SAM auf die freie α -Carboxylgruppe des isoAsp-Restes. Durch Abspaltung von Methanol entsteht das zyklische Succinimidyl-Intermediat und der Kreislauf kann erneut beginnen.

Einleitung

```

1 MPGARSGGSG GDGSNSGSYS GDASGAVTVW EVVSLGKLL GTVVALKVVL YLLRVCLAMA
2 MPGARSGGSG GDGSNSGSYS GDASGAVTVW EVVSLGKLL GTVVALKVVL YLLRVCLAMA
3 MPGARSGGSG GDGSNSGSYS GDASGAVTVW EVVSLGKLL GTVVALKVVL YLLRVCLAMA
4 MPGARSGGSG GDGSNSGSYS GDASGAVTVW EVVSLGKLL GTVVALKVVL YLLRVCLAMA
5 MPGARSGGSG GDGSNSGSYS GDASGAVTVW EVVSLGKLL GTVVALKVVL YLLRVCLAMA
6 MPGARIGGSG SDGSNSGRSS GDTSGAVTVW EVVSLGKLL GTVAALKVVL YLLRVCFAMA

1 WKSGGASHSE LIHNLRKNGI IKTDKVFVEM LATDRSHYAK CNPYMDSPQS IGFQATISAP
2 WKSGGASHSE LIHNLRKNGI IKTDKVFVEM LATDRSHYAK CNPYMDSPQS IGFQATISAP
3 WKSGGASHSE LIHNLRKNGI IKTDKVFVEM LATDRSHYAK CNPYMDSPQS IGFQATISAP
4 WKSGGASHSE LIHNLSRFQA TISAPHMHAY ALELLFDQLH EGAKALDVGSR VRKDDPTLLS
5 WKSGGASHSE LIHNLRKNGI IKTDKVFVEM LATDRSHYAK CNPYMDSPQS IGFQATISAP
6 WKSGGASHSE LIHNLRKNGI IKTDKVFVEM LATDRSHYAK SNPYMDSPQS IGFQATISAP

1 HMAYALELL FDQLHEGAKA LDVSGSGIL TACFARMVGC TGKVIDIDHI KELVDDSVNN
2 HMAYALELL FDQLHEGAKA LDVSGSGIL TACFARMVGC TGKVIDIDHI KELVDDSVNN
3 HM.....VGC TGKVIDIDHI KELVDDSVNN
4 RM.....VGC TGKVIDIDHI KELVDDSVNN
5 HM.....VGC TGKVIDIDHI KELVDDSVNN
6 HMAYALELL FDQLHEGAKA LDVSGSGIL TACFARMVGN SGKVIDIDHI KELVDDSVNN

1 VRKDDPTLLS SGRVQLVVD GRMGYAEAP YDAIHVGAAA PVVPQALIDQ LKPGGRLILP
2 VRKDDPTLLS SGRVQLVVD GRMGYAEAP YDAIHVGAAA PVVPQALIDQ LKPGGRLILP
3 VRKDDPTLLS SGRVQLVVD GRMGYAEAP YDAIHVGAAA PVVPQALIDQ LKPGGRLILP
4 VRKDDPTLLS SGRVQLVVD GRMGYAEAP YDAIHVGAAA PVVPQALIDQ LKPGGRLILP
5 VRKDDPTLLS SGRVQLVVD GRMGYAEAP YDAIHVGAAA PVVPQALIDQ LKPGGRLILP
6 VKKDDPMLLS SGRVRLVVD GRMGYAEAP YDAIHVGAAA PVVPQALIDQ LKPGGRLILP

1 VGPAGGNQML EQYDKLQDGS IKMKPLMGVI YVPLTDKEQ WSRWK
2 VGPAGGNQML EQYDKLQDGS IKMKPLMGVI YVPLTDKEQ WSRDEL
3 VGPAGGNQML EQYDKLQDGS IKMKPLMGVI YVPLTDKEQ WSRWK
4 VGPAGGNQML EQYDKLQDGS IKMKPLMGVI YVPLTDKEQ WSRWK
5 VGPAGGNQML EQYDKLQDGS IKMKPLMGVI YVPLTDKEQ WSRDEL
6 VGPAGGNQML EQYDKLQDGS VKMKPLMGVI YVPLTDKEQ WSRWK

```

Abb. 8: Alignment der fünf bekannten Isoformen aus dem Menschen (1-5) und der Isoform 1 aus der Maus (6) (Quelle: www.pubmed.org). 1 hat eine Länge von 285 Aminosäuren, 2 eine Länge von 286 Aminosäuren, 3 eine Länge von 250 Aminosäuren, 4 hat ebenfalls 250 Aminosäuren und 5 hat eine Länge von 251 Aminosäuren. Die unterstrichenen Sequenzen sind die, welche bei kristallographischen und enzymologischen Untersuchungen exprimiert und analysiert wurden. Dabei hat die Isoform 1 226 Aminosäuren und die Isoform 2 227 Aminosäuren. Die Isoformen 3-5 sind nicht näher charakterisiert worden.

Im Jahr 1989 konnten Ingrosso *et al.* mittels Edman-Abbau und massenspektrometrischen Methoden die Primärstruktur der Isoform 1 der humanen PIMT bestimmen. Durch Sequenzvergleiche zu bekannten Strukturen von Methyltransferasen konnte eine Domänenstruktur abgeleitet werden, die in Abb. 9 dargestellt ist. Dabei besitzt die Isoform 1 der humanen PIMT drei AdoMet-bindende Domänen. Prinzipiell besteht die humane PIMT

Einleitung

aus einer doppelt gewundenen $\alpha/\beta/\alpha$ -sandwich-Struktur (Abb. 10), wie es für die Superfamilie dieser Enzymfamilie zu erwarten ist (Ryttersgaard et al. 2002; Smith et al. 2002). Dieser Befund stimmt auch mit den Kristallstrukturen für PIMT aus *Thermatoga maritima*, dem Archaeabakterium *Pyrococcus furiosus*, *Drosophila melanogaster* und *Escherichia coli* überein (Skinner et al. 2000; Griffith et al. 2001; Fang et al. 2010; Bennett et al. 2003).

Weiterhin konnten man für die Aminosäuren auf Position 22 (Leu & Ile) und 119 (Val & Ile) potentielle Polymorphismen feststellen. Im Fall von Val₁₁₉ bzw. Ile₁₁₉ konnte dies bestätigt werden (DeVry, Clarke 1999). Mit Valin an Position 119 ist die humane PIMT temperaturlabiler und hat eine geringere Aktivität.

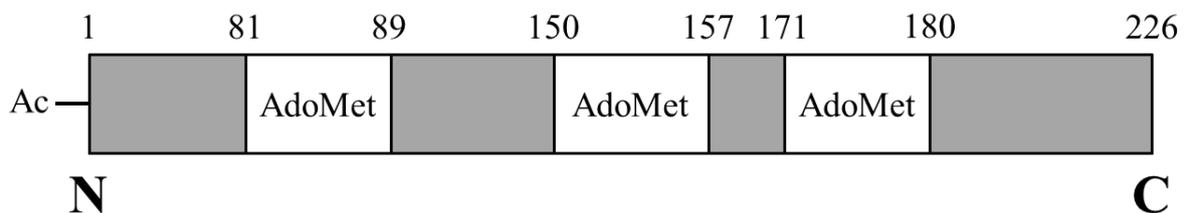


Abb. 9: Domänenstruktur der Isoform 1 der humanen PIMT. Die Isoform 1 der humanen PIMT besteht aus 226 Aminosäuren, sie ist unterteilt in drei AdoMet-bindende Domänen und besitzt einen acetylierten N-Terminus (Desrosiers, Fanelus 2011).

Isoleucin an Position 119 bedingt eine höhere Aktivität, die PIMT ist flexibler und stabiler gegenüber erhöhter Temperatur (Rutherford, Daggett 2009). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Val/Val-Genotypen ein verringertes Risiko haben, an Spina Bifida zu erkranken und dass eine Mischung aus den Varianten Val₁₁₉ und Ile₁₁₉, also ein heterozygoter Genotyp, für ein gesundes Altern von Vorteil ist (Zhu et al. 2006a; Shimizu et al. 2005; DeVry, Clarke 1999).

PIMT verfügt über eine Vielzahl unterschiedlicher endogener Substrate, was durch mehrere Arbeitsgruppen gezeigt wurde. Darunter fallen Proteine, die zur Aufrechterhaltung des Energie- und Stickstoffmetabolismus, der Entwicklung, der Signalweiterleitung, der Struktur des Cytoskeletts, der pH-Homöostase und der Proteinfaltung benötigt werden (Vigneswara et al. 2006; Reissner et al. 2006; Zhu et al. 2006b; Najbauer et al. 1996; Lanthier, Desrosiers 2004; Lanthier et al. 2002; Yamamoto et al. 1998). Beispiele sind das Tau-Protein, das Mikrotubuli-assoziierte Protein 2, α - und β -Tubulin, Collagen Typ I, Synapsin Ia-IIb, β und γ -Aktin, die Aldolase A und C, das Amyloid β und viele andere (Zhu et al. 2006b). Mit dieser

Einleitung

Anzahl an unterschiedlichen Substraten ist es nicht verwunderlich, dass PIMT mit unterschiedlichen Krankheiten und Störungen, wie Katarakt, Diabetes, verschiedenen Autoimmunerkrankungen und neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer-Krankheit in Verbindung gebracht werden konnte (Böhme et al. 2008a; Kosugi et al. 2008; Wagner et al. 2007; Tomidokoro et al. 2010).

Neben den zahlreichen Berichten, in dem die PIMT als Reparaturenzym dargestellt wird, häufen sich die Veröffentlichungen, in denen Funktionen der Regulation für die PIMT beschrieben werden.

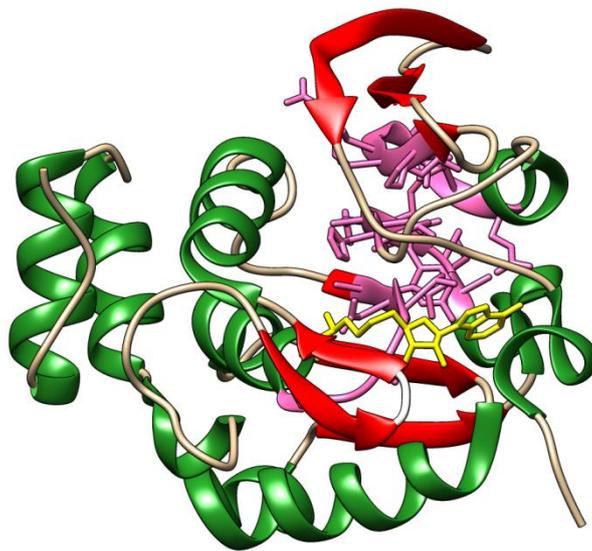


Abb. 10: Kristallstruktur der humanen PIMT (1I1N). Die Abbildung wurde mit dem Programm „Chimera“ erstellt. Alle α -Helices sind mit Grün und alle β -Faltblätter mit Rot dargestellt. Die AdoMet-Bindedomänen sind in Rosa und das SAH in Gelb hervorgehoben. Links befindet sich der N- und rechts der C-Terminus.

So haben Lee *et al.* 2012 beschrieben, dass PIMT die p53-Stabilität durch Methylierung beeinflusst und als potentielles Onkogen in Frage kommt (Lee et al. 2012). Weiterhin wurde gezeigt, dass deamidiertes bzw. isomerisiertes Bcl-xL durch PIMT „repariert“ wird und dadurch seine Funktion als Antiapoptosefaktor wieder ausführen kann (Cimmino et al. 2008). Im Jahr 2011 konnte PIMT durch Khare *et al.* als Signalgeber in dem Insulin-like Signalweg beschrieben werden (Lee et al. 2012; Khare et al. 2011; Cimmino et al. 2008). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass durch isoAsp-Bildung und anschließender PIMT-Reparatur Proteine, wie z.B. die PKA, reguliert werden können. Ebenfalls wurde beobachtet, dass durch die Bildung von isoAsp Funktionsgewinne entstehen. So ist Fibronectin nach isoAsp-Bildung

Einleitung

in der Lage an Integrin zu binden, wodurch dann unter anderem das Zellwachstum beeinflusst wird, was eine wichtige Rolle in der Tumorthherapie spielen könnte (Corti, Curnis 2011).

1.4 PIMT als Zielprotein der Wirkstoffentwicklung

In diesem Abschnitt soll die Bedeutung von PIMT in verschiedenen Organismen und das daraus resultierende Interesse an der Entwicklung von PIMT-Effektoren herausgestellt werden. PIMT *knock-out* Mäuse leiden an einem vergrößertem Gehirn und schweren bis tödlichen Krämpfen. In allen Zellen und Geweben lassen sich isoAsp-haltige Peptide und Proteine finden, aber nur im Gehirn führen diese Anhäufungen zu lebensbedrohlichen Schädigungen, wodurch die Tiere nach 4-12 Wochen sterben (Zhu et al. 2006b; Kim et al. 1997; Reissner et al. 2006; Yamamoto et al. 1998). In *Escherichia coli* verbessert PIMT die Überlebenschancen bei sekundärem Umweltstress, wie Hitze (42 °C) oder oxidativem Stress (Visick et al. 1998; Kindrachuk et al. 2003). Ebenso in *Drosophila melanogaster*, hier wird die Lebensspanne bei 29 °C im Vergleich zur Kontrolle verlängert (Chavous et al. 2001). PIMT scheint ebenfalls ein wichtiges Protein in der Stressantwort höherer Organismen zu sein, so lassen sich erhöhte PIMT-Konzentration in *Arabidopsis thaliana* und *Caenorhabditis elegans* bei Hitzestress beobachten (Villa et al. 2006; Gomez et al. 2008). Im Fall von *Caenorhabditis elegans* konnte dessen Lebensspanne durch Überexpression von PIMT verlängert werden (Kagan, Clarke 1995). Da mit steigendem Alter die fehlerfreie Funktion und Expression von Proteinen im Allgemeinen sinkt, und so auch die der PIMT, scheint es sinnvoll zu sein, Wirkstoffe zu entwickeln, die a.) die Expression von PIMT oder b.) eine Steigerung der Aktivität von PIMT bewirken. Die Novartis Corporation hat 1997 unter der Patentnummer US5780500 ein Patent für eine Familie von Verbindungen angemeldet, die die Aktivität von PIMT beeinflussen können (Abb. 11). Dabei sollte je nach Bedarf die Expression / Aktivität von PIMT gesteigert oder gesenkt werden. Da gezeigt werden konnte, dass PIMT die Apoptose von Zellen verhindern kann, sollte in degenerativen Erkrankungen, wie z.B. Alzheimer, die Aktivität von PIMT gesteigert, in proliferierenden Erkrankungen, wie Krebs hingegen die Aktivität verringert werden. Nach meinem Kenntnisstand wurden diese Wirkstoffe jedoch nie in Medikamenten verarbeitet. Weitere Patente in diese Richtung wurden bereits 1996 von der Ciba-Geigy AG unter der Patentnummer EP0726265A1 und 2002 von Bayer AG unter der Patentnummer WO2002052016A2 veröffentlicht.

Einleitung

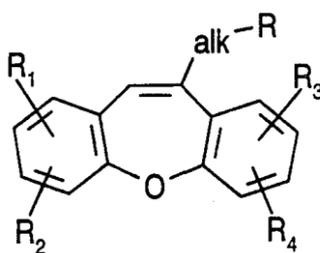


Abb. 11: PIMT- Effektor: Dibenzoxepin-Grundgerüst

Das Interesse an der Beeinflussung der PIMT-Aktivität mit Hilfe von Effektoren ist offensichtlich nicht nur bei der Probiodrug AG vorhanden.

Im nächsten Abschnitt wird zusammenfassend die Zielstellung der vorliegenden Arbeit umrissen.

1.5 Zielstellung der Dissertation

Die Probiodrug AG ist ein Unternehmen, das niedermolekulare Wirkstoffe entwickelt, die Enzyme in ihrer Aktivität beeinflussen. Neben Diabetes ist in den letzten Jahren auch Alzheimer in den Fokus der Wirkstoffentwicklung bei der Probiodrug AG gerückt. Zunächst wurde hier vor allem die QC als therapeutisches Ziel bearbeitet. Nachdem vermehrt isoAsp in A β -Ablagerungen nachgewiesen werden konnte und wir selbst isoAsp als Grund für die alternative und verstärkte Spaltung von APP ausmachen konnten (Böhme et al. 2008b; Böhme et al. 2008a), rückte das isoAsp und somit auch dessen Reparaturenzym PIMT immer mehr in den Fokus der Arbeiten der Probiodrug AG. Mit dem Ziel der Entwicklung einer kontinuierlichen Aktivitätsbestimmung für das Protein PIMT und der Frage, ob das in A β -Ablagerungen beobachtete isoAsp vor oder nach der APP-Prozessierung entsteht, wurde diese Dissertation begonnen.

In der Wirkstoffentwicklung ist die Verwendung von kontinuierlichen und optischen Enzymaktivitätsassays von Vorteil. Die momentan vorhandenen PIMT-Aktivitätsassays sind diskontinuierlich, benötigen radioaktive Substrate oder beinhalten eine zeitverbrauchende chromatographische Trennung der Reaktionspartner. Daher sollte während dieser Promotionsarbeit ein kontinuierlicher PIMT-Aktivitätsassay entwickelt werden, welcher nicht

Einleitung

auf den Umsatz von SAM zu SAH basiert, um Effektoren für das Protein PIMT, welches nicht nur in Alzheimer, sondern auch in anderen Erkrankungen wie grauer Star, Autoimmunerkrankungen und Krebs von Bedeutung ist, charakterisieren und hinsichtlich ihrer Eignung für Medikamente bewerten zu können.

Parallel dazu sollte die Frage geklärt werden, ob isoAsp auch am N-Terminus von Peptiden, wie in den A β -Ablagerungen, entstehen kann oder ob die Umlagerung von Asp zu isoAsp nur innerhalb der Peptidkette möglich ist. Hierfür musste zunächst eine geeignete Methode zur Analyse von Peptidgemischen aus Asn, Asp und isoAsp etabliert und validiert werden.

Material & Methoden

2. Materialien & Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien, Peptide, Enzyme, Mikroorganismen, Oligonukleotide

<i>Chemikalien</i>	<i>Hersteller</i>
Agar-Agar	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Agarose	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Ammoniumsulfat	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Ampicillin, Natriumsalz	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
D ₂ O (Deuteriumoxid)	Sigma-Aldrich Co., USA
deuterierte Salzsäure	Sigma-Aldrich Co., USA
deuterierte Essigsäure	Sigma-Aldrich Co., USA
DTE	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Essigsäure (100 %)	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
EDTA, Dinatriumsalz	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Kanamycinsulfat	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Salzsäure, rauchend (37 %)	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Tris	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Mes	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
ultrapures Wasser	Merck KGaA, Darmstadt

Material & Methoden

<i>Peptide</i>	<i>Hersteller</i>
Acetyl-DGEF-NH ₂	Probiodrug AG, Halle (Saale)
Acetyl-D _{iso} GEF-NH ₂	Probiodrug AG, Halle (Saale)
Acetyl-NGEF-NH ₂	Probiodrug AG, Halle (Saale)
H-A-AMC	Probiodrug AG, Halle (Saale)
H-AADA-AMC	Probiodrug AG, Halle (Saale)
H-AAD _{iso} A-AMC	Probiodrug AG, Halle (Saale)
H-AADGEF-NH ₂	Probiodrug AG, Halle (Saale)
H-AAD _{iso} GEF-NH ₂	Probiodrug AG, Halle (Saale)
H-AANGEF-NH ₂	Probiodrug AG, Halle (Saale)
H-ADA-AMC	Probiodrug AG, Halle (Saale)
H-AD _{iso} A-AMC	Probiodrug AG, Halle (Saale)
H-AEDA-AMC	Probiodrug AG, Halle (Saale)
H-AED _{iso} A-AMC	Probiodrug AG, Halle (Saale)
H-AEDA-NH ₂	Probiodrug AG, Halle (Saale)
H-AED _{iso} A-NH ₂	Probiodrug AG, Halle (Saale)
H-ARDA-AMC	Probiodrug AG, Halle (Saale)
H-ARD _{iso} A-AMC	Probiodrug AG, Halle (Saale)
H-DAEF-NH ₂	Probiodrug AG, Halle (Saale)
H-D _{iso} AEF-NH ₂	Probiodrug AG, Halle (Saale)
H-DGEF-NH ₂	Probiodrug AG, Halle (Saale)
H-D _(OMe) GEF-NH ₂	Probiodrug AG, Halle (Saale)
H-D _{iso} GEF-NH ₂	Probiodrug AG, Halle (Saale)

Material & Methoden

H-GG-OH	Bachem AG, Schweiz
H-GR-OH	Bachem AG, Schweiz
H-HY-OH	Bachem AG, Schweiz
H-NAEF-NH ₂	Probiodrug AG, Halle (Saale)
H-NGEF-NH ₂	Probiodrug AG, Halle (Saale)
H-SAADA-AMC	Probiodrug AG, Halle (Saale)
H-SAAD _{isoA} -AMC	Probiodrug AG, Halle (Saale)
<i>Enzyme</i>	<i>Hersteller</i>
<i>EcoRI</i>	New England Biolabs
<i>BamHI</i>	New England Biolabs
<i>Mikroorganismen</i>	<i>Hersteller</i>
<i>E.coli</i> DH5 α	New England Biolabs
<i>E.coli</i> BL21	New England Biolabs
<i>Oligonukleotide</i>	

Tab. 1: Sequenzen und Namen aller verwendeten Oligonukleotide. Die Oligonukleotide wurden von der Firma GATC synthetisiert.

Name	Sequenz (5'...3')
qRT-PCR sense	GCTACAGACCGCTCCCACTA
qRT-PCR anti-sense	ACATCCAACCATACGTGCAA
<i>hPIMT</i> (pcDNA) sense	ATATGAATTCATGGCCTGGAAATCCGGC
<i>hPIMT1</i> -EGFP sense	ATATGCGGCCGCAACTTCCACCTGGACCAC
<i>hPIMT1</i> -EGFP anti-sense	ATATGCGGCCGCAACAATTCATCCCTGGACCACTGCTTTTC
<i>hPIMT1</i> (pcDNA) anti-sense	ATATGCGGCCGCTCACTTCCACCTGGACCA
<i>hPIMT2</i> (pcDNA) anti-sense	ATATGCGGCCGCTTACAATTCATCCCTGGACCACTGCTTTTC
<i>hPIMT1</i> -FLAG anti-sense	ATATGCGGCCGCTCACTTGTTCATCGTCATCCTTGTAATCCTTCCACTG
<i>hPIMT2</i> -FLAG anti-sense	ATATGCGGCCGCTCACTTGTTCATCGTCATCCTTGTAATCCAATTCATCCTGGACCA
<i>mPIMT1</i> sense	ATATGAATTCATGCCGGGAGCGGCATT
N-FLAG- <i>hPIMT</i>	ATATGAATTCATGGATTACAAGGATGACGATGACAAGGCCTGGAAATCCGGC

Material & Methoden

2.1.2 Geräte

Zentrifugen

Optima™ Max Ultrazentrifuge	Beckman Coulter Inc., USA
Avanti™ J-301	Beckman Coulter Inc., USA
Avanti™ J-20	Beckman Coulter Inc., USA
Biofuge fresco	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Micro Zentrifuge	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe

CD-Spektropolarimeter

Jasco J-710	Jasco Inc., USA
-------------	-----------------

UV/Vis-Spektrometer

NanaDrop2000	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Lambda 20	Perkin Elmer Inc., USA
SmartSpec™ 3000	Bio-Rad Inc., USA

Plattenleser

Polarstar	BMG Labtech
Sunrise	Tecan

Waagen

AT261 DeltaRange®	Mettler-Toledo International Inc., USA
LP3200D	Sartorius AG, Göttingen

Sonstige Geräte

Titration DL50 Graphix	Mettler-Toledo International Inc., USA
P/ACE™ MDQ Glycoprotein	Beckman Coulter Inc., USA

Material & Methoden

System (Kapillarelektrophorese)

UV-Transilluminator UVP

(BioDoc-It™ Imaging System)

Sonorex RK 255 (Ultraschallbad) Bandelin electronic GmbH & Co KG, Berlin

Material & Methoden

2.2 Methoden

2.2.1 Untersuchungen zur Isoaspartat-Bildung

2.2.1.1 Synthese der Modellpeptide

Die Mehrzahl der verwendeten Peptide wurde durch Hans-Henning Ludwig (Probiodrug AG, Halle/Saale) synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Peptide konnten als C-terminale Amide im 0.5 mmol Ansatz an einem automatisierten Peptid-Synthesizer (Endeavour 90, AAPPTec) nach der Fmoc-Strategie generiert werden. Die Synthese der Peptide erfolgte an einem Rink Amide MBHA Harz (MERCK Biosciences). Ein zweifacher Überschuss an Fmoc-AA-OH und 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium Tetrafluoroborat (TBTU) in Dimethylformamid (DMF) und 4 eq. N,N-Diisopropylethylamin wurden für den Kupplungsprozess verwendet. Die Reaktionszeit betrug circa 25 min und jeder Kupplungsschritt wurde einmal wiederholt. Die Entfernung der Schutzgruppe Fmoc erfolgte mit einer 20 %igen Piperidinlösung in DMF. Die Peptide wurden in 95 % Trifluoressigsäure (TFA), 2.5 % Wasser und 2.5 % Triisopropylsilan (TIS) für 2 h vom Harz abgespalten. Nach Evaporation der Lösungsmittel wurde das Produkt in kaltem Methanol/Ether erneut kristallisiert und abschließend mittels RP-HPLC an einer Luna 10 µm C18-Säule (100A, 250 x 21.20 mm, Phenomenex) durch einen Acetonitril/Wasser-Gradienten (0.04 % TFA) gereinigt.

2.2.1.2 Analyse der isoAsp-Bildung mittels Kapillarelektrophorese (CE-UV)

Die Modellpeptide wurden bei 37 °C in einem 3-Komponenten-Puffer mit 12.5 mM Natriumacetat, 12.5 mM 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) und 25.0 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) inkubiert, um über einen breiten pH-Bereich eine gleichbleibende Ionenstärke gewährleisten zu können (Ellis, Morrison 1982). Zusätzlich erhielten die Peptidansätze 0.02 % (w/v) Natriumazid, um mikrobielles Wachstum zu verhindern. Die Inkubationszeit schwankte zwischen Minuten bis Monate in Abhängigkeit vom inkubierten Peptid und dem gewählten pH/pD-Wert. Aus Gründen, die im Ergebnisteil kurz erläutert werden, entschieden wir uns zur Analyse der Peptidproben für die Kapillarelektrophorese mit angeschlossenem Diodenarray. Die Kapillarelektrophorese wurde an einem P/ACE™ MDQ Glycoprotein System (Beckman Coulter, USA) mit einer Kapillare von 30 cm Länge und einen inneren Durchmesser von 50 µm durchgeführt. Die Trennung der

Material & Methoden

Peptide erfolgte bei 20 °C. H-NGEF-NH₂, H-D_(OMe)GEF-NH₂, H-DGEF-NH₂, H-D_{iso}GEF-NH₂, H-NAEF-NH₂, H-DAEF-NH₂, H-D_{iso}AEF-NH₂, Acetyl-NGEF-NH₂, Acetyl-DGEF-NH₂, Acetyl-D_{iso}GEF-NH₂, H-AANGEF-NH₂, H-AADGEF-NH₂ und H-AAD_{iso}GEF-NH₂ wurden in 50 mM Citrat/HCl pH 2.0 getrennt. H-AEDA-AMC, H-AED_{iso}A-AMC, H-AEDA-NH₂ und H-AED_{iso}A-NH₂ wurden in 50 mM Citrat/NaOH pH 3.0 getrennt, da hier eine bessere Basislinientrennung erfolgte. Die Injektion der Probe erfolgte mit 1 psi für 10 s. H-NGEF-NH₂, H-D_(OMe)GEF-NH₂, H-DGEF-NH₂, H-D_{iso}GEF-NH₂, H-NAEF-NH₂, H-DAEF-NH₂, H-D_{iso}AEF-NH₂, H-AEDA-AMC, H-AED_{iso}A-AMC, H-AEDA-NH₂, H-AED_{iso}A-NH₂, Acetyl-NGEF-NH₂, Acetyl-DGEF-NH₂ und Acetyl-D_{iso}GEF-NH₂ konnten bei 20 kV und 0.2 psi innerhalb von 10 min getrennt werden. Die Kapillare wurde nach jedem Lauf mit 0.2 M NaOH, 1 N HCl und Laufpuffer gespült. In Abb. 12 ist der schematische Aufbau einer CE-Apparatur dargestellt. Mit Hilfe des internen Standards H-HY-NH₂ und den erstellten Standardgeraden für jedes Peptid konnte die Konzentration durch die Auswertung der Integrale der einzelnen Peptide im Verhältnis zum Integral von H-HY-NH₂ bestimmt werden.

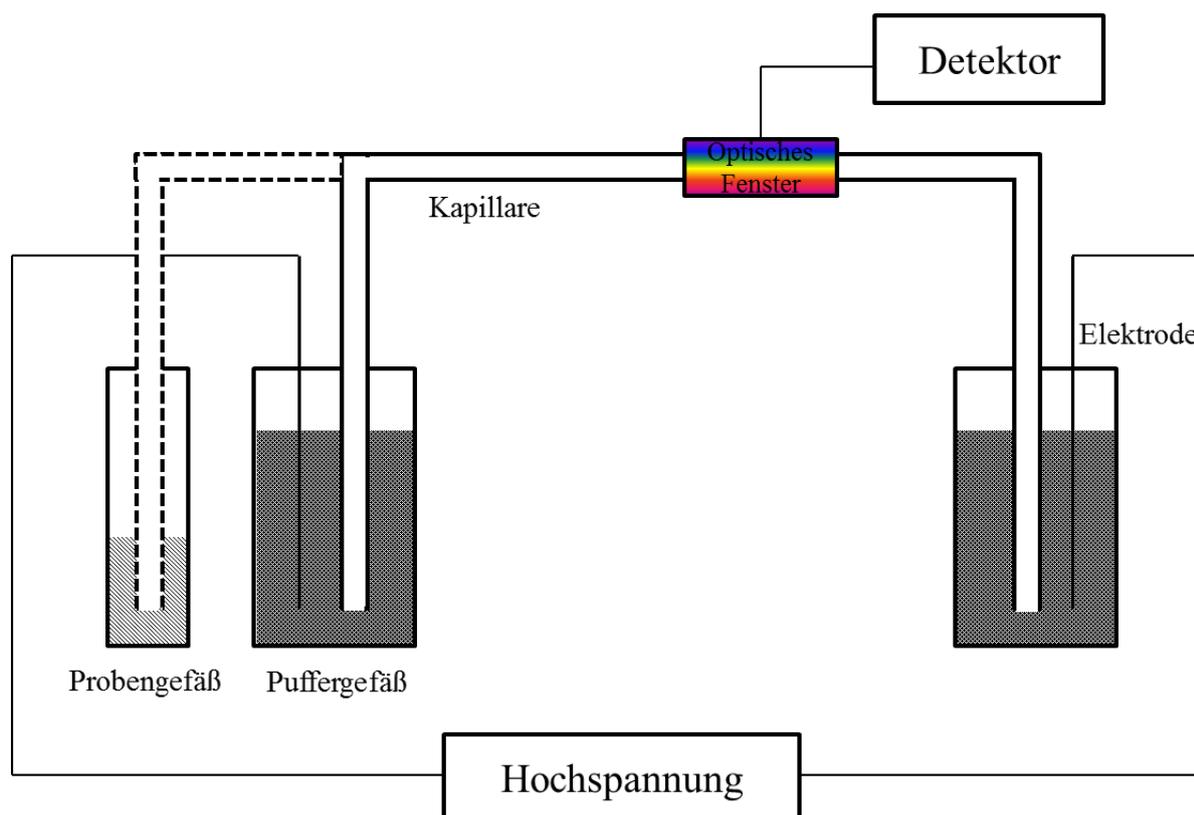


Abb. 12: Schematische Darstellung einer CE-Apparatur.

Material & Methoden

2.2.1.3 Kernspinresonanzspektroskopie

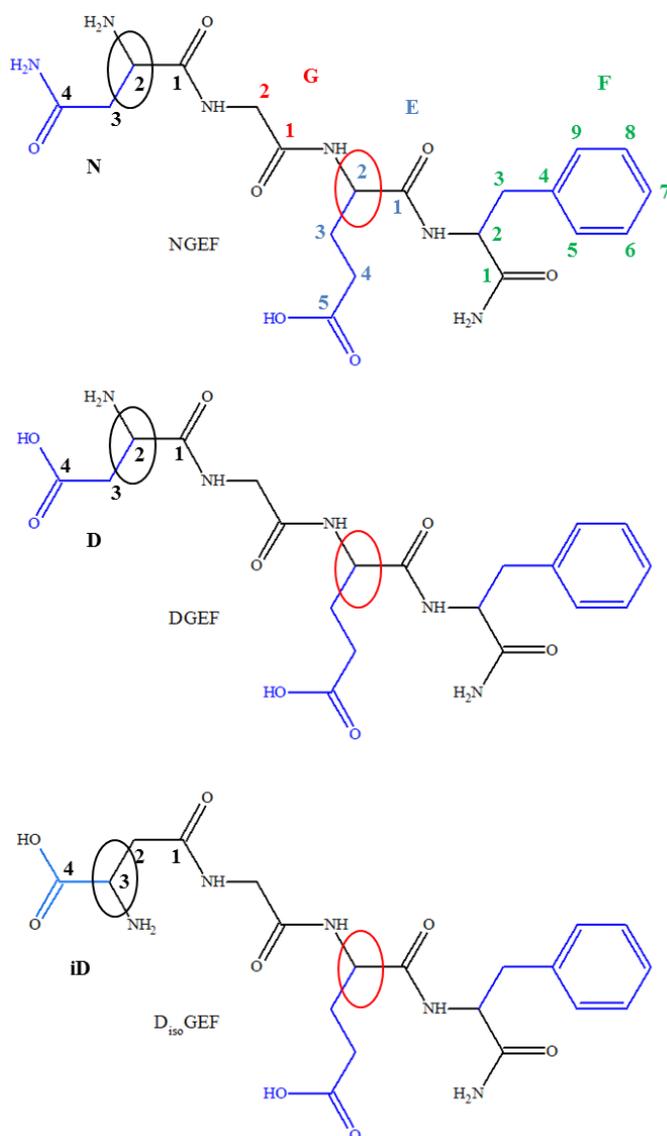


Abb. 13: ¹H-NMR als unabhängiger Nachweis von isoAsp. Dargestellt sind die drei Peptidspezies, die mit Hilfe der ¹H-NMR unterschieden werden konnten. Das Protonensignal von Glu-C_α (E2, rote Ellipsen) mit einer chemischen Verschiebung von 4.15 ppm wurde dabei als interner Standard verwendet. Die Protonensignale von Asn-C_α (N2, schwarze Ellipse, oben) mit einer chemischen Verschiebung von 4.25 ppm und D_{iso}-C_α (iD3, schwarze Ellipse, unten) mit einer chemischen Verschiebung von 4.05 ppm konnten gut unterschieden werden. Das Protonensignal von D2 (schwarze Ellipse, mittig) kann aufgrund der geringen Konzentration vernachlässigt werden. Die Auswertung erfolgte durch den Vergleich der normierten Intensitäten der Protonensignale.

Die Beobachtungen aus der CE-UV zur Bildung von isoAsp mussten durch eine zweite unabhängige Methode bestätigt werden. Hierfür wurde die ¹H-NMR genutzt. Die ¹H-NMR-Spektren wurden an einem Agilent VNMRS 600-MHz Spektrometer bei 25 °C aufgenommen. Die NMR-Proben enthielten 1.726 mM Peptid in 25 mM Tris, 12.5 mM Essigsäure und

Material & Methoden

12.5 mM Mes pH 7. Es wurden 40 Spektren je Probe aufgezeichnet. Das Wasser-Signal wurde durch einen 2 s Vor-Sättigungsimpuls unterdrückt. Ein 90°-Anregungsimpuls (6.1 μ s) mit einer Impulsfolge von 15 s wurde angewendet.

2.2.1.4 Bestimmung des pK_S der freien N-Termini von Modellpeptiden mittels pH-Titration

Die Auswertung der pH-Abhängigkeit der isoAsp-Bildung aus 2.2.1.2. forderte eine pK_S -Bestimmung des freien N-Terminus der Modellpeptide.

Die Titrations wurden an einem Mettler Toledo DL50 Graphix mit einer DG111-SC Glass-Elektrode durchgeführt. Als Maßlösungen wurden 0.1 N NaOH und 0.1 N HCl der Firma Roth verwendet. Die Peptide wurden in bi-destilliertem Wasser gelöst und bei 37 °C inkubiert. Die Titration wurde ebenfalls bei 37 °C durchgeführt und erfolgte mindestens im Triplett. Die Ermittlung des pK_S -Wertes erfolgte durch die Software des Gerätes.

2.2.1.5 Lösungsmittel-Isotopie-Effekt (KIE) und *proton inventory*

Um den kinetischen Lösungsmittel-Isotopie-Effekt (KIE) des Isomerisierungsprozesses zu bestimmen, wurden alle Puffer sowohl mit destilliertem Wasser als auch Deuteriumoxid hergestellt. Der pD-Wert wurde entsprechend der Formel: $pD = (pH\text{-Wert}) + 0.4$ (Cook 1991) eingestellt. Der KIE für die isoAsp-Bildung ($k_{(D_2O)}/k_{(H_2O)}$) wurde für H-NGEF-NH₂ und H-D_(OMe)GEF-NH₂ in 3-Komponenten-Puffer (25 mM Tris, 12.5 mM Essigsäure, 12.5 mM Mes) pH/pD 8.0 bestimmt. Zusätzlich wurde der KIE für H-NGEF-NH₂ auch in Tricinpuffer pH/pD 8.0 bestimmt, um den Einfluss von Pufferionen auszuschließen. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C. Nach Minuten bis Tagen, je nach Peptid, erfolgte die Probenentnahme. Dazu wurden die Proben sofort in flüssigen Stickstoff überführt, um die Reaktion zu stoppen. Der Transport zur CE-UV erfolgte im Transportblock bei -20 °C.

Um die Anzahl der beteiligten Protonen bei der isoAsp-Bildung zu bestimmen, wurde ein *proton inventory* durchgeführt. Dazu wurde 1 mM des Peptides (H-NGEF-NH₂ oder H-D_(OMe)GEF-NH₂) in 3-Komponenten-Puffer pH/pD 8, hergestellt mit H₂O und D₂O, gelöst. Beide Peptidlösungen wurden sowohl rein als auch in den folgenden Mischverhältnissen untersucht: 80 % (v/v) H₂O zu 20 % (v/v) D₂O, 60 % (v/v) H₂O zu 40 % (v/v) D₂O, 40 % (v/v) H₂O zu 60 % (v/v) D₂O und 20 % (v/v) H₂O zu 80 % (v/v) D₂O. Die Peptidlösungen

Material & Methoden

wurden bei 37 °C inkubiert und sukzessiv mittels Kapillarelektrophorese analysiert. Für die Auswertung wurde die Geschwindigkeit der isoAsp-Bildung gegen die D₂O-Molfraktionen aufgetragen. Der resultierende Plot wurde mit dem Programm "GraphPad Prism 4" von GraphPad Software Inc. dargestellt und analysiert.

2.2.2 Präparation von rekombinanter humaner PIMT (*rhPIMT*)

Der Vektor pQE31-*hPIMT* (Isoform 1) war bereits im Labor vorhanden und konnte von Probiobrug zur Verfügung gestellt werden. Dieser wurde mit Hilfe der „Hitzeschock“-Methode in chemokompetente *E.coli* BL 21 transformiert. Die transformierten Zellen wurden auf einer LB-Agar-Platte mit 50 µg/ml Ampicillin ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Eine 100 ml Kultur diente zur Inokulation einer Hauptkultur. Die 6 l-Hauptkultur (50 µg/ml Ampicillin) wurde mit 60 ml der Über-Nacht-Kultur inokuliert. Die Hauptkultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6 bei 37 °C und 200 rpm inkubiert, dann wurde durch Zugabe von IPTG bis zu einer finalen Konzentration von 1 mM die Expression der *rhPIMT* gestartet. Die Expression des Zielproteins erfolgte für 4 h bei 37 °C und 200 rpm. Zur Zellernte wurde die Zellsuspension für 20 min bei 8000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment bis zum Aufschluss bei -20 °C gelagert.

Das Zellsediment wurde in Lysispuffer (50 mM Tris/HCl pH 8, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM Pefabloc SC®) (10 ml Puffer je 1 g Zellsediment) resuspendiert. Lysozym wurde bis zu einer finalen Konzentration von 0.1 mg/ml zur Zellsuspension gegeben und für 40 min bei 4 °C inkubiert. Der finale Aufschluss erfolgte entweder durch Ultraschall mit dreimal 10 s bei 90 % Leistung oder durch *french press* bei einem Druck von 1 bar. Bei beiden Verfahren wurde die Zell-/Proteinsuspension zwischen den Aufschlusszyklen auf Eis gekühlt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 100 000 g für 40 min und 4 °C.

Der Überstand nach der Zentrifugation wurde einer Ammoniumsulfat-Fällung unterzogen. Dazu wurde sehr langsam fein gemörsertes Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 70 % der Proteinlösung zugeführt und anschließend für 30 min bei RT und 100 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Proteinlösung für 40 min bei 4 °C und 100 000 g zentrifugiert.

Das Proteinsediment wurde in Säulenpuffer 1A (10 mM BisTris/HCl pH 7.2, 1.5 mM MgCl₂, 2 mM DTT) resuspendiert und gegen 2 l des Selbigen über Nacht dialysiert. Das Dialysat wurde anschließend auf eine Q-Sepharose FF-Säule (V=53 ml) aufgetragen.

Material & Methoden

Nachdem die Proteinlösung auf die IEC-Säule aufgetragen und mit Säulenpuffer 1A gewaschen wurde, konnte durch Verwendung von Säulenpuffer 1B (10 mM BisTris/HCl pH 7.2, 1.5 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 0.3 M NaCl) die Elution mit steigender Salzkonzentration von 0 mM NaCl bis 0.3 M NaCl über 150 ml durchgeführt werden. Die Fraktionierung wurde bei 280 nm verfolgt und die einzelnen Fraktionen mittels SDS-PAGE analysiert.

Die PIMT-haltigen Fraktionen wurden vereinigt und mit Hilfe von Vivaspin 20-Röhrchen (Sartorius AG, Deutschland, Ausschlussgröße: 10 kDa) konzentriert. Das Proteinkonzentrat wurde aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.2.3 Präparation von rekombinanter muriner PIMT (*rmPIMT*)

Der Vektor pET28-*mPIMT* wurde mittels „Hitzeschock“ in chemokompetente *E.coli* BL21 transformiert. Die transformierten Zellen wurden auf einer LB-Agar-Platte mit 100 µg/ml Kanamycin ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die weitere Zellanzucht und Zellernte erfolgte analog zur *rhPIMT*.

Der Aufschluss des Zellsedimentes erfolgte durch Frost-Tau-Lyse. Dafür wurde das Zellsediment in Lysispuffer (50 mM NaH₂PO₄, 1 mM EDTA, 1 mM DTE, 100 mM NaCl, 1 mg/ml Lysozym, pH 7.6) resuspendiert und dreimal in flüssigen Stickstoff eingefroren und im Wasserbad (30 °C) aufgetaut. Das Lysat wurde 45 min bei 100 000 g zentrifugiert. Der Überstand (Proteinrohextrakt) wurde abgenommen und dessen Proteinkonzentration mittels BRADFORD-Reagenz (Sigma) bestimmt. Das Sediment aus Zellbruchstücken und nicht-aufgeschlossenen Zellen wurde verworfen. Der Überstand wurde verdünnt und auf eine EBA-IMAC-Säule aufgetragen.

Die EBA-IMAC-Säule wurde mit Equilibrierungspuffer (300 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.6) invers eingespült. Der verdünnte Proteinrohextrakt wurde mit 12 ml/min ebenfalls invers aufgetragen bis die Adsorption bei 280 nm wieder den Ausgangswert erreichte. Der Waschschritt erfolgte in normaler Richtung mit 300 mM NaCl, 50 mM Imidazol, 50 mM Tris/HCl pH 7.6 mit 10 ml/min bis der Grundwert der Adsorption bei 280 nm wieder erreicht wurde. Die erste Elution erfolgte mit 100 mM NaCl, 100 mM Imidazol, 50 mM Tris/HCl pH 7.6 und die zweite Elution mit 100 mM NaCl, 200 mM Imidazol, 50 mM Tris/HCl pH 7.6 ebenfalls mit 10 ml/min. Die beiden Elutionsfraktionen wurden über Nacht gegen 25 mM Tris pH 8.3 dialysiert.

Material & Methoden

Für die Dialyse wurden Dialyse-Membranen von Spectrum Laboratories Inc.; CA/USA (Spectra/Por®Dialysis Membrane, 6-8000 Da-Porengröße) benutzt. Die Dialyse der beiden Elutionsfraktionen erfolgte gegen 25 mM Tris pH 8.3 im Verhältnis 1:1600 über Nacht bei 4-8 °C im Kühlraum. Die dialysierten Proteinlösungen wurden für 45 min bei 100 000 g zentrifugiert und dann über eine IEC-Säule weiter gereinigt.

Die Equilibrierung der IEC-Säule erfolgte mit 40 mM Tris pH 8.3. Die dialysierten Proteinlösungen wurden auf die Säule gegeben. Der Durchlauf wurde aufgefangen und mit Hilfe von Vivaspin 20-Röhrchen (Sartorius AG, Deutschland, Ausschlussgröße: 10 kDa) konzentriert. Das Proteinkonzentrat wurde aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Alle Schritte der Reinigung wurden mit Hilfe von SDS-PAGE und dem APN-gekoppelten PIMT-Aktivitätsassay dokumentiert.

2.2.4 PIMT-Aktivitätsassays

2.2.4.1 Gekoppelter optischer Test mit Aminopeptidase N

Bei der Aminopeptidase N (EC 3.4.11.2; Aminopeptidase M, CD 13) handelt es sich um eine membrangebundene Metallopeptidase vom Typ II. Sie spaltet Peptidbindungen vom N-Terminus her, kann jedoch eine Isopeptidbindung nicht hydrolysieren. Diese Eigenschaft wurde ausgenutzt, um einen optisch gekoppelten PIMT-Aktivitätsassay zu entwerfen. IsoAsp-Substrate mit dem Fluorophor Aminomethylcoumarin (AMC) am C-Terminus wurden generiert. Diese können erst nach der Reparatur durch PIMT von der APN vollständig abgebaut werden, wodurch das AMC freigesetzt wird. Dieses kann dann bei 365 nm angeregt werden und emittiert Licht mit der Wellenlänge 440 nm. Die Fluoreszenz des Ausgangssubstrates ist vernachlässigbar. Für die Versuche wurde ebenfalls der 3-Komponenten-Puffer aus 12.5 mM Essigsäure, 12.5 mM MEs und 25 mM Tris mit unterschiedlichen pH-Werten gewählt. Die Reparaturreaktion der PIMT wurde nach unterschiedlichen Zeitpunkten durch Inkubation bei 95 °C für 5 min irreversibel beendet. Bis zur Quantifizierung der Konzentration an repariertem isoAsp-Peptid, blieben die gestoppten Proben auf Eis. Die Analyse der Proben erfolgte mittels APN (0.06 U) bei pH 7 und 37 °C in klaren 96-Well-Platten von NUNC in einem Plattenlesegerät „Polarstar“ von BMG Labtech.

Material & Methoden

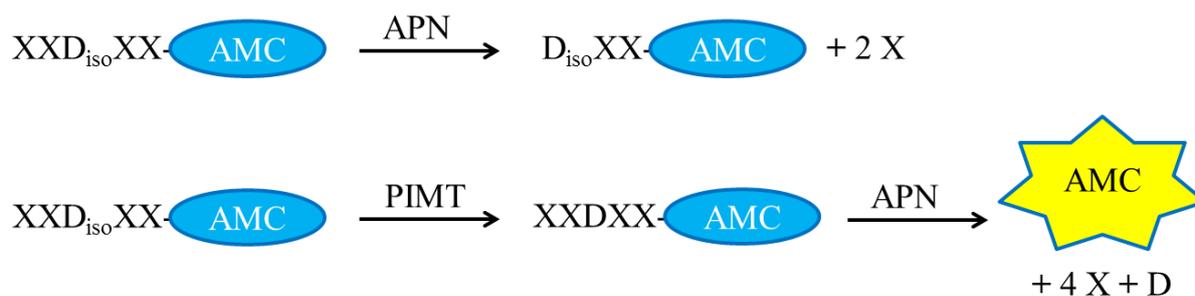


Abb. 14: Prinzip des APN-gekoppelten PIMT-Aktivitätsassays. APN kann keine iso-Peptidbindung spalten. Die PIMT „repariert“ isoAsp im Substrat, APN kann die Peptidbindungen nacheinander hydrolysieren bis das Fluorophor 4-Amino-7-methylcoumarin (AMC) freigesetzt wird. Das AMC kann nach Anregung bei 365 nm Licht der Wellenlänge 440 nm emittieren. Die Emission kann bei 440 nm quantifiziert werden. Da PIMT kein N-terminales isoAsp methylieren kann, muss die durch PIMT katalysierte Reaktion durch Inaktivierung der PIMT für 5 min bei 95 °C abgestoppt werden. Erst danach kann das Hilfsenzym APN zugesetzt werden.

2.2.4.2 Analyse mittels Kapillarelektrophorese

Für die Analyse der Reparatur von H-AED_{iso}A-AMC zu H-AEDA-AMC wurden die Proben in 50 mM Citrat/NaOH pH 3.0 bei 20 kV und 0.2 psi bei 20 °C getrennt. Die Trennung wurde bei einer Absorption von 200 nm detektiert.

2.2.4.3 Nachweis von S-Adenosyl-L-homocystein mittels HPLC-UV

Die HPLC-Trennungen erfolgten an einem HITACHI D-7000 HPLC-System. Für die RP-HPLC wurde eine C-18-Säule LiChroCART 125-4 von Merck verwendet. Die Säule wurde mit 2 % AcN (0.1 % TFA) und 98 % H₂O (0.1 % TFA) equilibriert. Nachdem 20 µl der Probe injiziert wurden, wurde ein Gradient zu 12 % AcN (0.1 % TFA) und 88 % H₂O (0.1 % TFA) über 11 min durchgeführt. Danach wurde die Säule für 5 min mit 95 % AcN (0.1 % TFA) und 5 % H₂O (0.1 % TFA) gewaschen und für weitere 5 min mit 2 % AcN (0.1 % TFA) und 98 % H₂O (0.1 % TFA) erneut equilibriert. Der HPLC-Lauf erfolgte bei Raumtemperatur und wurde bei 260 nm verfolgt.

2.2.5 Molekulare und biochemische Charakterisierung von PIMT

Um die Protein-L-isoaspartyl-O-methyltransferase aus Mensch und Maus charakterisieren und potentielle Unterschiede in der zellulären Verteilung der menschlichen Isoformen 1 und 2 in Zellkultur untersuchen zu können, mussten verschiedene Plasmide generiert werden. Tab. 1

Material & Methoden

listet alle Oligonukleotide auf, die während dieser Promotionsarbeit verwendet wurden, um die benötigten Plasmide generieren zu können.

2.2.5.1 Klonierung der Plasmide

polymerase chain reaction (PCR) (Generierung der Zielsequenz)

Zur Generierung der Plasmide für die Expression in *E.coli* und Säugerzellkultur wurde der folgende Ansatz standardmäßig benutzt:

- V = 50 µl
 - 10 µl *High Fidelity* Puffer
 - 1 µl dNTP-Mix
 - 2.5 µl *sense primer* (20 µM)
 - 2.5 µl *anti-sense primer* (20 µM)
 - x µl Vektor, cDNA oder Zellextrakt
 - 0.5 µl *Phusion*-DNA-Polymerase
 - ad 50 µl gereinigtes Wasser

- Programm:

2 min 98 °C	initiale Denaturierung	
10 s 98 °C	Denaturierung	} 30-35 Zyklen
30 s 63 °C	<i>primer</i> -Bindung	
30 s 72 °C	Elongation	
5 min 72 °C	finale Elongation	
∞ 4 °C	Lagerung	

Die Restriktion von Vektor und Zielfragment wurde mit den Endonukleasen der Firma Promega oder NEB durchgeführt. Nach der Restriktion wurden die Ansätze mit einem Plasmidpräparations-Kit gereinigt und anschließend mit einem Ligations-Kit von NEB oder Promega zusammengesetzt. Es folgte die Transformation der Ligationsansätze in *E.coli* und die Kontrolle des Erfolges der Transformation per Kolonie-PCR und Testverdau. Alle Reaktionen erfolgten nach den Vorgaben der Hersteller. Die Kontrolle des Klonierungserfolges erfolgte stets durch eine Kolonie-PCR und ein Testverdau nach Protokoll (Promega, NEB).

Material & Methoden

Der Ansatz für eine typische Kolonie-PCR:

- V = 10 µl
 - 2 µl 5x Reaktionspuffer
 - 1 µl 10 mM dNTP-Mix
 - x µl *primer forward*
 - y µl *primer reverse*
 - z µl DNA-Polymerase
 - 1 µl einer resuspendierten *E.coli*-Kolonie
 - ad 10 µl gereinigtes Wasser
- Programm wie in 2.2.5.1
- Die Analyse der PCR erfolgte per Agarosegel-Elektrophorese

Der typische Ansatz eines Testverdau:

- V = 10 µl
 - 1 µl 10x Reaktionspuffer
 - x µl Restriktionsenzym A
 - y µl Restriktionsenzym B
 - z µl 10 mM MgCl₂
 - 2 µl Plasmid
 - ad 10 µl gereinigtes Wasser
- T = 37 °C für 1-2 h

Waren sowohl Kolonie-PCR als auch Testverdau positiv, erfolgte die Sequenzierung der entsprechenden Plasmide durch die Firma GATC Biotech (www.gatc-biotech.com). Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm „Chromas“ von Connor McCarthy (Griffith Universität, Australien) ausgewertet.

Material & Methoden

2.2.5.2 Lokalisation von PIMT

quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Die qRT-PCR wurde durchgeführt, um die Konzentration der PIMT-mRNA in den verschiedenen Organen und ausgewählten Gehirnarealen der Maus bestimmen zu können. Dabei verwendet man während der PCR *primer*, die auf dem Ziel-Transkript relativ nah beieinander liegen. Da die mRNA instabil ist, wird diese vorher zu cDNA umgeschrieben. Die cDNA und die *primer* durchlaufen zusammen mit der Polymerase, den dNTPs und dem Fluoreszenzfarbstoff mehrere PCR-Zyklen. Der Fluoreszenzfarbstoff interkaliert in die PCR-Produkte, wodurch nach jedem Zyklus (*real time*) die Intensität der Fluoreszenz gemessen werden kann. Die Intensität der Fluoreszenz wird dann mit dem Standard verglichen, dadurch kann auf die Konzentration der Ziel-mRNA geschlossen werden. Der Standard wird durch verschiedene Ansätze der Zielsequenz mit bekannter Konzentration (Plasmid) und den spezifischen *primer* erstellt.

Verschiedene Organe und Hirnareale von drei männlichen und drei weiblichen Wildtypmäusen vom Stamm C57BL6/N wurden mittels Precellys-Keramikkugel-System homogenisiert. Die Zentrifugation des Homogenats erfolgte für 10 min bei 10 000 g. Die mRNA-Isolation wurde für fast alle Proben mit dem Nucleo-Spin® RNA II Kit von Machery-Nagel (Düren) durchgeführt. Bei den fibrösen Geweben von Herz- und Skelettmuskel wurde das RNeasy Micro-Kit von Qiagen benutzt. Die erhaltene mRNA wurde mittels *random primer* (Roche) und Superscript III RT (Invitrogen) in cDNA überführt. Hierfür wurden 500 ng mRNA je aufgeschlossenem Gewebe/Hirnareal benutzt. Die Durchführung erfolgte nach der Beschreibung des Herstellers. Für die eigentliche quantitative PCR (qRT-PCR) wurde die kodierende Sequenz der *mPIMT* in den Vektor pJet1.2 eingebracht und als Standard mitgeführt. Dadurch konnte auf die tatsächliche Menge mRNA zurückgeschlossen werden. Für die qRT-PCR wurden jeweils 14 µl Mastermix (*primer*Mix, SybrGreenMix, Wasser) und 1 µl cDNA-Probe bzw. Referenzplasmid gemischt und gemessen. Die Messung wurde an einem Rotogene3000 von Corbett Research durchgeführt. Zur Kontrolle wurde ein 2 % (w/v) Agarosegel mit den PCR-Produkten beladen und analysiert.

Western Blot nach fraktioniertem Zellaufschluss

Mittels fraktioniertem Zellaufschluss sollte herausgefunden werden, ob die untersuchten Isoformen der humanen PIMT in unterschiedlichen Kompartimenten lokalisiert sind. Durch

Material & Methoden

einen schonenden Aufschluss der Zellen und eine verschieden starke Zentrifugation des Zelllysates kann dies erreicht werden. Die Plasmide pcDNA3.1, pcDNA3.1-*hPIMT1*-EGFP, pcDNA3.1-*hPIMT2*-EGFP, pcDNA3.1-*hPIMT1*-FLAG und pcDNA3.1-*hPIMT2*-FLAG wurde mit Hilfe von Lipofectamine2000® (Invitrogen) in HEK293-Zellen nach Protokoll des Herstellers transfiziert. Nach der Transfektion inkubierten die Zellen noch 1-2 Tage in komplementiertem DMEM bei 37 °C und 5 % CO₂. Danach erfolgte das Waschen der Zellen mit PBS, sowie die Ablösung der Zellen von der Wand des Inkubationsgefäßes. Nach der Zentrifugation bei 500 g und 4 °C für 5 min wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Das Zellsediment wurde in 1 ml Resuspensionspuffer (50 mM Tris, 50 mM KCl, 5 mM EDTA, 2 mM MgCl₂, pH 7.6, RP) aufgenommen und für 10 min inkubiert. Danach folgten 30 *crushes* mit dem *Potter Cell Homogenizer*. Die Suspension wurde bei 700 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Das Sediment wurde in 300 µl RP resuspendiert und mit „D“ für *debris* gekennzeichnet. Der Überstand wurde bei 20 000 g und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 200 µl RP resuspendiert und mit „HM“ für *heavy membrane* gekennzeichnet. Es folgte eine weitere Zentrifugation des Überstandes bei 100 000 g und 4 °C für 1 h. Das Sediment wurde in 200 µl RP resuspendiert und mit „LM“ für *light membrane* gekennzeichnet. Der Überstand erhielt die Kennzeichnung „S“ wie *soluble*. Die Fraktionen D, HM und LM wurden für 10 sec mittels Ultraschall behandelt. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford® ermittelt. 30 µg Gesamtprotein pro Tasche wurden auf ein 15 %iges SDS-PAGE-Gel geladen und 90 min bei 50 mA getrennt. Anschließend wurden die Proteine vom Gel auf eine Nitrocellulose-Membran mittels einer *Semi-Dry*-Blot-Apparatur bei 39 mA für 90 min übertragen. Die Inkubation der Membran erfolgte über Nacht mit dem primären Antikörper (α -EGFP, α -FLAG) in 5 %iger Milchpulver-TBST-Lösung im Kühlraum unter ständigem Drehen. Am nächsten Tag folgte das Waschen der Membran (3 x 5 min TBS-Puffer) und die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 1 h bei RT unter ständigem Drehen. Nach dreimaligem Waschen mit TBS wurde das Substrat zugegeben und das Chemolumineszenz-Signal mittels lichtempfindlichen Materials dokumentiert.

Immunfluoreszenz

Die zelluläre Lokalisierung der Isoformen 1 und 2 der humanen PIMT sollte in diesem Abschnitt per Immunfluoreszenz untersucht werden. LN405 und COS7-Zellen wurden mit den Plasmiden pcDNA3.1-*hPIMT1*-EGFP und pcDNA3.1-*hPIMT2*-EGFP mittels Lipofectamine™2000 (Invitrogen) transfiziert und für 1-2 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ in

Material & Methoden

FBS und Gentamycin inkubiert. Danach wurde das Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit PBS (Invitrogen) gewaschen und danach entweder mit eiskaltem (-20 °C) Methanol oder Formaldehydlösung für 10 min fixiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS erfolgte die DAPI-Färbung für 30 sec. Nach abermaligem Waschen mit PBS wurden die Präparate versiegelt und bis zur Analyse dunkel bei 4 - 8 °C gelagert. Die Analyse erfolgte mit Hilfe eines Epi-Fluoreszenz-Mikroskops oder eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops.

2.2.5.3 Biochemische Charakterisierung von PIMT

Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie nutzt die unterschiedliche Absorption von zirkular polarisiertem Licht durch optisch aktive (chirale) Zentren in Proteinen (Peptidbindung), Peptiden und anderen Molekülen aus. Der Unterschied in der Absorption von links- und rechtspolarisiertem Licht wird als Elliptizität wiedergegeben. Bestimmt man die Elliptizität eines Moleküls bei verschiedenen Wellenlängen erhält man ein CD-Spektrum. Im Bereich von 160 – 250 nm (Fern-UV) können mit Hilfe der CD-Spektroskopie die Sekundärstrukturen von Proteinen bestimmt werden, da hier die $n \rightarrow \pi^*$ und $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge der Peptidbindungen liegen, welche Chiralität aufweisen (Lottspeich, Engels 2006).

Die CD-Spektroskopie ist weiterhin gut geeignet um strukturelle Änderungen von z.B. Proteinen bei Temperaturänderungen zu detektieren. Um Änderungen der PIMT-Aktivität bei verschiedenen Temperaturen besser einordnen zu können, wurde die thermische Stabilität der PIMT mittels UV-CD-Spektroskopie bestimmt. Die Aufnahme der Fern-UV-CD-Spektren erfolgte an einem J-710-CD-Spektrometer (Jasco Inc., USA). Dabei konnten die strukturellen Veränderungen der PIMT über einen Temperaturbereich von 20 - 80 °C verfolgt werden. Die Aufzeichnung vollständiger CD-Spektren erfolgte alle 10 °C. Alle 2 °C wurde die Elliptizität bei 221 nm akkumuliert gemessen, da hier die größten Veränderungen in der Elliptizität auftraten. Für die Messungen wurden 0.1 mg/ml PIMT (human und murin) in Wasser gelöst.

Isothermale Titrationskalorimetrie (isothermal titration calorimetry, ITC)

Mit Hilfe der ITC kann eine genaue Charakterisierung der Interaktion zweier Bindungspartner in Lösung realisiert werden. Das Prinzip der ITC ist die Messung der entstehenden Bindungswärme. Hierfür haben ITC-Geräte zwei isolierte Zellen. Eine Referenzzelle und eine Probenzelle. Beide Zellen haben die gleiche Temperatur (isotherm). Diese wird in beiden

Material & Methoden

Zellen durch eine elektrische Heizung konstant gehalten. Kommt es nun nach Zugabe von einem Bindungspartner zum zweiten Bindungspartner in der Zelle zu einer Wärmeentwicklung, muss die Probenzelle weniger beheizt werden. Die Differenz im Bedarf an elektrischer Energie kann dann der entstandenen Wärmemenge gleichgesetzt werden. Umgekehrt wird bei endothermen Reaktionen mehr elektrische Energie benötigt (Rehm 2006).

Mit Hilfe der ITC sollten die K_D -Werte und weitere Parameter der Interaktion von PIMT mit SAM und SAH bestimmt werden. Diese sollten anschließend mit kinetisch bestimmten K_M - bzw. IC_{50} -Werten korreliert werden.

Die ITC-Messungen wurden an einer VP-ITC von Microcal durchgeführt. Zuvor wurden 3 ml einer 30 μ M His₆-*rh*PIMT-Lösung gegen 150 mM NaCl, 25 mM Na₂HPO₄, 25 mM KH₂PO₄ und 1 mM EDTA, pH 7.4 über Nacht bei 4 - 8 °C dialysiert. SAM und SAH wurden im Dialysepuffer gelöst und entsprechend auf 300 μ M und 200 μ M eingestellt. PIMT wurde entsprechend auf 30 μ M (für Messung mit SAM) oder 20 μ M (für Messung mit SAH) eingestellt, abhängig vom titrierten Cofaktor. Die Versuche wurden bei 20 °C und mit einer Rotationsgeschwindigkeit der Injektionsspritze von 290 rpm nach einer Anfangspause von 600 s durchgeführt. Nach der ersten Injektion von 2 μ l (Abfall) wurden 14 weitere Injektionen mit einem Volumen von 21 μ l und einer Dauer von 9.5 s durchgeführt, zwischen den einzelnen Injektionen wurde 5 min Abstand gelassen. Die Referenzleistung wurde auf 10 oder 2 μ cal/s, abhängig von der PIMT-Konzentration in der Zelle mit dem *feedback mode* auf „hoch“ eingestellt. Nach Integration der Signale durch die Gerätesoftware wurde die Punkteverteilung nach einer Gleichung für ein *one-site*-Modell angepasst. Alternative Bindemodelle, die ebenfalls berücksichtigt wurden, ergaben keine sinnvollen Ergebnisse.

Ergebnisse

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur Isoaspartat-Bildung

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, konnte in A β -Ablagerungen von Alzheimer-Patienten isoAsp detektiert werden. Nach weiteren Untersuchungen in den Laboratorien von Probiobdrug konnte beobachtet werden, dass isoAsp anstelle von Asp im APP zu einer alternativen Prozessierung des APP durch Cathepsin B führt. Zu Beginn der Studie stellte sich daher die Frage, ob am freien N-Terminus von Peptiden und Proteinen, im Besonderen von A β , isoAsp entstehen kann oder ob das beobachtete isoAsp am N-Terminus von A β bereits vor der APP-Prozessierung innerhalb der Peptidkette entstanden ist. Aus diesem Grund wurde im ersten Schritt NGEF bei 37 °C und pH 9 inkubiert, da hier die Bedingungen für eine isoAsp-Bildung laut Literatur am günstigsten sind. Um zu zeigen, dass isoAsp entsteht, musste zunächst eine geeignete Methode etabliert werden, mit welcher Substrat (Asn oder Asp) und Produkt (isoAsp) isoliert und analysiert werden können. Aspartat und Isoaspartat haben sehr ähnliche physikalische und chemische Eigenschaften. Aus diesem Grund ist es schwer, entstehendes isoAsp in einem Peptid zu identifizieren. Nachdem keine geeignete Methode zur Trennung/Detektion der drei Tetrapeptide NGEF, DGEF und D_{iso}GEF mittels HPLC und MS (Daten nicht gezeigt) entwickelt werden konnte, wurde die kapillarelektrophoretische Trennung mit UV-Detektion als geeignete Methode etabliert. Dabei wurde der Unterschied in der Nettoladung der Peptide bei saurem pH-Wert ausgenutzt. Dies ist durch die unterschiedlichen pK_a-Werte der Carboxylgruppen (z.B.: Asp: pK_{a, α-COOH} = 1.99, pK_{a, β-COOH} = 3.90; Asn: pK_{a, α-COOH} = 2.10) (Wagenknecht, Knapp 2009) bedingt. Später konnte auch mittels ¹H-NMR die Entstehung von D_{iso}GEF eindeutig nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf wurden alle Modellpeptide in einem 3-Komponenten-Puffer (25 mM Tris, 12.5 mM Essigsäure, 12.5 mM Mes) in einem pH-Bereich von 3 bis 9 und 37 °C in einem Zeitraum von wenigen Stunden bis mehreren Monaten inkubiert und mittels Kapillarelektrophorese hinsichtlich der isoAsp-Bildung analysiert. In Abb. 15 ist die Grundlinientrennung von internem Standard HY, den Substraten NGEF und DGEF sowie dem Produkt D_{iso}GEF abgebildet, welche Voraussetzung für eine weitere Analyse der N-terminalen Isomerisierung war. Die Etablierung dieser Methode erlaubte nun eine detailliertere Analyse der N-terminalen Isomerisierung. Um die Bildung von isoAsp quantifizieren zu können, wurden Standardgeraden für die Substrat- und Produktpeptide erstellt, welche in Abb. 16

Ergebnisse

dargestellt sind. In Abb. 16 wird eine lineare Abhängigkeit der Integrale von NGEF, DGEF, $D_{(OMe)}GEF$ und $D_{iso}GEF$ zum Integral des internen Standardpeptides HY deutlich.

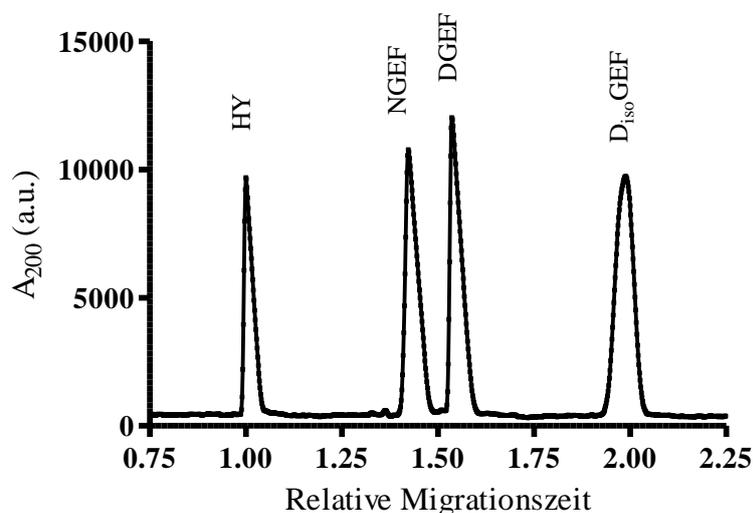


Abb. 15: Trennung von NGEF, DGEF, $D_{iso}GEF$ und HY mittels CE-UV. Die Messungen wurden bei 20 °C in 50 mM Citrat/NaOH pH 2.0 mit 20 kV und 0.2 psi an einem P/ACETTM MDQ Glycoprotein System von Beckman Coulter durchgeführt. Die verwendete Kapillare hatte eine Länge von 30 cm und einen inneren Durchmesser von 50 μ m. Die Peptide HY, NGEF, DGEF und $D_{iso}GEF$ konnten innerhalb von 10 min elektrophoretisch getrennt werden. Die Migrationszeiten wurden auf die Migrationszeit des Standardpeptides, HY, normiert.

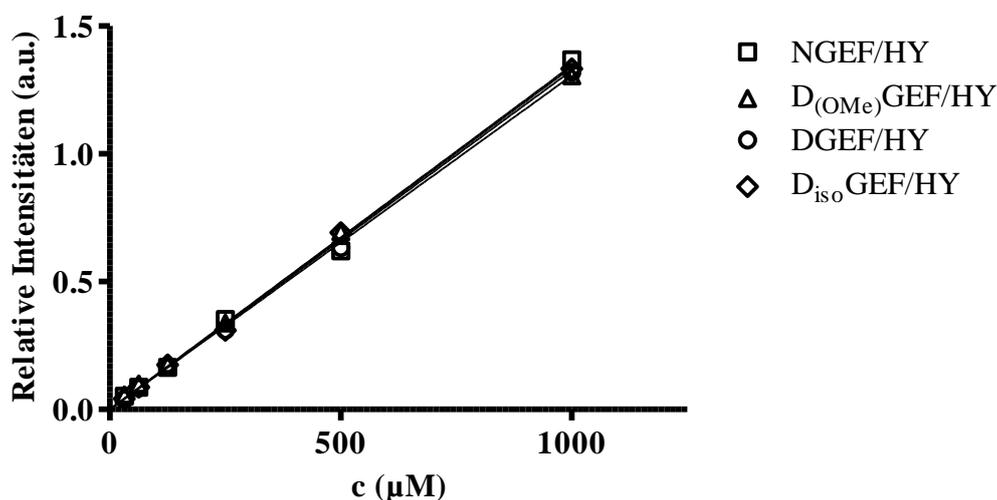


Abb. 16: Standardgeraden für die Kapillarelektrophorese. Für die Standardgeraden wurde 1 mM HY mit absteigenden Konzentrationen Modellpeptid gemischt und per CE-UV aufgetrennt und detektiert. Die Konzentrationen an Modellpeptid wurden gegen die HY-normierten Intensitäten der Modellpeptide aufgetragen. Dabei kam es zu einer fast perfekten Deckung der vier Standardgeraden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die vier verschiedenen Peptidspezies gleiche Absorptionseigenschaften haben.

Ergebnisse

Weiterhin wird durch Abb. 16 deutlich, dass die vier Peptide sehr ähnliche Absorptionseigenschaften haben, somit lassen sich die Integrale aus der Kapillarelektrophorese direkt miteinander vergleichen. In Abb.17 ist exemplarisch der Verlauf des NGEF-Zerfalls dargestellt. Dabei zerfällt das NGEF in einem Verhältnis von 90 % D_{iso} GEF und 10 % DGEF, was den Angaben in der Fachliteratur entspricht (Meinwald et al. 1986).

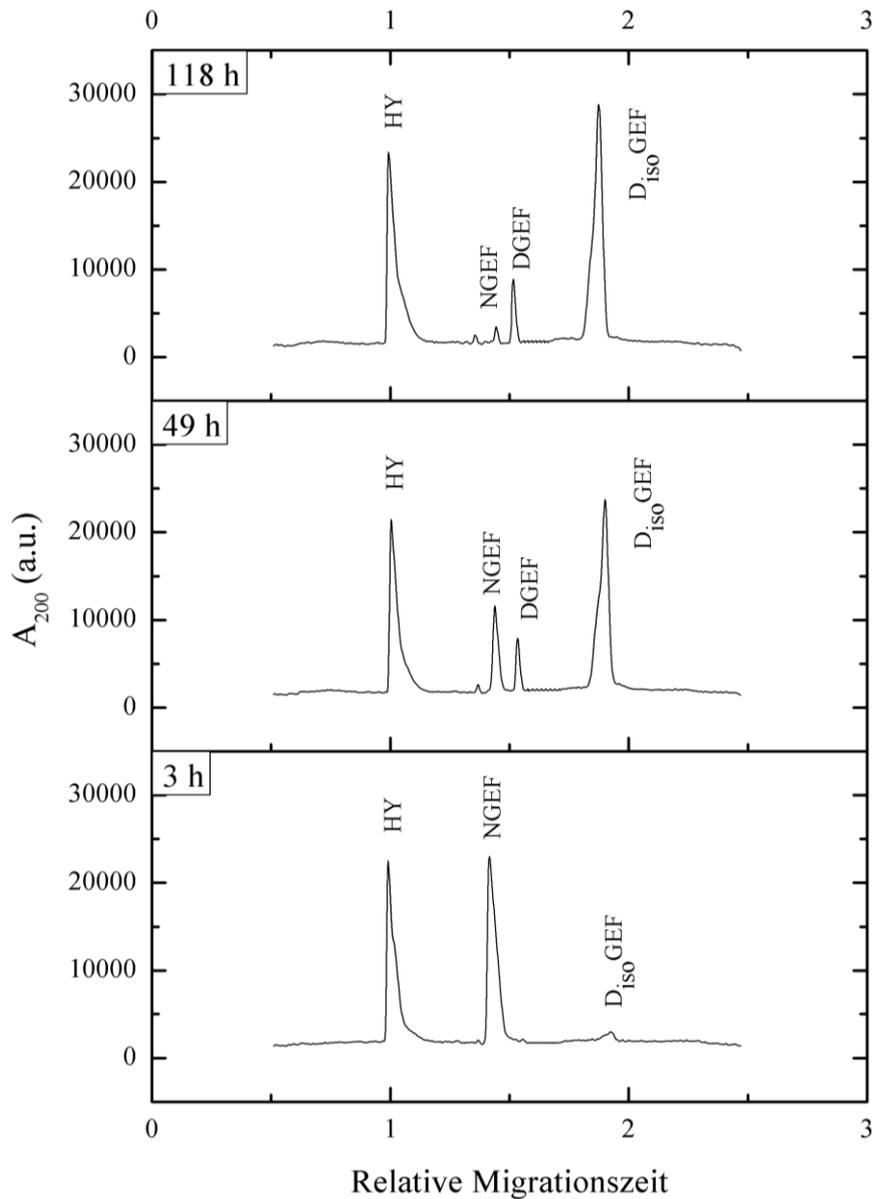


Abb. 17: Zeitlicher Verlauf des NGEF-Zerfalls in D_{iso} GEF und DGEF bei 37 °C und pH 7 in 3-Komponenten-Puffer. Exemplarische Darstellung (CE-UV-Messungen) der Verteilung von Edukt und Produkt nach 3 h, 49 h und 118 h Reaktionszeit.

Ergebnisse

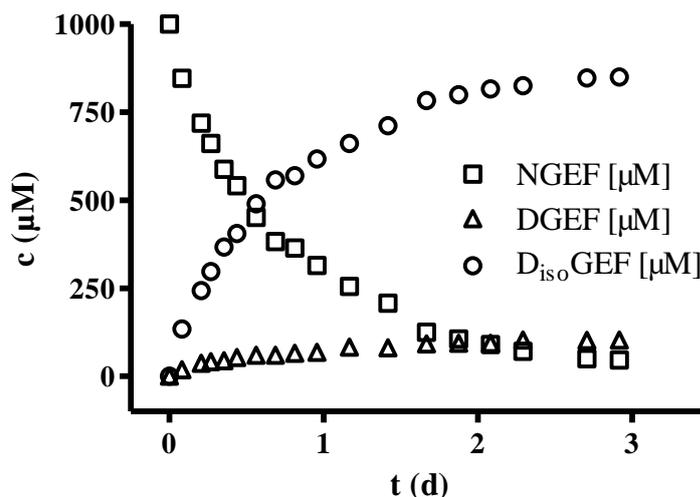


Abb. 18: Zeitlicher Verlauf der Umwandlung von NGEF in DGEF und D_{iso} GEF in Abhängigkeit von der Reaktionszeit bei 37 °C in 3-Komponentenpuffer und pH 9.0. Die Anfangskonzentration von NGEF betrug 1 mM. Der Zerfall von NGEF wurde mittels CE-UV untersucht. Die Konzentration an NGEF ist mit schwarzen Quadraten, die Konzentration an DGEF mit schwarzen Dreiecken und die Konzentration an D_{iso} GEF mit schwarzen Kreisen dargestellt. Beim vollständigen Zerfall von NGEF entstehen sowohl DGEF als auch D_{iso} GEF in einem Verhältnis von ungefähr 1:9.

In Abb. 18 ist der Zerfall von 1 mM NGEF zu DGEF und D_{iso} GEF dargestellt. Dabei ist das NGEF bei 37 °C und pH 9 nach circa drei Tagen vollständig zerfallen. Es entstehen in etwa 90 % D_{iso} GEF und 10 % DGEF.

Zur weiteren Untermauerung der durch CE-UV ermittelten Ergebnisse wurden Proben der Standardpeptide NGEF, DGEF und D_{iso} GEF sowie Proben von NGEF nach verschiedenen Reaktionszeiten mittels $^1\text{H-NMR}$ analysiert. Zur Quantifizierung wurden die integralen Intensitäten der gut getrennten H- α -Signale von N und D_{iso} genutzt, welche auf das Integral des überlagerten H- α -Signals von E, aus NGEF und D_{iso} GEF, normalisiert wurden. Abb. 19 veranschaulicht die vollständige Trennung der verschiedenen H- α -Signale, dabei kann das H- α -Signal von N bei einer chemischen Verschiebung von 4.23 ppm, das H- α -Signal von D_{iso} bei einer chemischen Verschiebung von 4.05 ppm und das H- α -Signal von E bei einer chemischen Verschiebung von 4.16 ppm beobachtet werden. In Tab. 2 sind die ermittelten Konzentrationen an isoAsp-Produkt nach Inkubation von 1 mg/ml NGEF bei 37 °C und pH 7 nach der benutzten Methode (CE-UV oder $^1\text{H-NMR}$) gegenübergestellt.

Auf Basis dieser zusätzlichen Ergebnisse wurden weitere Untersuchungen zur spontanen isoAsp-Bildung mit Hilfe der CE-UV durchgeführt. Die Charakterisierung erfolgte für

Ergebnisse

Aspartyl- und Asparaginyreste am N-Terminus und innerhalb der Peptidkette von verschiedenen Modellpeptiden.

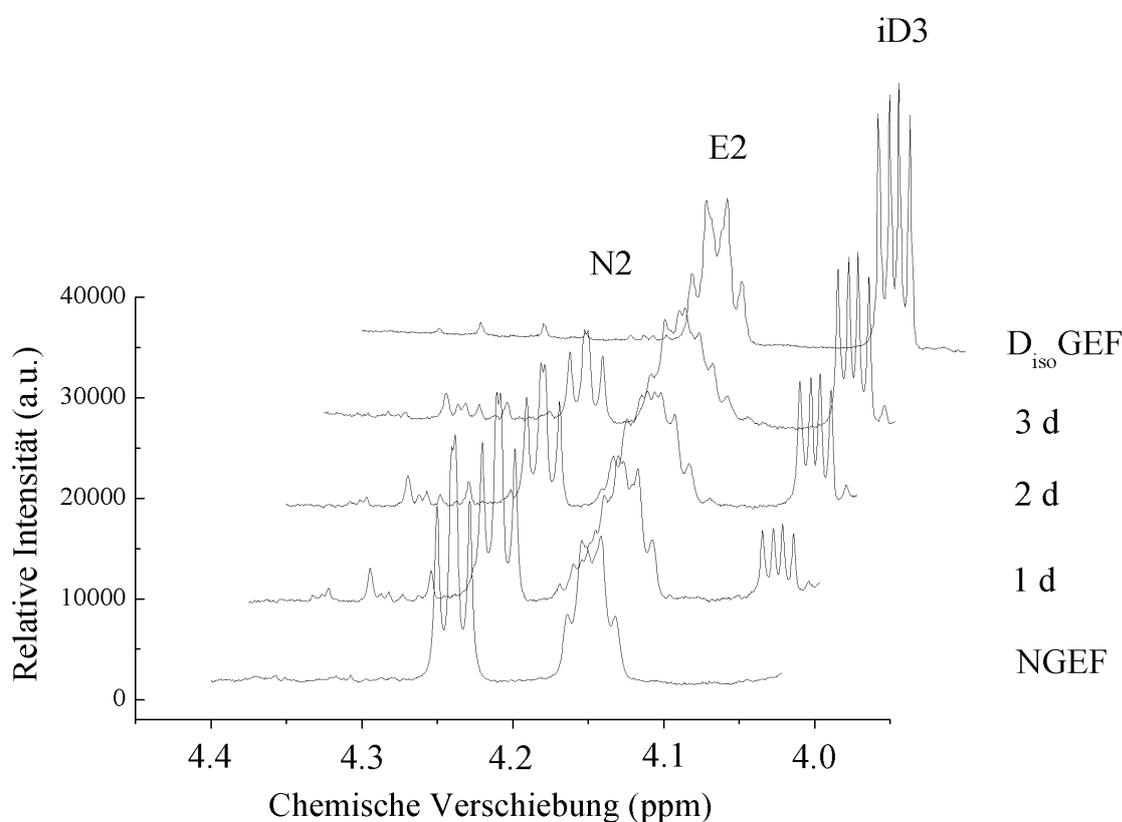


Abb. 19: Nachweis der Entstehung von D₁₈₀GEF aus NGEF mit Hilfe von ¹H-NMR. Das H- α -Signal von N ist dabei durch eine chemische Verschiebung von 4.23 ppm (N2), das H- α -Signal von D₁₈₀ durch eine chemische Verschiebung von 4.05 ppm (iD3) und das H- α -Signal von E durch eine chemische Verschiebung von 4.16 ppm (E2) gekennzeichnet. Da das H- α -Signal von E bei allen drei Peptidspezies (NGEF, DGEF und D₁₈₀GEF) vorhanden ist, kann auf dieses Signal normalisiert werden.

Tab. 2: Quantitative Analyse der isoAsp-Bildung mittels CE-UV und ¹H-NMR. Gezeigt ist der prozentuale Anteil an gebildetem isoAsp aus 1 mg/ml NGEF nach 24 h, 48 h und 72 h bei 37 °C und pH 7. Die Quantifizierung basierte auf CE-UV bzw. ¹H-NMR. Die Daten zeigen eine nahezu perfekte Übereinstimmung. Somit konnte die Methode der CE-UV zur Quantifizierung von isoAsp als validiert angesehen werden.

Inkubationszeit (d)	¹ H-NMR [D ₁₈₀ GEF] (%)	CE-UV [D ₁₈₀ GEF] (%)
1	15	18
2	24	26
3	37	40

Ergebnisse

Der Vergleich der Quantifizierung von isoAsp, basierend auf $^1\text{H-NMR}$ bzw. CE-UV, ist in Tab. 2 gegenübergestellt. Die Werte sind nahezu identisch, so dass weitere Quantifizierungen ausschließlich mit der leichter durchzuführenden CE-UV angefertigt wurden. In Abb. 20 und Abb. 21 ist die Abhängigkeit des Zerfalls von NGEF und DGEF und somit die Generierung von isoAsp-Peptiden vom pH-Wert in linearisierter Form dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Geschwindigkeit des Zerfalls von NGEF mit steigendem pH-Wert zunimmt. Dies lässt sich auch quantitativ verdeutlichen. Für diese Reaktion 1. Ordnung ergibt sich nach der Gleichung: $t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$ eine Halbwertszeit von 277 Tagen bei pH 3 und eine Halbwertszeit von ca. 1 Tag bei pH 7. Im Gegensatz dazu wurde mit DGEF ein Minimum der Zerfallsgeschwindigkeit bei pH 6 beobachtet, hier konnte eine Halbwertszeit von 75 Tagen ermittelt werden. Der Zerfall beschleunigt sich sowohl bei saureren als auch bei basischeren pH-Werten ($t_{1/2}$ bei pH 3 = 8 Tage; $t_{1/2}$ bei pH 9 = 25 Tage).

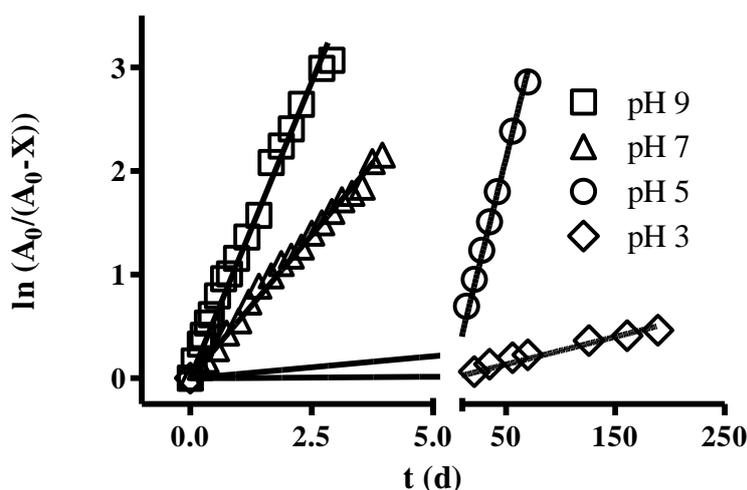


Abb. 20: Kinetische Auswertung des Zerfalls von NGEF bei verschiedener pH-Werten. Zur besseren Visualisierung der Kinetiken wurde eine linearisierte Darstellung gewählt. Exemplarisch sind die Zerfallsgeschwindigkeiten bei pH 9, 7, 5 und 3 dargestellt. A_0 ist dabei die Konzentration von NGEF zum Zeitpunkt 0 und X ist die Konzentration an entstandenen Produkten zum Zeitpunkt X.

In Tab. 3 sind die Geschwindigkeitskonstanten des Zerfalls aller untersuchten Peptide dargestellt. Wie bereits erwähnt ist zu beobachten, dass die Geschwindigkeitskonstante des Zerfalls von Asparagin-Peptiden direkt abhängig vom pH-Wert ist, im sauren pH-Bereich kommt der Zerfall fast zum Erliegen während mit zunehmendem pH-Wert die Zerfallsgeschwindigkeit sehr stark zunimmt. Bei den Aspartat-Peptiden kann man eine parabolische Abhängigkeit der Zerfallsgeschwindigkeit mit seinem Minimum im pH-Bereich

Ergebnisse

zwischen 5 und 7 beobachten. Unter neutralen pH-Bedingungen ist eine 60fach höhere Zerfallsgeschwindigkeit für NGEF als für DGEF zu bestimmen. Dieses Verhältnis ist für das Peptidpaar NAEF und DAEF dreifach geringer, was einen starken Einfluss der zweiten Aminosäure auf die Geschwindigkeit der Isomerisierung bestätigt, dies konnte bereits durch andere Gruppen gezeigt werden (siehe Einleitung). Bei pH 3 zerfällt DGEF jedoch schneller als NGEF bzw. DAEF schneller als NAEF.

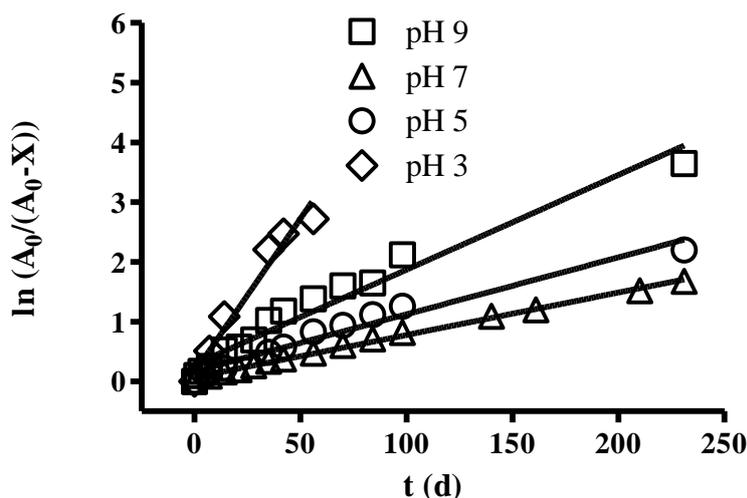


Abb. 21: Kinetische Auswertung des Zerfalls von DGEF bei verschiedener pH-Werten. Zur besseren Visualisierung der Kinetiken wurde eine linearisierte Darstellung gewählt. Exemplarisch sind die Zerfallsgeschwindigkeiten bei pH 9, 7, 5 und 3 dargestellt. A_0 ist dabei die Konzentration von NGEF zum Zeitpunkt 0 und X ist die Konzentration an entstandenen Produkten zum Zeitpunkt X.

Um den Einfluss der freien α -Aminogruppe von NGEF auf die Zerfallsgeschwindigkeit zu untersuchen, wurde das N-terminal acetylierte Peptid $(Ac)NGEF$ unter verschiedenen pH-Bedingungen, bei 37 °C inkubiert. Die pH-Abhängigkeit ähnelt der von NGEF, jedoch ist die Geschwindigkeit der Isomerisierung bei pH 7 circa achtfach langsamer. Damit entspricht es der Zerfallsrate von AANGEF. AANGEF hat sowohl qualitativ als auch quantitativ die gleiche pH-Abhängigkeit wie $(Ac)NGEF$. Daraus kann man schließen, dass Peptide mit freiem N-terminalen Asp oder Asn bei gleichbleibender pH-Abhängigkeit schneller isomerisieren. Des Weiteren wurde der Zerfall von dem Peptid $D_{(OMe)}GEF$ verfolgt, um die Bedeutung der β -Carboxylgruppe für die Bildung von $D_{iso}GEF$ zu untersuchen. Dieses Peptid weist eine aktivierte Seitenkette auf, da der Säureester leicht hydrolysiert. Die Methylierung der Seitenkette von D in DGEF bedingt eine Beschleunigung der Isomerisierung um den Faktor 14 bzw. 740 im Vergleich zu NGEF bzw. DGEF bei pH 7. Bei pH 9 wurde sogar eine

Ergebnisse

Beschleunigung um den Faktor 3000 im Vergleich zu DGEF beobachtet. Um heraus zu finden, ob während der N-terminalen Isomerisierung ein Protonentransfer geschwindigkeitsbestimmend ist, wurden NGEF und D_(OMe)GEF in Deuteriumoxid untersucht (Abb. 22). Die Geschwindigkeit der Isomerisierung von NGEF und D_(OMe)GEF ist dabei in D₂O signifikant geringer. Die quantitative Analyse der Isomerisierung ergab einen kinetischen Isotopieeffekt (KIE) von 2.46 für NGEF und 2.42 für D_(OMe)GEF. Das lässt die Vermutung zu, dass zu mindestens ein Proton an der Isomerisierungsreaktion beteiligt ist.

Tab. 3: Darstellung der Zerfallsgeschwindigkeiten verschiedener A β -ähnlicher Peptide bei 37 °C und verschiedenen pH-Werten in 3-Komponentenpuffer (25 mM Tris, 12.5 mM Essigsäure, 12.5 mM Mes, 0.02 % NaN₃). Die Sequenzen sind vom N-Terminus des A β -Peptides (DAEF...) abgeleitet. Die Zerfallsgeschwindigkeiten für AADGEF konnten bei pH 8, 6 und 5 aufgrund von mangelnden Messdaten nicht bestimmt werden (n.b. = nicht bestimmt).

pH	NGEF [k (d ⁻¹)]	DGEF [k (d ⁻¹)]	NAEF [k (d ⁻¹)]	DAEF [k (d ⁻¹)]	D _(OMe) GEF [k (d ⁻¹)]	^(Ac) NGEF [k (d ⁻¹)]	AANGEF [k (d ⁻¹)]	AADGEF [k (d ⁻¹)]
9	1.21 ± 0.04	0.028 ± 0.003	0.045 ± 0.001	0.0145 ± 0.0004	83.42 ± 2.07	0.493 ± 0.015	0.484 ± 0.014	0.0173 ± 0.0005
8	0.937 ± 0.017	0.025 ± 0.003	0.0411 ± 0.0004	0.0127 ± 0.0002	13.13 ± 0.18	0.268 ± 0.019	0.293 ± 0.01	n.b.
7	0.568 ± 0.009	0.0097 ± 0.0004	0.0291 ± 0.0007	0.0088 ± 0.0004	7.135 ± 0.094	0.0746 ± 0.0030	0.0873 ± 0.0054	0.015 ± 0.001
6	0.227 ± 0.007	0.0092 ± 0.0001	0.0177 ± 0.0003	0.00111 ± 0.00004	4.434 ± 0.056	0.0194 ± 0.0006	0.0305 ± 0.0012	n.b.
5	0.044 ± 0.001	0.0158 ± 0.0007	0.0060 ± 0.0002	0.00156 ± 0.00002	1.28 ± 0.04	0.0032 ± 0.0007	0.0064 ± 0.0004	n.b.
4	0.0099 ± 0.0003	0.042 ± 0.001	0.0036 ± 0.0001	0.0034 ± 0.0001	0.328 ± 0.013	0.00173 ± 0.00007	0.00230 ± 0.00007	0.012 ± 0.001
3	0.0025 ± 0.0001	0.083 ± 0.005	0.0022 ± 0.0001	0.0097 ± 0.0004	0.082 ± 0.002	0.00074 ± 0.00004	0.00102 ± 0.00005	0.017± 0.002

Ergebnisse

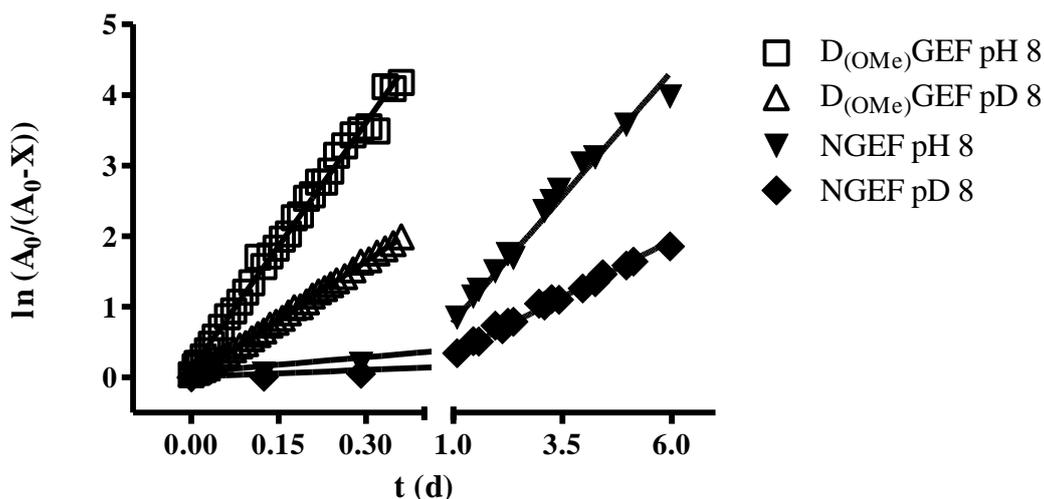


Abb. 22: Kinetische Auswertung des Zerfalls von NGEF und $D_{(\text{OMe})}\text{GEF}$ bei pH 8 (H_2O) und pD 8 (D_2O). Zur besseren Visualisierung der Kinetiken wurde eine linearisierte Darstellung gewählt. A_0 ist dabei die Konzentration von NGEF oder $D_{(\text{OMe})}\text{GEF}$ zum Zeitpunkt 0 und X ist die Konzentration an entstandenen Produkten zum Zeitpunkt X . Die quantitative Analyse der Isomerisierung ergab einen kinetischen Isotopieeffekt von 2.46 für NGEF und 2.42 für $D_{(\text{OMe})}\text{GEF}$.

In einem weiteren Versuch wurde die Abhängigkeit der Isomerisierung von pD-Wert untersucht (Tab. 4). Die Ergebnisse bestätigen die Resultate, welche in H_2O erhalten wurden, langsamere Isomerisierung bei sinkenden pD-Werten. Des Weiteren kann ein stärkerer Abfall der Isomerisierungsgeschwindigkeit im saureren pD-Bereich beobachtet werden. Dies wird durch den ansteigenden kinetischen Isotopieeffekt verdeutlicht.

Tab. 4: Darstellung der Zerfallsgeschwindigkeit von $D_{(\text{OMe})}\text{GEF}$ in D_2O und der daraus resultierende kinetische Isotopieeffekt (KIE) bei bekannten Geschwindigkeitskonstanten in H_2O -Puffer (siehe Tabelle 3). Wie bereits im H_2O -Puffer beobachtet, verringert sich auch die Geschwindigkeit des Zerfalls von $D_{(\text{OMe})}\text{GEF}$ mit sinkenden pD-Werten.

pD/pH-Wert	$D_{(\text{OMe})}\text{GEF}$ [$k_{\text{D}_2\text{O}}$ (d^{-1})]	KIE [$k_{\text{H}_2\text{O}}/k_{\text{D}_2\text{O}}$]
8	5.42 ± 0.04	2.4 ± 0.1
7	2.79 ± 0.03	2.6 ± 0.1
5	0.38 ± 0.01	3.36 ± 0.03
3	0.0218 ± 0.0004	3.75 ± 0.02

Ergebnisse

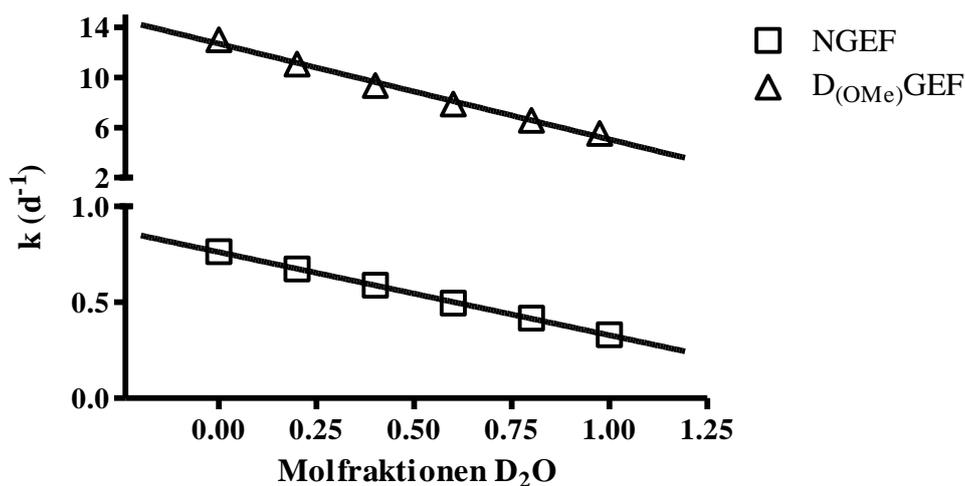


Abb. 23: *Proton inventory* von NGEF und $\text{D}_{(\text{OMe})}\text{GEF}$. 1 mM beider Peptide wurde in verschiedenen Mischungen von H_2O und D_2O bei 37 °C in 3-Komponenten-Puffer (25 mM Tris, 12.5 mM Essigsäure, 12.5 mM Mes, pH/pD 8.0) inkubiert und die Isomerisierungsreaktion mittels CE-UV analysiert. Die erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten wurden gegen die Molfraktionen an D_2O aufgetragen. Die erhaltenen Graphen konnten sehr gut nach einem Modell für eine Ein-Proton-Transfer-Reaktion angepasst werden.

Zur weiteren Analyse des kinetischen Isotopieeffektes wurden NGEF und $\text{D}_{(\text{OMe})}\text{GEF}$ in verschiedenen Mischungen von D_2O und H_2O untersucht. Die resultierenden Geschwindigkeitskonstanten der Isomerisierungsreaktion wurden den eingesetzten Molfraktionen an D_2O gegenübergestellt (Abb. 23). Das *proton inventory* wurde nach verschiedenen Modellen angepasst, wobei sich das Modell für den Transfer eines Protons als am besten geeignet herausstellte.

Ergebnisse

3.2 Präparation von *rhPIMT*

Die Präparation von *rhPIMT* erfolgte analog zur Präparation der humanen PIMT aus *Escherichia coli* von Smith und Kollegen aus dem Jahr 2002 (Smith et al. 2002). Hierfür wurden *Escherichia coli* (Stamm BL21 (DE)) mit dem Expressionsvektor pQE31, der die cDNA der humanen PIMT (Isoform 1) enthielt, transformiert. Der transformierte Stamm wurde in einer 6-Liter-Kultur angezogen. Nach der Zellernte wurde eine Feuchtmasse von 26 g erhalten. Sowohl der Aufschluss als auch die Ammoniumsulfat-Fällung wurden analog zu Smith *et al.* durchgeführt. Entgegen den Erwartungen erfolgte keine Bindung des Zielproteins an einem starken Anionenaustauscher (Q-Sepharose) bei pH 7.2. Das Protein befand sich im Durchlauf (Abb. 24 und 25) und nach Konzentration konnten 97 mg rekombinate humane PIMT mit einer Reinheit von ca. 95 % (Abb. 25, Bahn 7 und 8) erhalten werden. Da die Reinigung nicht reproduzierbar war, wurde ein PIMT-Konstrukt mit sechs His-Resten generiert und die weitere Reinigung erfolgte mittels Metall-Affinitätschromatographie. Die Konzentration des gewonnen Proteins wurde mit dem NanoDrop2000-Gerät von Fisher Scientific überprüft. Da das Verhältnis von 280 nm zu 260 nm > 1 ist, ist die Proteinlösung relativ frei von Nukleinsäuren (Abb. 26).

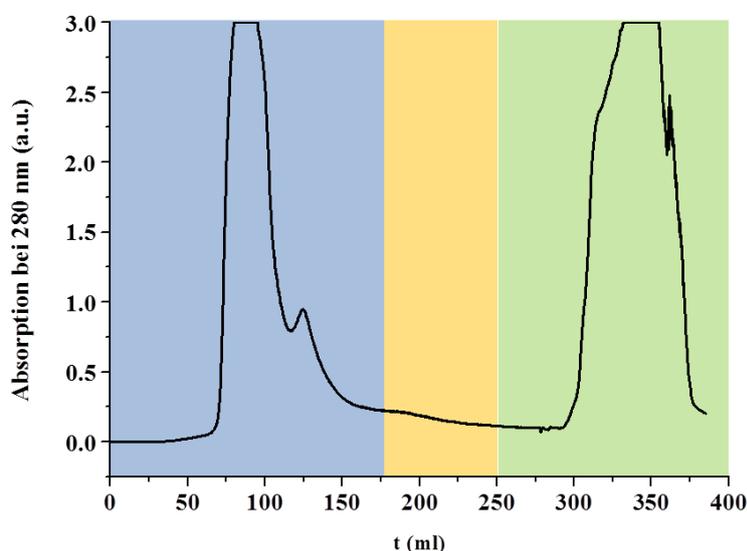


Abb. 24: Präparation von *rhPIMT* mittels Anionenaustauschchromatographie an einer Q-Sepharose FF-Säule (V = 54 ml). Die Präparation wurde bei 280 nm optisch verfolgt. Blau = Beladen der Säule mit dem Proteinextrakt; Orange = Waschen mit 10 mM BisTris/HCl pH 7.2, 1.5 mM MgCl₂, 2 mM DTT; Grün = Elution mit steigender Salzkonzentration (→ 0.3 M NaCl).

Ergebnisse

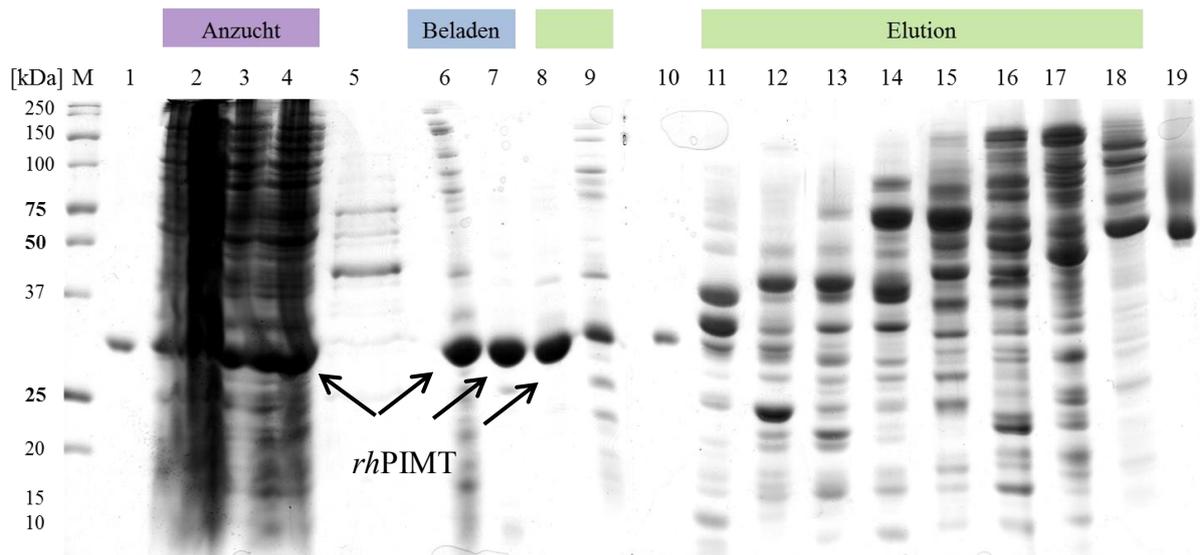


Abb. 25: Präparation von *rhPIMT*, dokumentiert mittels SDS-PAGE (15 %iges Gel). Die Abbildung stellt sowohl die Expression in *Escherichia coli* und die Ergebnisse der Ammoniumsulfat-Fällung als auch den Verlauf der Isolation mittels Anionenaustauschchromatographie dar. Legende: M = Proteinstandard von Fermentas, 1 = alte *rhPIMT*-Präparation (zusätzlicher *marker*), 2 = Pellet nach Aufschluss, 3 = Überstand nach Aufschluss, 4 = Sediment nach Ammoniumsulfat-Fällung, 5 = Überstand nach Ammoniumsulfat-Fällung, 6 = Durchlauf 1, 7 = Durchlauf 2, 8 = Fraktion 5, 9 = Fraktion 10, 10 = alte *rhPIMT*-Präparation (zusätzlicher *marker*), 11 = Fraktion 15, 12 = Fraktion 18, 13 = Fraktion 20, 14 = Fraktion 24, 15 = Fraktion 28, 16 = Fraktion 32, 17 = Fraktion 35, 18 = Nachlauf, 19 = *rhQC* (zusätzlicher *marker*)

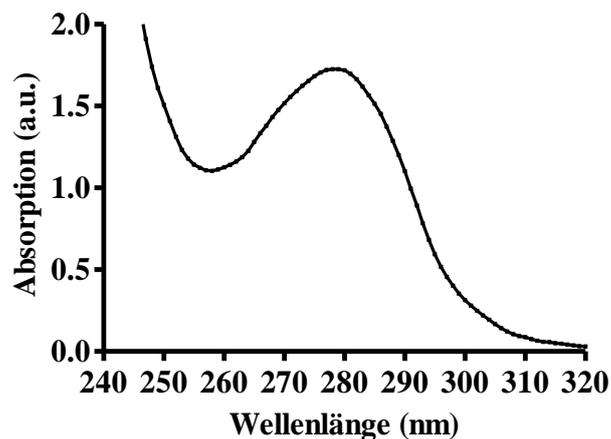


Abb. 26: UV-Spektrum von gereinigter *rhPIMT*. Isoliert wurde die Isoform 1 der humanen Protein-L-isoaspartyl-*O*-methyltransferase aus *E.coli*. Das Spektrum wurde mit Hilfe eines NanoDrop 2000-Gerätes von Fisher Scientific aufgenommen. Die Probe enthielt ca. 1.6 mg/ml humane PIMT.

Um die Konzentration der gewonnenen humanen PIMT bestimmen zu können, wurde mit Hilfe des Programms „ProtParam“ (<http://web.expasy.org/protparam/>) ein

Ergebnisse

Extinktionskoeffizient von $27055 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ in H_2O bei 280 nm errechnet. Nach dem Lambert-Beer'schen-Gesetz ist $E = \varepsilon * d * c$, somit entspricht eine Konzentration von 1 mg/ml einer Absorption von 1.098 bei 280 nm. Ergänzend wurden die Proteinkonzentrationen auch nach Bradford (Bradford 1976) bestimmt. Hierbei wurden nahezu identische Werte ermittelt, was für eine saubere Proteinpräparation spricht. Zum Zeitpunkt der Präparation der *rhPIMT* war der hauseigene Aktivitätsassay noch nicht verfügbar, so dass hier keine Reinigungstabelle erstellt wurde.

3.3 Präparation von *rmPIMT*

Die Anzucht und die Expression der *rmPIMT* wurden wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. *Escherichia coli* wurde mit dem Vektor pET28, der die cDNA vom Isoenzym 1 der murinen PIMT enthielt, transformiert. Aus 6 l Medium konnten 27.85 g feuchte Zellmasse gewonnen werden. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mittels Frost-Tau-Lyse. Wie im SDS-PAGE-Gel zu sehen ist (Abb. 28), wurden während der Expression des Zielproteins vermutlich *inclusion bodies* gebildet bzw. war der Aufschluss nicht ganz vollständig, da in Bahn 5 (unlösliche Fraktion nach Zellaufschluss) eine starke Bande bei einer Größe von circa 28 kDa zu beobachten ist, welche mit der Größe des Zielproteins übereinstimmt. Mittels „ProtParam“ wurde sowohl das Molekulargewicht (28.047 kDa) als auch der theoretische isoelektrische Punkt (pI, 8.54) der His₆-*rmPIMT* bestimmt. Wie das Elutionsprofil der EBA-IMAC (Abb. 27) und die dazugehörige SDS-PAGE-Gel-Analyse (Abb. 28) zeigen, werden große Mengen Fremdprotein durch die Methode der Metall-Affinitätschromatographie vom Zielprotein abgetrennt. Zwar werden auch Teile des Zielproteins durch den Waschschrift mit 300 mM NaCl und 50 mM Imidazol eluiert, dennoch verbleibt der weitaus größte Anteil Zielprotein auf der Säule. Nach der Elution mit 100 mM und 200 mM Imidazol wurden wieder nahezu bandenreine Proteinlösungen erhalten. Fraktionen 8 und 9 (Abb. 28) enthielten 445 mg rekombinante murine PIMT.

Ergebnisse

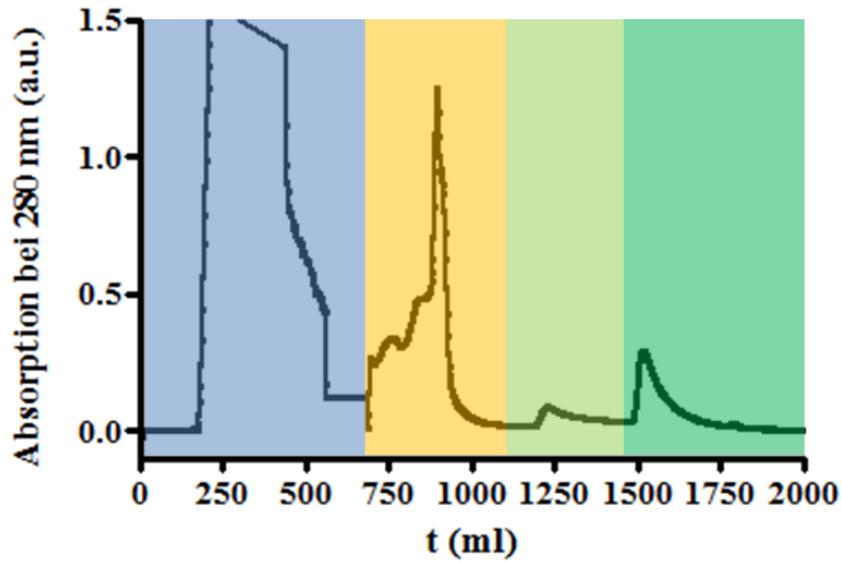


Abb. 27: Dokumentation der Reinigung von His₆-*rmPIMT* mittels IMAC. Die Reinigung wurde bei 280 nm verfolgt. Legende: Blau = Beladen der Säule (V = 130 ml) mit dem Proteinrohextrakt; Orange = Waschen mit 50 mM Imidazol, 100 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 7.6; Hellgrün = Elution mit 100 mM Imidazol, 100 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 7.6; Dunkelgrün = Elution mit 200 mM Imidazol, 100 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 7.6.

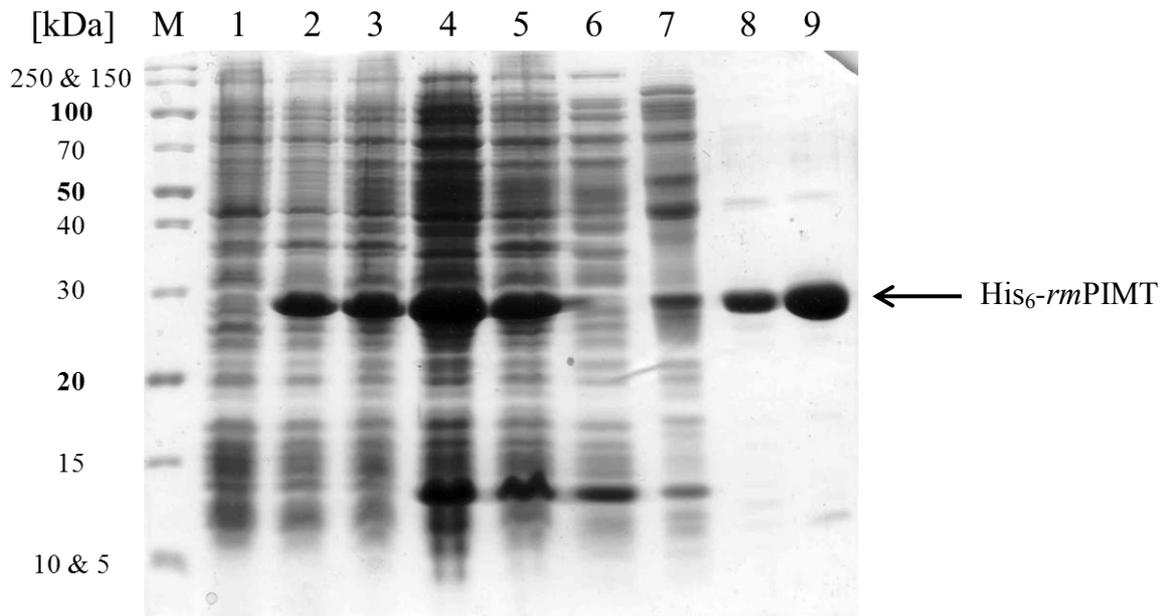


Abb. 28: Isolation von His₆-*rmPIMT* anhand einer SDS-PAGE-Analyse dokumentiert. 15 %iges SDS-Gel der Reinigung von His₆-*rmPIMT*: Legende: M = Proteinstandard von Fermentas, 1 = nicht-induzierte Zellen, 2 = 2h nach Induktion, 3 = 18 h nach Induktion, 4 = Überstand nach Zellaufschluss, 5 = Sediment nach Zellaufschluss, 6 = Durchlauf der EBA-IMAC, 7 = Waschfraktion EBA-IMAC, 8 = Eluat mit 100 mM Imidazol, 9 = Eluat mit 200 mM Imidazol.-

Ergebnisse

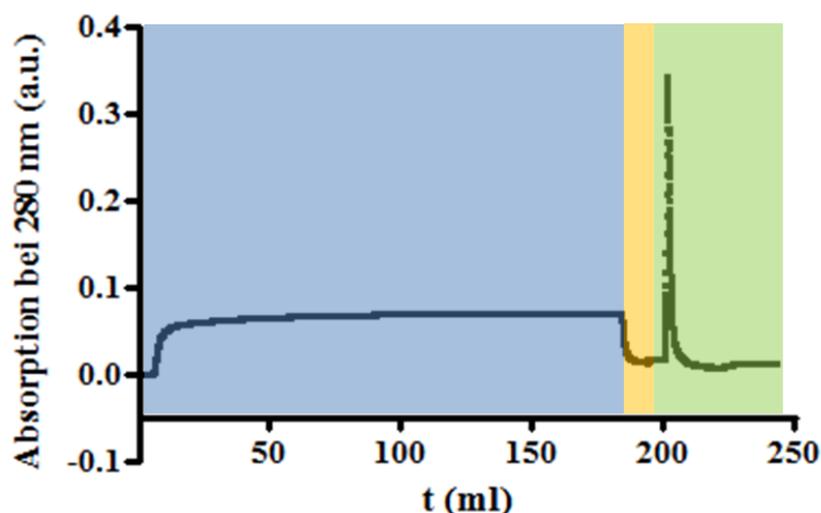


Abb. 29: Elutionsprofil der Reinigung von *rmPIMT* mittels Anionenaustauschchromatographie. Die IEC-Säule wurde mit 40 mM Tris pH 8.3 equilibriert. Die dialysierte Proteinlösung wurde auf die Säule gegeben (Blau). Nachlauf mit Equilibrierungspuffer (Gelb) und Elution/Reinigung der UnoQ (Grün).

Eluat 1 (Abb. 28, Bahn 8), das fast ausschließlich Zielprotein enthielt, wurde nach der Metallaffinitätschromatographie gegen 25 mM Tris pH 8.3 dialysiert und anschließend mittels Anionenaustauschchromatographie (UnoQ) weiter gereinigt. In Abb. 29 ist gezeigt, dass nach dem Auftragen der Proteinlösung (blau & gelb), Verunreinigungen abgetrennt werden konnten. Das wird durch Abb. 30 bestätigt, wie durch den Vergleich von Bahn 1 (vor der UnoQ) und Bahn 2 (nach der UnoQ) deutlich wird.

Mit dem kalkulierten Extinktionskoeffizienten (ProtParam) von $26930 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ in H_2O bei 280 nm konnte die Konzentration der Proteinlösung bestimmt werden (A_{280} von 0.96 = 1 mg/ml). Wie in Abb. 31 gut zu erkennen ist, ist der Quotient von der Absorption bei 280 nm und der Absorption bei 260 nm > 1 , das weist auf eine geringe Verunreinigung durch Nukleinsäuren hin.

Um die spezifische Aktivität der PIMT einzelner Reinigungsfraktionen zu bestimmen, wurde eine Reinigungstabelle mit dem neu entwickelten APN-gekoppelten PIMT-Aktivitätsassay (siehe 3.4.1) erstellt (Tab. 5). Die Proteinkonzentration in jeder zu analysierenden Probe wurde mittels Bradford (Bradford 1976) bestimmt. Es fällt auf, dass die Gesamtaktivität (Proteinextrakt) geringer ist als die Summe der einzelnen Fraktionsaktivitäten. Das kann auf Reste an EDTA oder andere inhibierende Substanzen, wie z.B. SAH, zurückzuführen sein. Weiterhin ist eine geringere spezifische Aktivität in der zweiten Elution (200 mM Imidazol)

Ergebnisse

im Vergleich zur ersten Elution (100 mM Imidazol) zu beobachten. Hier bedingt das Imidazol wohlmöglich eine kompetitive Inhibierung im aktiven Zentrum der PIMT.

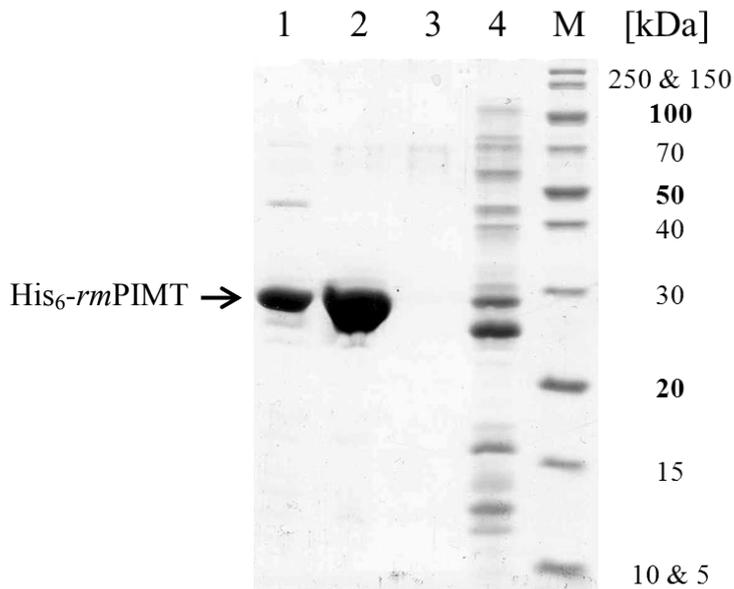


Abb. 30: Gelelektrophoretische Überprüfung der Reinigung von His₆-*rm*PIMT mittels SDS-PAGE-Analyse (15 %iges SDS-PAGE-Gel): 1 = Eluat mit 100 mM Imidazol nach Dialyse, 2 = Durchlauf der UnoQ (konzentriert), 3 = Durchlauf Konzentrator, 4 = Eluat der UnoQ (stark konzentriert), M = Proteinstandard von Fermentas, 40 µl Proteinlösung je Bahn.

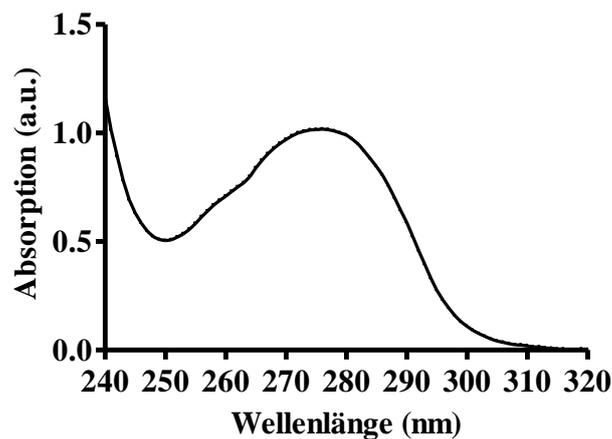


Abb. 31: Absorptionsspektrum von gereinigter His₆-*rm*PIMT in bidest. Wasser. Die Isoform 1 der murinen Protein-L-isoaspartyl-O-methyltransferase wurde in *E.coli* hergestellt. Das Spektrum wurde mit Hilfe eines NanoDrop 2000-Gerätes von Fisher Scientific aufgenommen. Die Konzentration der Probe beträgt ca. 1 mg/ml.

Ergebnisse

Nach der Reinigung der zweiten Elution über eine UnoQ-Säule ist ein Abfall in der spezifischen Aktivität zu beobachten. Möglicherweise kommt es aufgrund der längeren Reinigungsphase zu einer weiteren Denaturierung des Proteins. Bei der Dialyse gibt es bei beiden Elutionen, wie erwartet, Verluste in der Proteinmenge. Die Unterschiede in der spezifischen Aktivität sind minimal und zu vernachlässigen.

Tab. 5: Reinigungstabelle für die Reinigung von muriner PIMT.

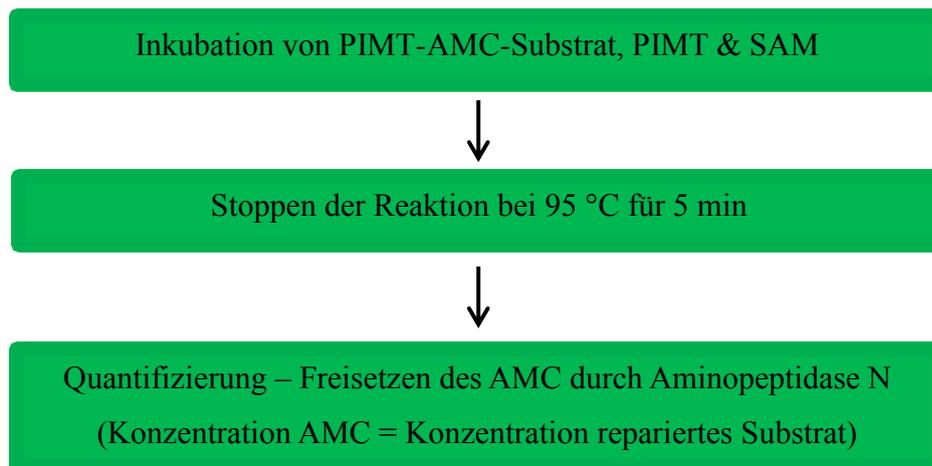
Schritt	Proteinmenge (mg)	spezifische Aktivität (mU/mg)	Ausbeute (%)	Reinigungsfaktor
Proteinextrakt	1418	0.03	100	0
Elution 1 (EBA-IMAC)	120	0.26	72	9
Elution 2 (EBA-IMAC)	325	0.12	94	4
Elution 1 (nach Dialyse)	117	0.25	69	8
Elution 2 (nach Dialyse)	212	0.13	89	4
Elution 1 (nach UnoQ)	93	0.20	45	6

3.4 PIMT-Aktivitätsassay

3.4.1 APN-gekoppelter PIMT-Aktivitätsassay

Die Aminopeptidase N (APN, EC 3.4.11.2) ist eine in der membranverankerte Metalloprotease vom Typ II. APN hydrolysiert Peptidbindungen vom N-Terminus des jeweiligen Peptids oder Proteins ausgehend und ist nicht in der Lage Isopeptidbindungen zu hydrolysieren. Diese Eigenschaft bildete die Grundlage für die Entwicklung des Aktivitätsassays für die PIMT. PIMT ist nicht bzw. kaum in der Lage N-terminales isoAsp zu reparieren, da sonst auch ein kontinuierlicher Assay realisierbar gewesen wäre. Wie im Methodenteil beschrieben (2.2.4.1), wurde im ersten Schritt die Reparaturreaktion der PIMT durchgeführt. Dafür wurden AMC-gebundene PIMT-Substrate verwendet. Die Reaktion wurde durch Hitzedenaturierung der PIMT bei 95 °C für 5 min beendet. Im Anschluss konnte die Konzentration an „repariertem“ Substrat durch die Bestimmung der Konzentration an freiem AMC, welches durch die APN freigesetzt wurde, mittels Fluoreszenz bestimmt werden. Nachfolgend der schematische Ablauf des APN-gekoppelten PIMT-Aktivitätsassays:

Ergebnisse



In Abb. 32 ist die Ermittlung der optimalen APN-Aktivität für die Quantifizierung des reparierten isoAsp-Substrates graphisch dargestellt. Ausgehend von 0.485 U wurde die APN-Konzentration schrittweise halbiert. Wie zu erkennen ist, wird selbst mit 0.03 U ein vollständiger Umsatz nach 36 h erreicht. Da es sich um einen diskontinuierlichen Assay handelt, muss die PIMT-Reaktion gestoppt werden. Das kann sowohl chemisch als auch physikalisch erfolgen. Wir haben uns dafür entschieden, die PIMT-Reaktion durch schnelle Temperaturerhöhung auf 95 °C zu stoppen. Dabei wird die PIMT irreversibel denaturiert. In Abb. 33 ist die relative PIMT-Aktivität nach Inkubation des Proteins bei 95 °C für verschiedene Zeitspannen abgebildet. Nach 1 min bei 95 °C ist der Aktivitätsverlust gering, nach 90 s ist PIMT inaktiviert. Für den Assay wurde eine Inkubationszeit von 5 min bei 95 °C gewählt, um ganz sicher zu sein, dass keine Restaktivität der PIMT vorhanden ist.

Ergebnisse

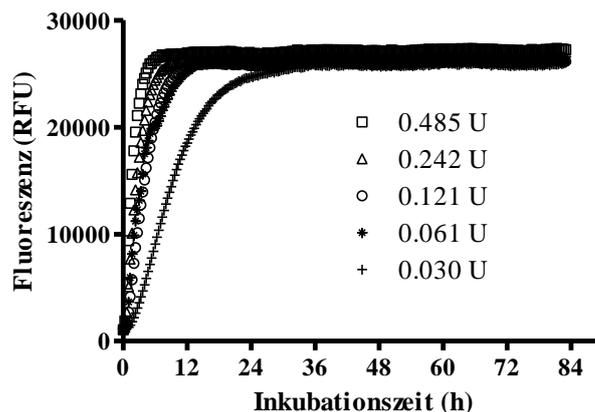


Abb. 32: Zeit-Umsatz-Kurve. Umsatz von 25 μ M H-AEDA-AMC durch bovine APN bei 37 °C in 0.1 M Tris/HCl pH 8. Ausgehend von 0.485 U wurde die Menge an APN schrittweise halbiert. Im Bereich von 0.061 – 0.485 U kann ein vollständiger Umsatz nach ca. 12 h beobachtet werden. Mit 0.030 U wird ein vollständiger Umsatz erst nach 36 h erreicht.

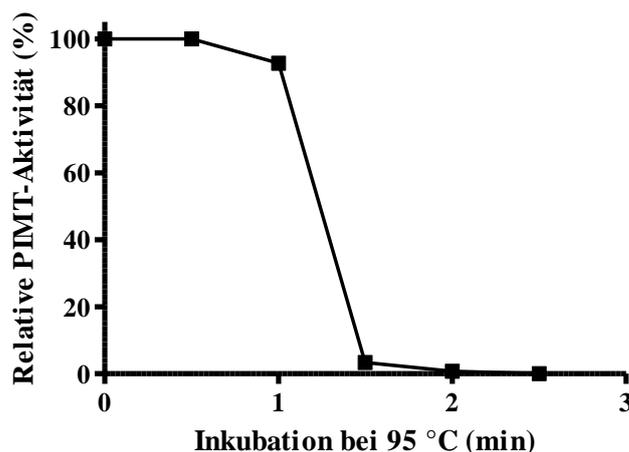


Abb. 33: PIMT-Aktivität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit im Heizblock bei 95 °C. Abgebildet ist die relative Aktivität rekombinanter humaner PIMT nach Inkubation bei 95 °C. Nach 30 s ist kein Aktivitätsverlust zu beobachten. Selbst nach 1 min bei 95 °C ist kaum eine Verringerung der Aktivität vorhanden. Nach 90 s fällt die Aktivität schlagartig auf fast Null ab. Unter Assaybedingungen wurde für 5 min bei 95 °C inkubiert, um eine Restaktivität der PIMT auszuschließen.

In Abb. 34 ist exemplarisch die Zeit-Umsatz-Kurve für die Reparatur von 20 μ M AED_{iso}A-AMC zu AEDA-AMC durch 1 μ M His₆-rhPIMT abgebildet. Die Quantifizierung erfolgte durch APN. Man kann deutlich erkennen, dass der ausgewertete Anstieg im linearen Bereich der Reaktion liegt. Unter Assaybedingungen wurde darauf geachtet, dass sich die auszuwertenden Anstiege stets im linearen Bereich befinden. Man kann erkennen, dass der

Ergebnisse

Startpunkt der Reaktion nicht bei 0 μM AMC liegt. Das kann auf eine Verunreinigung in der Synthese des Substrates hindeuten.

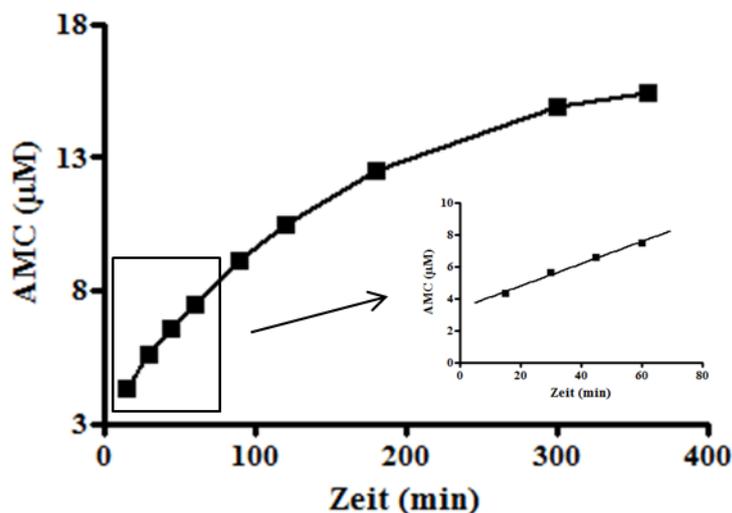


Abb. 34: Zeit-Umsatz-Kurve. Umsatz von 20 μM AED_{iso}A-AMC durch 1 μM His₆-rhPIMT in 0.1 M Tris/HCl pH 8 bei 37 °C. Die Quantifizierung erfolgte durch APN. Der ausgewertete Bereich der Reaktion liegt deutlich im linearen Bereich der Zeit-Umsatz-Kurve.

Als nächstes wurde die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der PIMT-Konzentration untersucht. In Abb. 35 sind die Zeit-Umsatz-Kurven für verschiedene PIMT-Konzentrationen und gleichbleibende Substrat und Cosubstrat-Konzentrationen bei 37 °C in 0.1 M Tris/HCl pH 8 dargestellt. Auch hier kann man einen Anstieg in der Startfluoreszenz erkennen. Das ist vermutlich zum einen durch die Eigenfluoreszenz der PIMT und zum anderen durch die Eigenfluoreszenz des Substrates bedingt. Weiterhin ist zu beobachten, dass hier keine lineare Abhängigkeit zwischen PIMT-Konzentration und Umsatzgeschwindigkeit vorliegt (Abb. 35). Die Umsatzgeschwindigkeit strebt mit steigender PIMT-Konzentration einem Maximum entgegen. Nach einer Michaelis-Menten-Analyse konnte ein V_{Max} von $0.77 \pm 0.02 \mu\text{M}/\text{min}$ und ein K_M von $1.101 \pm 0.071 \mu\text{M}$ PIMT ermittelt werden. Für eine genauere Analyse sind weitere Experimente notwendig. So wäre die Durchführung einer analytischen Ultrazentrifugation mit steigender PIMT-Konzentration sinnvoll, um zu sehen, ob PIMT Oligomere bildet.

Ergebnisse

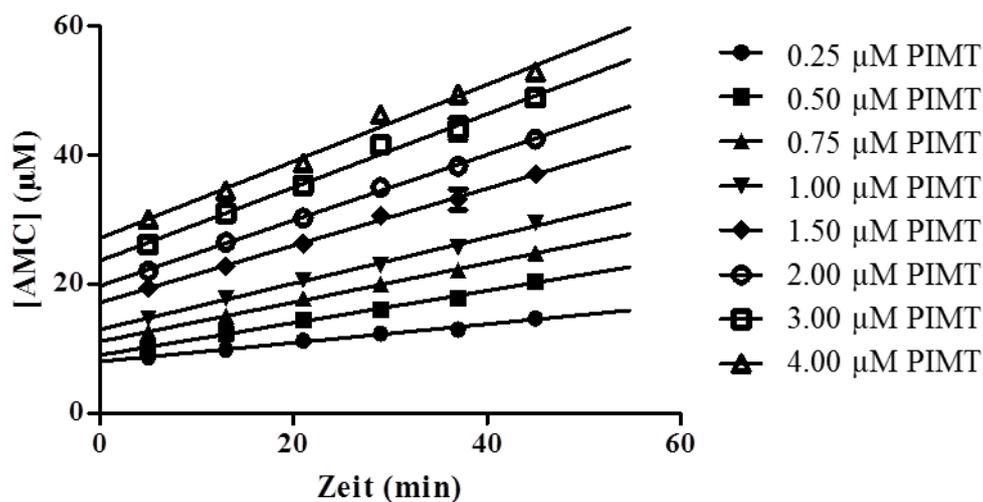


Abb. 35: Zeit-Umsatz-Kurven in Abhängigkeit verschiedener PIMT-Konzentrationen. Dargestellt sind die Zeit-Umsatz-Kurven von 500 µM AED_{iso}A-AMC und 1 mM SAM mit verschiedenen PIMT-Konzentrationen in 0.1 M Tris/HCl pH 8.0 und bei 37 °C. Sowohl die Substrat/Cosubstrat- als auch die PIMT-Lösung wurden für 10 min bei 37 °C prä-inkubiert. Die PIMT-Reaktion wurde nach 5, 13, 21, 29, 27 und 45 min durch Kochen bei 95 °C für 5 min gestoppt. Die Quantifizierung des „reparierten“ isoAsp-Substrates erfolgte mit 0.061 U APN für 24 h und die AMC-spezifische Fluoreszenzdetektion wurde an einem Polarstar Plattenleser von BMG Labtech durchgeführt.

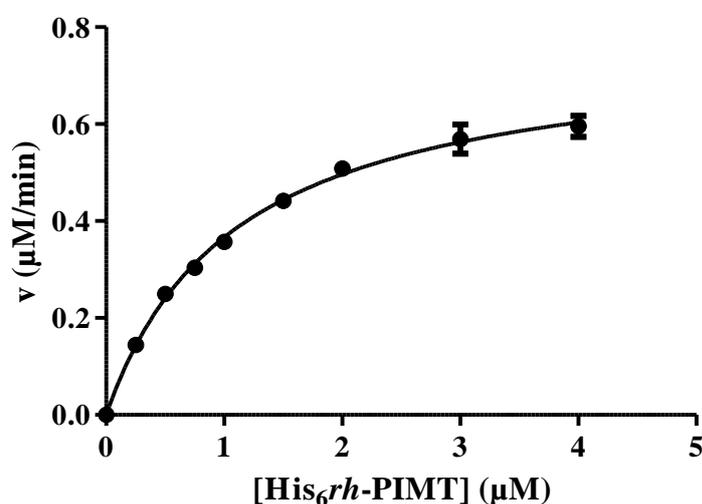


Abb. 36: Abhängigkeit der Umsatzgeschwindigkeit von der PIMT-Konzentration. Untersucht wurde die Abhängigkeit der Umsatzgeschwindigkeit mit 500 µM AED_{iso}A-AMC und 1 mM SAM bei verschiedenen Konzentrationen *rh*PIMT1. Die Untersuchungen wurden in 0.1 M Tris/HCl pH 8.0 und 37 °C durchgeführt. Die Umsatzgeschwindigkeit strebt mit steigender PIMT-Konzentration einem Maximum entgegen. Dieses liegt nach einer Michaelis-Menten-Analyse bei einem V_{\max} von 0.77 ± 0.02 µM/min. Der K_M liegt bei 1.101 ± 0.071 µM PIMT.

Ergebnisse

Nachdem gezeigt wurde, dass AED_{iso}A-AMC durch PIMT zu AEDA-AMC repariert werden kann und man innerhalb einer Stunde einen linearen Anstieg nach der Quantifizierungsreaktion erhält, wurde eine K_M -Bestimmung für AED_{iso}A-AMC und *rh*PIMT durchgeführt.

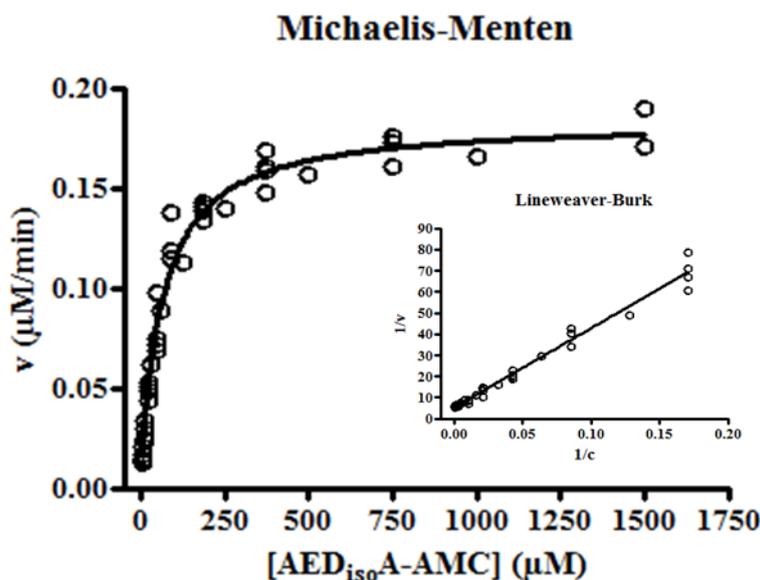


Abb. 37: v/S -Charakteristik des Umsatzes von AED_{iso}A-AMC zu AEDA-AMC durch *rh*PIMT. Die Quantifizierung der Menge an entstandenem Produkt wurde mittels APN durchgeführt. Nach Freisetzung des AMC konnte dessen Fluoreszenz detektiert werden. Die Versuche wurden in 0.1 M Tris/HCl pH 8.0 und 37 °C durchgeführt. Die Anfangskonzentration von SAM lag bei 500 µM und die Konzentration von PIMT bei 1 µM. Es konnte ein K_M von 62 ± 4 µM und ein k_{cat} von 0.184 ± 0.003 min⁻¹ bestimmt werden.

Abb. 37 zeigt die v/S -Charakteristik für den Umsatz von AED_{iso}A-AMC zu AEDA-AMC durch *rh*PIMT. Ergänzend ist der dazugehörige Lineweaver-Burk-Plot abgebildet, der die Qualität der K_M -Bestimmung unterstreicht. Es konnte ein K_M von 62 ± 4 µM und ein k_{cat} von 0.184 ± 0.003 min⁻¹ bestimmt werden. Zur Verifizierung der Methode wurde diese K_M -Bestimmung auch mittels Kapillarelektrophorese und HPLC durchgeführt.

3.4.2 Trennung von H-AEDA-AMC und H-AED_{iso}A-AMC via CE-UV

Ähnlich wie im APN-gekoppelten PIMT-Aktivitätsassay kann man das „reparierte“ isoAsp-Substrat auch per CE-UV quantitativ nachweisen. Hierbei wird wie unter 3.1 beschrieben

Ergebnisse

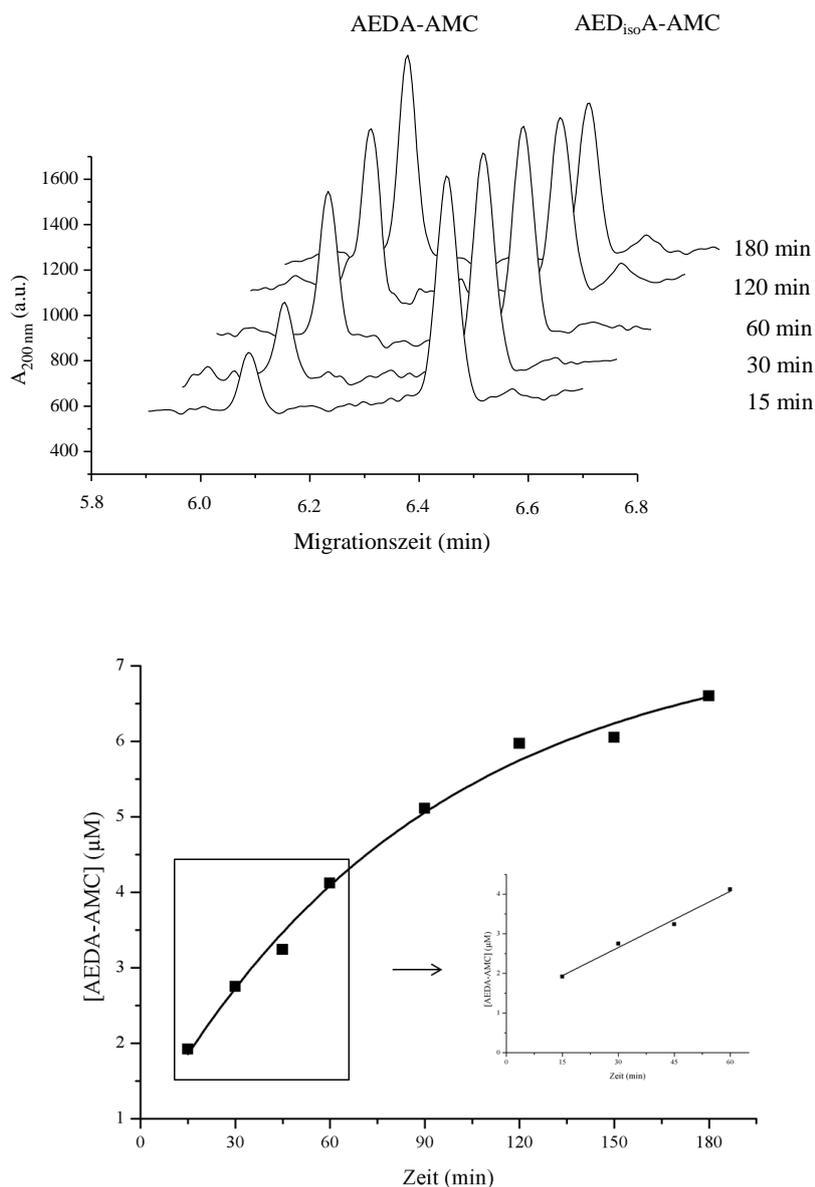


Abb. 38: Darstellung der Reparatur von AED₁₈₀A-AMC zu AEDA-AMC durch PIMT mittels CE-UV. Oben: Gezeigt sind exemplarisch fünf CE-UV-Läufe mit Proben von verschiedenen Inkubationszeiten des Substrates AED₁₈₀A-AMC (12 μM) mit *rh*PIMT (1 μM) und SAM (500 μM) bei 37 °C in 0.1 M Tris/HCl pH 8. Man kann deutlich die Zunahme des Produktsignals (AEDA-AMC, 6.05 min) und die Abnahme des Substratsignals (AED₁₈₀A-AMC, 6.4 min) erkennen. Die CE-UV-Läufe wurden in 50 mM Citrat/HCl pH 3.0 bei 20 °C mit 20 kV und 0.2 psi durchgeführt. Die Detektion erfolgte bei 200 nm. Die Auswertung erfolgte anhand einer Standardkurve, die unter Assaybedingungen generiert wurde. Dafür wurden mehrere CE-Läufe mit 1000 μM AED₁₈₀A-AMC und steigenden Konzentrationen an AEDA-AMC (0-1000 μM) durchgeführt. Die Quotienten der Peakflächen wurden gegen die Konzentration an AEDA-AMC aufgetragen und linear angepasst. Unten: Resultierende P/t-Kurve aus den Primärdaten der CE-UV. Innerhalb von 60 min Reaktionszeit liegt ein linearer Anstieg vor, dieser Zeitraum wurde für die Auswertungen benutzt.

Ergebnisse

die unterschiedliche Nettoladung der beiden Peptidspezies ausgenutzt. In Abb. 38 (oben) ist die erfolgreiche Reparatur von AED_{iso}A-AMC zu AEDA-AMC durch PIMT mittels CE-UV dargestellt. Mit zunehmender Inkubationszeit verringert sich die Peakhöhe des Substrates AED_{iso}A-AMC, andererseits erhöht sich das Signal des Produktes AEDA-AMC. Die ermittelten Peakflächen konnten mit Hilfe einer Standardgeraden in Konzentrationen umgewandelt werden. Die Konzentration wurde gegen die Reaktionszeit aufgetragen (Abb. 38, unten), wodurch die Umsatzgeschwindigkeit von AED_{iso}A-AMC ermittelt werden konnte. Damit konnte unabhängig vom APN-Assay die Reparatur von AED_{iso}A-AMC zu AEDA-AMC durch PIMT bestätigt werden.

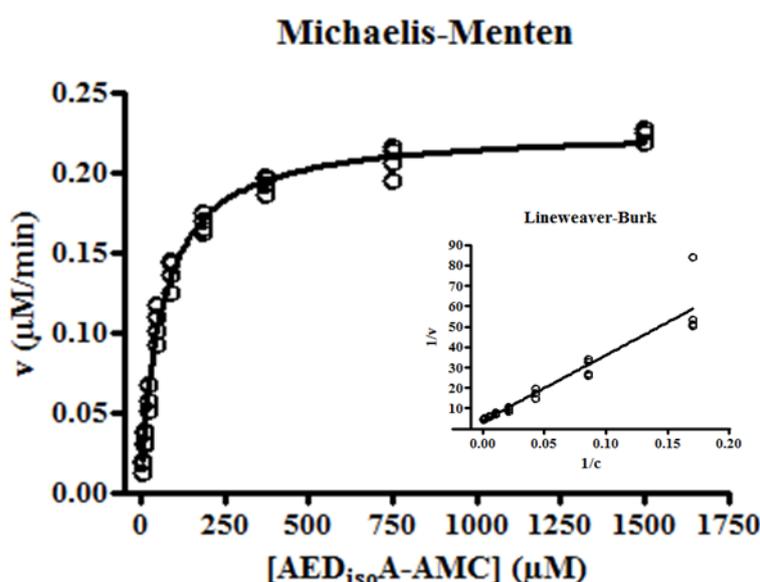


Abb. 39: v/S -Charakteristik des Umsatzes von AED_{iso}A-AMC zu AEDA-AMC durch *rh*PIMT. Produkt und Substrat wurden mit Hilfe der CE-UV in 50 mM Citrat/HCl pH 3.0 bei 20 kV, 0.2 psi und 20 °C voneinander getrennt. Die erhaltenen Peakflächen konnten mit Hilfe einer Standardgeraden in Konzentrationen umgewandelt werden. Die Versuche wurden in 0.1 M Tris/HCl pH 8.0 und 37 °C durchgeführt. Die Anfangskonzentration von SAM lag bei 500 µM und die Konzentration von PIMT bei 1 µM. Die Konzentration des Substrates AED_{iso}A-AMC wurde zwischen 0 – 1.5 mM variiert. Es konnte ein K_M von 62 ± 3 µM und ein k_{cat} von 0.227 ± 0.003 min⁻¹ bestimmt werden.

Um zu zeigen, dass der APN-Assay valide ist, wurde die K_M -Bestimmung von AED_{iso}A-AMC und *rh*PIMT auch mittels CE-UV durchgeführt. Wie in Abb. 39 graphisch dargestellt ist, konnte mittels CE-UV für den Umsatz von AED_{iso}A-AMC zu AEDA-AMC durch *rh*PIMT ein K_M von 62 ± 3 µM und ein k_{cat} von 0.227 ± 0.003 min⁻¹ bestimmt werden. Diese Werte sind fast identisch zur K_M -Bestimmung mittels APN-gekoppelten PIMT-Aktivitätsassay. Somit

Ergebnisse

konnten die Ergebnisse mittels des APN-gekoppelten PIMT-Aktivitätsassays durch die CE-Analyse bestätigt werden. Nachfolgend ist die K_M -Bestimmung für AED_{iso}A-AMC und PIMT mittels HPLC-UV beschrieben.

3.4.3 Nachweis von S-Adenosyl-L-homocystein mittels HPLC-UV

Als zweite unabhängige Methode konnten wir die HPLC-UV nutzen, um das entstehende SAH vom SAM und der PIMT zu trennen und zu quantifizieren. Hierfür nutzten wir ein modifiziertes Protokoll nach Schurter und Aswad (Schurter, Aswad 2000). Dadurch konnten auch Substrate ohne AMC kinetisch untersucht werden. In Abb. 40 ist die Trennung des entstehenden SAH von den restlichen Komponenten des Inkubationsansatzes veranschaulicht. Es liegt eine Basislinientrennung zwischen SAH und den anderen Komponenten vor. Mit Hilfe dieser Trennungs- und Detektionsmethode konnten nachfolgend v/S-Charakteristiken für mehrere PIMT-Substratpeptide generiert werden. Abb. 41 zeigt exemplarisch die v/S-Charakteristik des Umsatzes von AED_{iso}A-AMC und SAM durch rekombinante humane PIMT. Hierfür wurden die Integrale des SAH-Signals aus den HPLC-Messungen mit Hilfe einer Standardgeraden (nicht gezeigt) in molare Konzentrationen SAH umgerechnet. Die molaren Konzentrationen wurden gegen die Inkubationszeiten aufgetragen und einer linearen Gleichung angepasst. Die daraus ermittelten Umsatzgeschwindigkeiten (v) wurden dann gegen die Substratkonzentration, wie in Abb. 41 abgebildet, aufgetragen und nach einer Michaelis-Menten-Kinetik analysiert. Zur weiteren Qualitätskontrolle der generierten Daten ist ebenfalls die Lineweaver-Burk-Darstellung abgebildet. Es konnte mittels HPLC-UV ein K_M von $67 \pm 4 \mu\text{M}$ und ein k_{cat} von $1.06 \pm 0.02 \text{ min}^{-1}$ bestimmt werden. Der ermittelte K_M bestätigt die erhaltenen Werte durch den APN-gekoppelten Assay und der Quantifizierung durch CE-UV. Damit konnte der APN-gekoppelte Assay durch eine zweite unabhängige Methode bestätigt werden. Der k_{cat} ist circa fünfmal so hoch wie in den beiden anderen Methoden. Das liegt daran, dass zur erfolgreichen Reparatur von isoAsp mehrere Reparaturzyklen durchlaufen werden müssen, da das Succinimidyl-Intermediat wieder zu 70 % in isoAsp zerfällt.

Ergebnisse

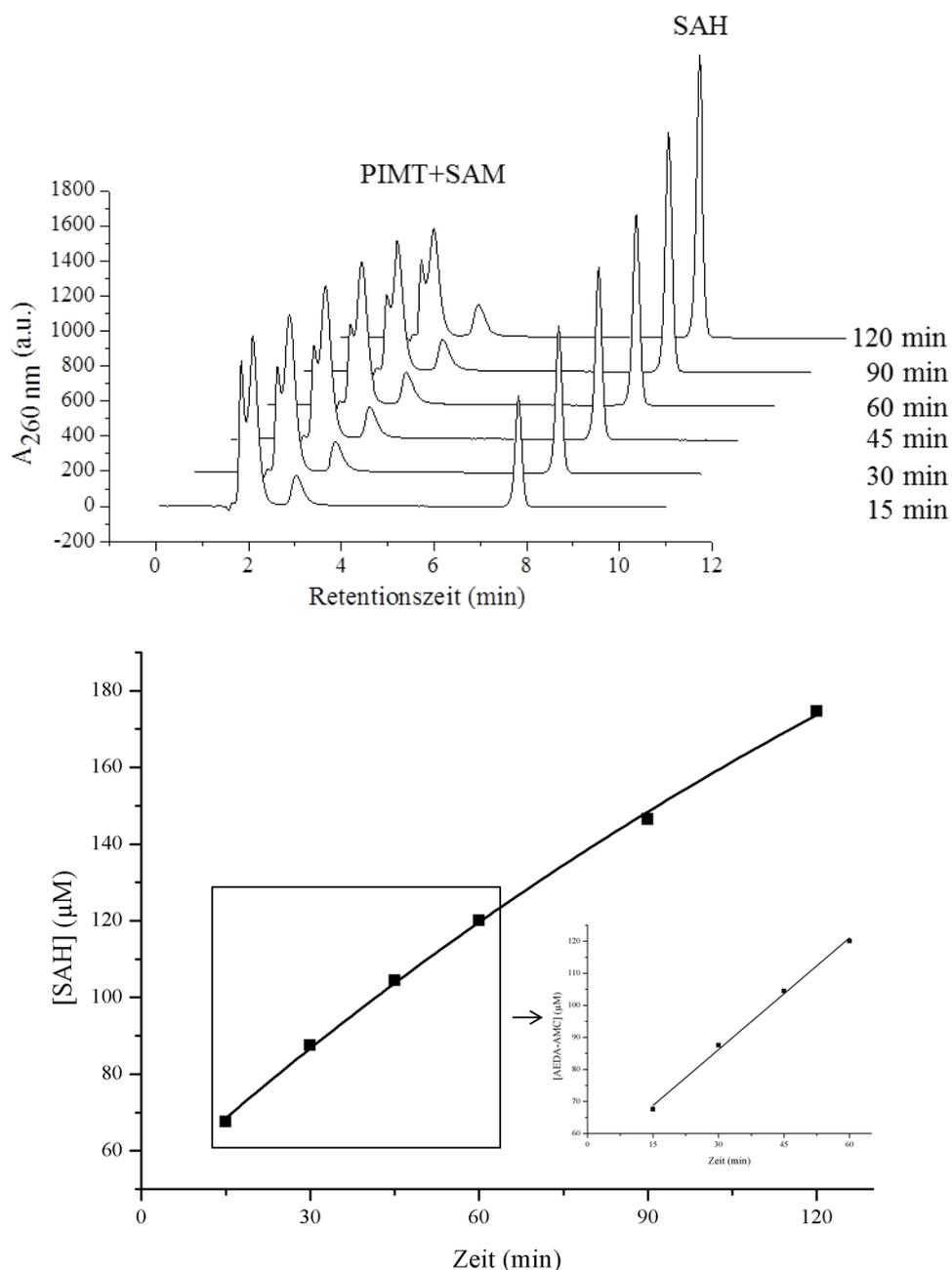


Abb. 40: Abhängigkeit der PIMT-katalysierten Bildung von SAH von der Reaktionszeit. Reparatur von $\text{NLD}_{\text{iso}}\text{AEFRH}$ zu NLDAEFRH mittels Detektion von SAH via HPLC-UV. Oben: Dargestellt sind sechs HPLC-UV-Läufe von thermisch gestoppten (95°C , 5 min) Inkubationsansätzen mit PIMT ($1 \mu\text{M}$), SAM ($500 \mu\text{M}$) und $\text{NLD}_{\text{iso}}\text{AEFRH}$ (1.5 mM) in 0.1 M Tris/HCl pH 8 bei 37°C . Nach 2 min werden PIMT und SAM und nach 7.9 min wird SAH eluiert. Die HPLC-UV-Läufe wurden bei Raumtemperatur und einem Gradienten von 2 % AcN / 98 % H_2O (0.1 % TFA) zu 12 % AcN / 88 % H_2O (0.1 % TFA) über 11 min an einer C-18-Säule durchgeführt. Unten: Die Peakflächen vom SAH-Signal konnten anhand einer Standardgeraden in molare Konzentrationen überführt werden. Diese wurden gegen die Reaktionszeit aufgetragen. Innerhalb von 60 min ist der Anstieg linear (Ausschnitt). Dieser Anstieg wurde für weitere Berechnungen verwendet. Der Schnittpunkt mit der y-Achse liegt nicht im Koordinatenursprung, da das verwendete SAM nicht zu 100 % rein war.

Ergebnisse

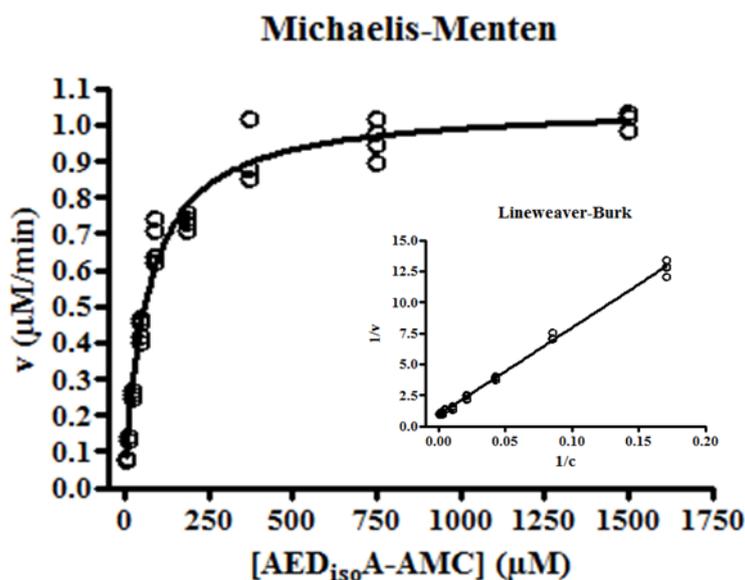


Abb. 41: v/S-Charakteristik des Umsatzes von SAM zu SAH durch *rh*PIMT in Abhängigkeit der Konzentration an AED_{iso}A-AMC. Die Geschwindigkeit der PIMT-Reaktion wurde durch die Menge an entstandenem SAH mittels HPLC-UV ermittelt. Die erhaltenen Peakflächen konnten mit Hilfe einer Standardgeraden in Konzentrationen umgewandelt werden. Die Versuche wurden in 0.1 M Tris/HCl pH 8.0 und 37 °C durchgeführt. Die Anfangskonzentration von SAM lag bei 500 µM und die Konzentration von PIMT bei 1 µM. Die Konzentration des Substrates AED_{iso}A-AMC wurde zwischen 0 – 1.5 mM variiert. Es konnte ein K_M von 67 ± 4 µM und ein k_{cat} von 1.06 ± 0.02 min⁻¹ bestimmt werden.

Tab. 6: Darstellung der kinetischen Parameter des Umsatzes von AED_{iso}A-AMC zu AEDA-AMC durch *rh*PIMT, bestimmt mittels eines gekoppelten enzymatischen Test, HPLC-UV und CE-UV.

	K_M (µM)	V_{MAX} (µM/min)	k_{cat} (min ⁻¹)	k_{cat}/K_M (µM ⁻¹ *min ⁻¹)
APN-Assay	62±4	0.184±0.003	0.184±0.003	$3.0 \cdot 10^{-3} \pm 0.8 \cdot 10^{-3}$
CE-UV	62±3	0.227±0.003	0.227±0.003	$3.7 \cdot 10^{-3} \pm 0.9 \cdot 10^{-3}$
HPLC-UV	67±4	1.06±0.02	1.06±0.02	$16 \cdot 10^{-3} \pm 4 \cdot 10^{-3}$

Wie Tab. 6 veranschaulicht, sind die erhaltenen Daten für den APN-gekoppelten PIMT-Assay und die Aktivitätsbestimmung mittels CE-UV fast identisch. Zusätzlich konnte der K_M für AED_{iso}A-AMC ebenso durch die HPLC-UV-Messungen bestätigt werden. Der circa fünffach erhöhte k_{cat} bei den HPLC-Messungen kann durch die mehrmalige Reparatur des isoAsp-Substrates erklärt werden. Damit kann davon ausgegangen werden, dass der APN-gekoppelte PIMT-Aktivitätsassay valide ist. Zusätzlich konnten weitere K_M -Werte für verschiedene

Ergebnisse

PIMT-Substrate mit dem APN-gekoppelten PIMT-Aktivitätsassay generiert und mittels HPLC-UV-Assay bestätigt werden (Tab. 7). Auch hier konnten vier- bis sechsfach erhöhte k_{cat} -Werte bei der HPLC-Methode beobachtet werden. Mit Hilfe der HPLC-Methode konnten weiterhin Vergleiche zwischen dem PIMT-Substrat mit und ohne AMC-Kopplung aufgestellt werden. Interessanterweise scheint das AMC-gekoppelte AED_{iso}A ($K_M = 67 \mu\text{M}$; $k_{\text{cat}} = 1.06 \text{ min}^{-1}$) ein besseres PIMT-Substrat zu sein als das AED_{iso}A ($K_M = 212 \mu\text{M}$; $k_{\text{cat}} = 0.38 \text{ min}^{-1}$) an sich.

Tab. 7: K_M und k_{cat} verschiedener PIMT-Substrate. Die Konstanten wurden in 0.1 M Tris / HCl pH 8 und 37 °C bestimmt. Alle Konstanten der AMC-Substrate wurden sowohl durch den APN-gekoppelten PIMT-Aktivitätsassay als auch durch den Nachweis von entstehendem SAH bestimmt. Das AED_{iso}A-AMC konnte zusätzlich mittels CE-UV vermessen werden.

Substrat	K_M (μM)			k_{cat} (min^{-1})		
	Fluoreszenz	HPLC	CE	Fluoreszenz	HPLC	CE
SAM	259±15	268±15	-	0.38±0.01	2.15±0.04	-
SAM (LS)	116±12	118±8	-	0.25±0.01	0.88±0.01	-
AED _{iso} A-AMC	62±4	67±4	62±3	0.184±0.003	1.06±0.02	0.227±0.003
ARD _{iso} A-AMC	60±3	64±3	-	0.217±0.003	1.53±0.02	-
AED _{iso} A	-	212±19	-	-	0.38±0.01	-
AAD _{iso} A-AMC	78±4	73±9	-	0.217±0.003	1.36±0.04	-
AAAD _{iso} A-AMC	62±4	62±8	-	0.231±0.004	1.46±0.04	-
KMD _{iso} AEFRH	-	127±30	-	-	1.30±0.09	-
NLD _{iso} AEFRH	-	120±20	-	-	1.25±0.06	-
EFRHD _{iso} AGEV	-	83±3	-	-	1.29±0.01	-
D _{iso} AEF	-	3533±330	-	-	0.06±0.01	-

Zwischen den acht und neun Aminosäuren langen Substraten mit internem isoAsp sind die Unterschiede in K_M und k_{cat} eher minimal. Das trifft auch für die AMC-Substrate zu. Auffällig ist, dass N-terminales isoAsp ein eher schlechtes PIMT-Substrat darstellt ($K_M = 3533 \mu\text{M}$;

Ergebnisse

$k_{\text{cat}}=0.06 \text{ min}^{-1}$). Weiterhin konnten wir zeigen, dass der K_M für SAM mit steigender Konzentration des zweiten Substrates zunimmt. So konnte mit $60 \mu\text{M}$ eingesetztem $\text{AED}_{\text{isoA-AMC}}$ ein K_M von $120 \mu\text{M}$ und ein k_{cat} von 0.25 min^{-1} für SAM und PIMT bestimmt werden. Bei $250 \mu\text{M}$ eingesetztem $\text{AED}_{\text{isoA-AMC}}$ stieg der K_M auf ca. $260 \mu\text{M}$ und der k_{cat} auf ca. 0.38 min^{-1} . Damit erhöhte sich der K_M über das Doppelte und der k_{cat} auf das Anderthalbfache. Nimmt man die HPLC-Methode stieg der k_{cat} sogar auf das Zweieinhalbfache. Die Ergebnisse werfen mehrere Fragen auf. Wieso ist der K_M von SAM so hoch? Laut Literaturangaben sollte dieser bei circa $2 \mu\text{M}$ liegen (Ichikawa, Clarke 1998). Ist eine Einsubstratreaktion des SAM möglich? Nach der Publikation von Smith *et al.* verläuft die Übertragung der Methylgruppe von SAM auf das isoAsp nach einem SN_2 -Mechanismus in geordneter Reihenfolge (Smith *et al.* 2002). Denkbar wäre eine Übertragung der Methylgruppe des SAM auf H_2O im aktiven Zentrum. Für eine Klärung dieser Fragen müssten noch weitere Experimente durchgeführt werden.

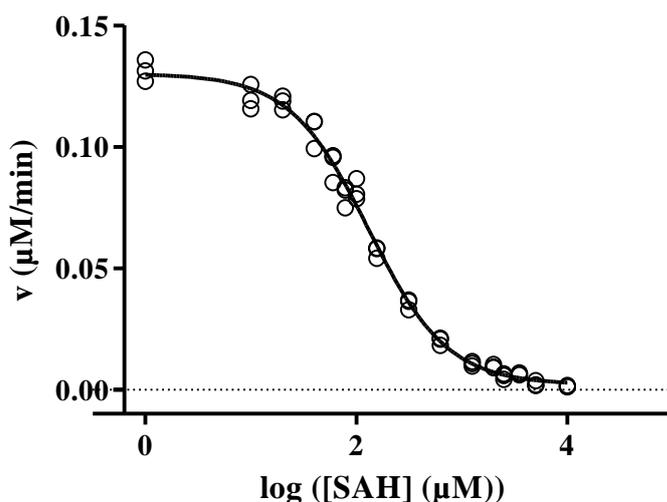


Abb. 42: Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) von SAH auf *rhPIMT* unter den genannten Bedingungen (keine Sättigung). $100 \mu\text{M}$ $\text{AED}_{\text{isoA-AMC}}$, $250 \mu\text{M}$ SAM und $1 \mu\text{M}$ $\text{His}_6\text{-rhPIMT}$ wurden mit verschiedenen Konzentrationen an SAH ($0 \text{ mM} \rightarrow 10 \text{ mM}$) in 0.1 M Tris/HCl pH 8 bei 37°C inkubiert. Die Umsatzgeschwindigkeit wurde gegen den dekadischen Logarithmus der SAH-Konzentration aufgetragen und analysiert. Nach der Analyse konnte ein IC_{50} von $131 \pm 6 \mu\text{M}$ bestimmt werden. Die Umsatzgeschwindigkeiten wurden mit Hilfe des APN-gekoppelten PIMT-Aktivitätsassays bestimmt.

Letztendlich sollten mit Hilfe des APN-gekoppelten PIMT-Aktivitätsassays Effektoren von PIMT untersucht werden. Zur Messung der Effektivität von Inhibitoren verwendet man die IC_{50} -Bestimmung. In Abb. 42 ist die Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) für SAH, SAM und PIMT graphisch dargestellt.

Ergebnisse

Als zweites Substrat wurden 100 μM AED_{iso}A-AMC eingesetzt. Für die Anfangskonzentration von SAM wurden 250 μM gewählt. Die Konzentration an Inhibitor (SAH) wurde zwischen 0 – 10 mM variiert. Der Logarithmus der Inhibitorkonzentration wurde gegen die ermittelte Umsatzgeschwindigkeit aufgetragen. Der erhaltene sigmoide Verlauf konnte nach der Gleichung:

$$f(x) = v(\min) + (v(\max) - v(\min)) / (1 + 10^{(x - \log(\text{IC}_{50}))})$$

ausgewertet werden, wodurch sich ein IC₅₀ von 131 \pm 6 μM ergab. Damit liegt der IC₅₀ circa bei der Hälfte der Konzentration des eingesetzten SAM. Leider stehen hier in der Literatur noch keine Vergleichswerte zur Verfügung. Der APN-gekoppelte Assay ist für die Bestimmung von kinetischen Konstanten von Effektoren geeignet.

3.4.4 Bestimmung von pH- und Temperaturoptimum der durch PIMT katalysierten Reaktion mittels CE-UV, HPLC-UV und APN-gekoppelten PIMT-Aktivitätsassay

Zur Überprüfung der Validität des APN-gekoppelten PIMT-Aktivitätsassays und zur Komplettierung der biochemischen Parameter des PIMT-Proteins wurden sowohl das Temperatur- als auch das pH-Optimum der enzymkatalysierten Substratumsetzung durch PIMT durch die drei zur Verfügung stehenden Methoden bestimmt. Gerade in Hinblick auf mögliche therapeutische Anwendungen der PIMT ist es interessant, seine biochemischen Eigenschaften besser zu kennen. In Abb. 43 ist die Temperatur, bei der die PIMT-Reaktion durchgeführt wurde, gegen die relative PIMT-Aktivität aufgetragen. Dabei konnte durch alle drei Methoden ein Temperaturoptimum von circa 46 °C ermittelt werden. In der Arbeit von Thapar *et al.* 2001 wurde für das humane Protein ein Wert von 55 °C und für das pflanzliche Protein aus Mais, Getreide und Karotte ein ähnliches Optimum um die 45 °C ermittelt (Thapar *et al.* 2001). Aus diesem Grund wurde in dem nächsten Teilabschnitt (3.4.5) eine Analyse der thermischen Stabilität mittels Fern-UV-CD durchgeführt. In Abb. 44 ist der pH-Wert gegen die relative PIMT-Aktivität aufgetragen. Das pH-Optimum der PIMT-Reaktion liegt demnach um 9.5. Literaturwerte zum humanen Protein liegen nicht vor, jedoch konnte für das Protein aus *Escherichia coli* ein pH-Optimum von 5.5 und für das Protein aus *Cicer arietinum* ein pH-Optimum von 9 bestimmt werden (Ichikawa, Clarke 1998; Verma *et al.* 2010).

Ergebnisse

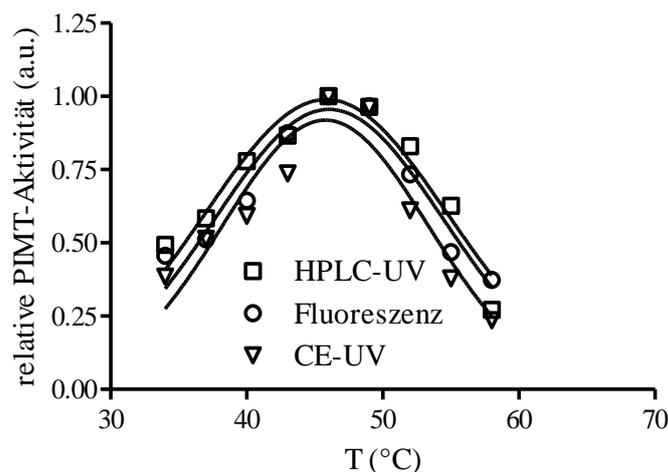


Abb. 43: Bestimmung des Temperaturoptimums der durch PIMT katalysierten Reaktion. Der Versuch wurde in 0.1 M Tris/HCl pH 8 durchgeführt. Dabei konnte ein Temperaturoptimum von 46.1 ± 0.6 °C durch den APN-gekoppelten PIMT-Aktivitätsassay, 45.9 ± 0.6 °C durch den Nachweis von SAH mittels HPLC-UV und 45.8 ± 0.7 °C durch die Trennung von AEDA-AMC und AED_{iso}A-AMC mittels CE-UV bestimmt werden.

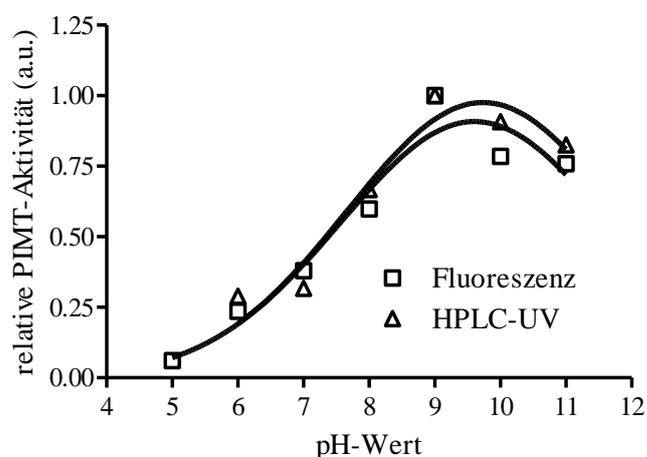


Abb. 44: Bestimmung des pH-Optimums der durch PIMT katalysierten Reaktion mittels APN-gekoppelten PIMT-Aktivitätsassay und SAH-Nachweis über HPLC. Mit dem APN-gekoppelten PIMT-Aktivitätsassay ergab sich dabei ein pH-Optimum von 9.4 ± 0.1 und mittels SAH-Nachweis über HPLC-UV ergab sich ein Optimum von pH 9.7 ± 0.3 .

3.4.5 Strukturelle Untersuchungen mittels Circular dichroismus

Im vorigen Abschnitt konnte für die humane PIMT ein Temperaturoptimum von 46 °C bestimmt werden. Da in der Literatur bereits ein Wert von 55 °C vorliegt, wurden zusätzlich thermische Stabilitätsuntersuchen an der humanen PIMT durchgeführt. Zur Bestimmung der Sekundärstruktur der PIMT wurden verschiedene CD-Messungen im Fern-UV (190 nm –

Ergebnisse

260 nm) durchgeführt. Hier können Unterschiede in den Verhältnissen der verschiedenen Sekundärstrukturen bestimmt werden. Im Bereich von 190-240 nm absorbiert die Peptidbindung in Proteinen und Peptiden, mit einem Maximum bei 190 nm. Die α -Helix hat ein Maximum bei 192 nm und zwei Minima bei 209 und 222 nm. β -Faltblätter haben ein Maximum bei 196 nm und ein Minimum bei 218 nm. Hingegen haben Random-Coil-Strukturen ein Minimum bei 195 nm und ein Maximum bei 212 nm. Nach Literaturangaben besteht die humane PIMT (Isoform 1 & 2) aus 13 α -Helices und 7 β -Faltblättern (Ryttersgaard et al. 2002; Smith et al. 2002).

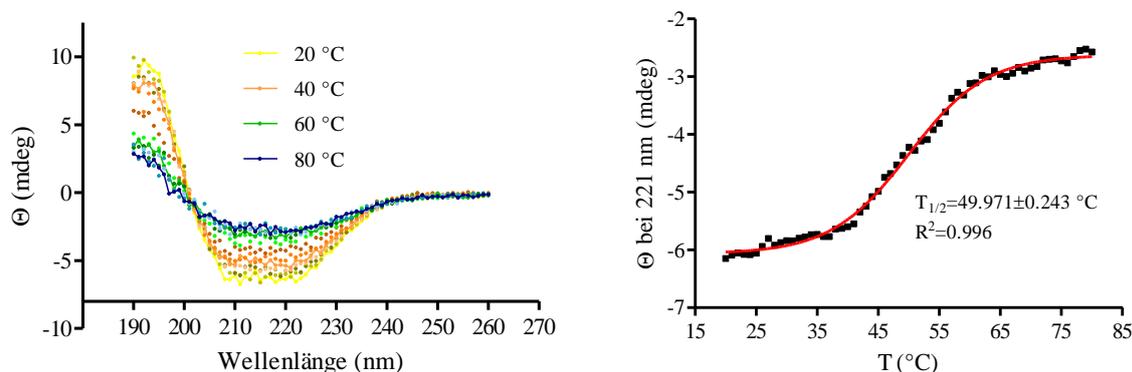


Abb. 45: (links) Fern-UV-CD-Spektren der *rhPIMT* bei verschiedenen Temperaturen. 0.1 mg/ml *rhPIMT* wurden in reinem Wasser bei Temperaturen zwischen 20 und 80 °C mittels Fern-UV-CD gemessen. **(rechts)** CD-Signal bei 221 nm mit einem Messpunkt je Grad Celsius. Bei 221 nm weisen die CD-Spektren mit zunehmender Temperatur die größten Unterschiede auf, daher wurde diese Wellenlänge für die Bestimmung der thermischen Stabilität ausgewählt. Der sigmoide Verlauf des Temperaturüberganges der *rhPIMT* wurde nach Boltzmann analysiert. Dabei wurde unter den hier verwendeten Bedingungen ein $T_{1/2}$ von 50.0 ± 0.2 °C ermittelt.

Die in Abb. 45 dargestellten Spektren entsprechen unter den verwendeten Bedingungen dem eines Proteins mit α -Helices und β -Faltblättern. Dafür sprechen die Maxima zwischen 190 und 200 nm und das breite Minimum zwischen 209 und 222 nm. Die thermische Stabilität für *rhPIMT* konnte dabei, durch Verfolgung des CD-Signals bei 221 nm und stufenweiser Erwärmung der Proteinlösung, mit einem $T_{1/2}$ von ca. 50 °C bestimmt werden. Diese Beobachtung macht ein Temperaturoptimum der PIMT-katalysierten Reaktion bei 46 °C wahrscheinlicher als ein Optimum von 55 °C.

Ergebnisse

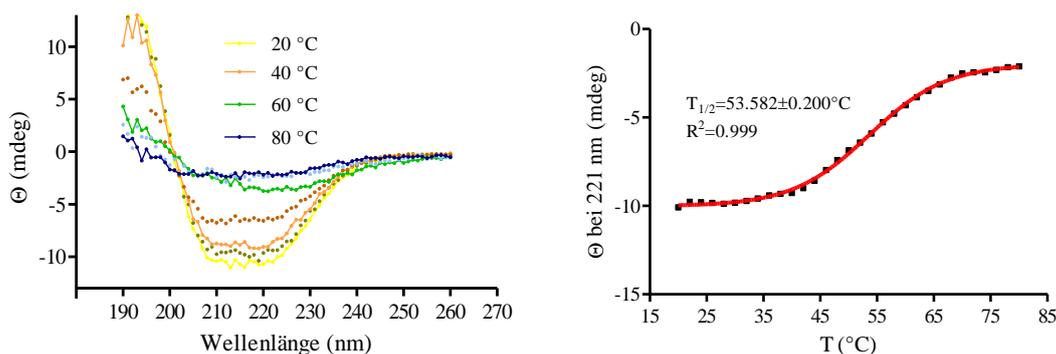


Abb. 46: (links) Fern-UV-CD-Spektren der His₆-*rh*PIMT bei verschiedenen Temperaturen. 0.1 mg/mL His₆-*rh*PIMT wurden in reinem Wasser bei Temperaturen zwischen 20 und 80 °C mittel Fern-UV-CD gemessen. **(rechts)** CD-Signal bei 221 nm ein Messpunkt je Grad Celsius. Bei 221 nm weisen die CD-Spektren mit zunehmender Temperatur die größten Unterschiede auf, daher wurde diese Wellenlänge für die Bestimmung der thermischen Stabilität ausgewählt. Der sigmoide Verlauf des Temperaturüberganges der His₆-*rh*PIMT wurde nach Boltzmann analysiert. Dabei wurde unter den verwendeten Bedingungen ein $T_{1/2}$ von 53.6 ± 0.2 °C ermittelt.

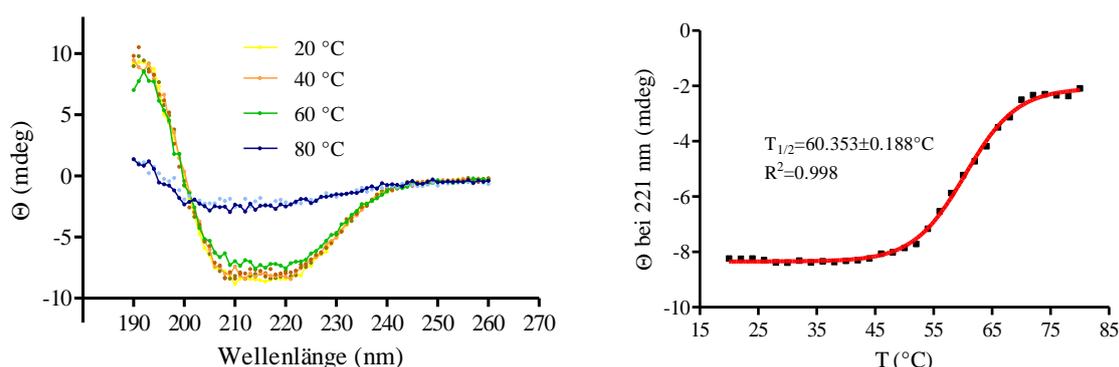


Abb. 47: (links) Fern-UV-CD-Spektren der His₆-*rm*PIMT bei verschiedenen Temperaturen. 0.1 mg/mL His₆-*rm*PIMT wurden in reinem Wasser bei Temperaturen zwischen 20 und 80 °C mittel Fern-UV-CD gemessen. **(rechts)** CD-Signal bei 221 nm ein Messpunkt je Grad Celsius. Bei 221 nm weisen die CD-Spektren mit zunehmender Temperatur die größten Unterschiede auf, daher wurde diese Wellenlänge für die Bestimmung der thermischen Stabilität ausgewählt. Der sigmoide Verlauf des Temperaturüberganges der His₆-*rh*PIMT wurde nach Boltzmann analysiert. Dabei wurde unter den verwendeten Bedingungen ein $T_{1/2}$ von 60.4 ± 0.2 °C ermittelt.

Der Vergleich zur thermischen Stabilität der His-getagten *rh*PIMT in Abb. 46 liefert einen um 3.6 °C größeres $T_{1/2}$. Dadurch lässt sich vermuten, dass die thermische Stabilität durch die sechs Histidin-Reste erhöht wird. Ansonsten unterscheiden sich die CD-Spektren in Abb. 45 (links) und Abb. 46 (links) kaum voneinander, so dass man davon ausgehen kann, dass der His-Tag nur einen sehr geringen Einfluss auf die Sekundärstruktur der PIMT hat. Unterschiede in der Aktivität konnten nicht beobachtet werden.

Ergebnisse

Abb. 47 zeigt den Temperaturübergang von His₆-*rm*PIMT. Dabei gibt es abermals einen Anstieg des T_{1/2}-Wertes um 6.8 °C im Vergleich zur His₆-*rh*PIMT. Vergleicht man Abb. 46 (links) und Abb. 47 (links) fällt auf, dass bei der His₆-*rm*PIMT die Sekundärstruktur schlagartig zwischen 60 °C und 70 °C zusammenbricht.

Sowohl die Reversibilität der thermischen Entfaltung als auch die Bildung von Aggregaten wurde während dieser Arbeit nicht untersucht. Weitere Experimente sollten dies jedoch berücksichtigen.

Ergebnisse

3.4.6 Thermodynamische Analyse der Bindung von SAM sowie SAH an PIMT mittels Isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC)

Sowohl die Höhe und die Variabilität des K_M -Wertes für SAM als auch die in der Literatur angegebene Form der Inhibierung (kompetitiv) machten eine Untersuchung mittels ITC unumgänglich. In Abb. 48 sind die Titrationskurven von SAH und His₆-*rh*PIMT (links) und SAM und His₆-*rh*PIMT (rechts) dargestellt.

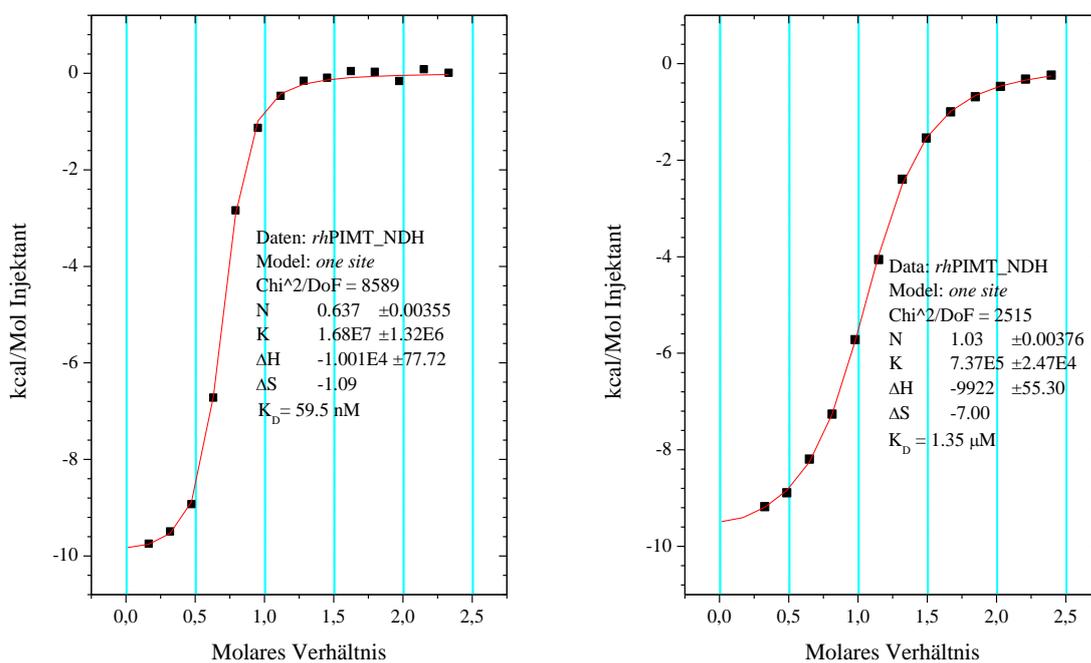


Abb. 48: (links) Titration von SAH zu His₆-*rh*PIMT. (rechts) Titration von SAM zu His₆-*rh*PIMT. Die Titrations wurden bei 20 °C und 290 rpm durchgeführt. Das molare Verhältnis von PIMT zu SAH bzw. SAM wurde gegen die benötigte Energie pro Mol Injektant aufgetragen. Der erhaltene Graph wurde nach einem *one site-Model* analysiert. Für SAH und His₆-*rh*PIMT ergibt sich ein K_D von 59.5 nM und für SAM und His₆-*rh*PIMT ergibt sich ein K_D von 1.35 μM.

Ergebnisse

Die Kurven wurden nach einem *one site-Model* analysiert. Die Analyse lieferte einen K_D von 59.5 nM für SAH an His₆-*rh*PIMT und 1.35 μ M für SAM an His₆-*rh*PIMT. Dabei fällt jedoch die Stöchiometrie von 0.637 bei der Bindung von SAH auf. Hier wäre es ratsam gewesen im Bereich der Basislinie weitere Messungen durchzuführen, um in Hinblick auf die Stöchiometrie eine bessere Analyse anfertigen zu können.

Ähnliche Beobachtungen wurden für die Bindung von SAH an His₆-*rm*PIMT und SAM an His₆-*rm*PIMT gemacht. Die Titrationskurven sind in Abb. 49 dargestellt. Hier konnte ein K_D von 42.5 nM für die Bindung von SAH an PIMT und 2.12 μ M für die Bindung von SAM an PIMT ermittelt werden. Dabei fällt wieder die Stöchiometrie von 0.342 bei der Bindung von SAH an PIMT auf, wohingegen die Stöchiometrie bei der Bindung von SAM an PIMT mit 0.97 nahezu ideal ist.

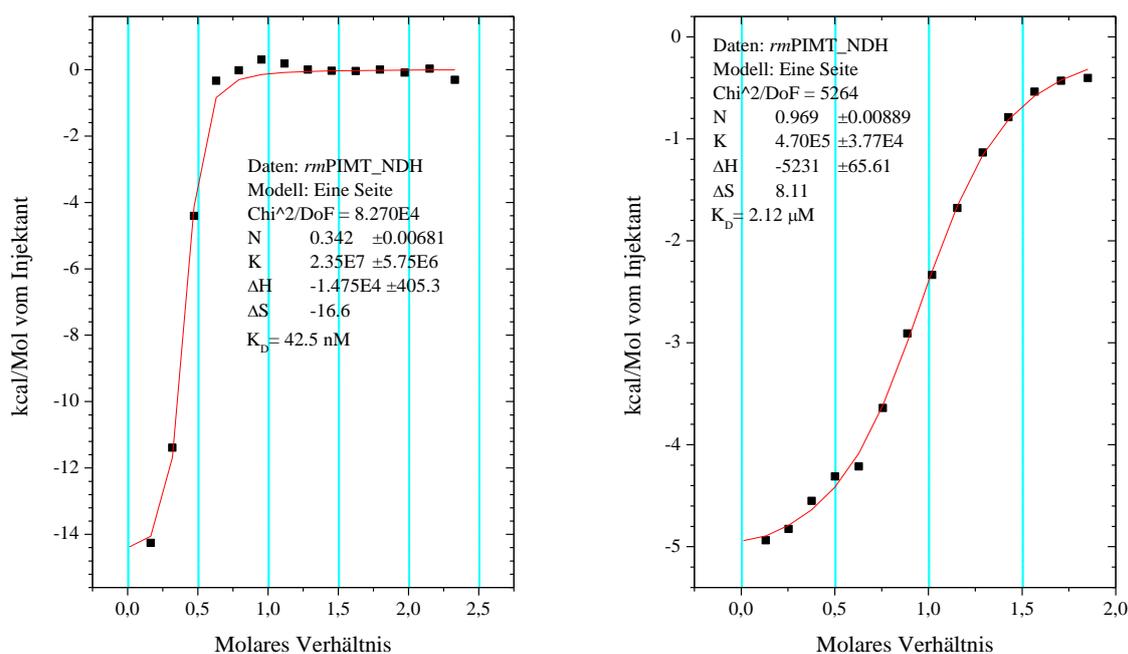


Abb. 49: (links) Titration von SAH zu His₆-*rm*PIMT. (rechts) Titration von SAM zu His₆-*rm*PIMT. Die Titrationsen wurden bei 20 °C und 290 rpm durchgeführt. Das molare Verhältnis von PIMT zu SAH bzw. SAM wurde gegen die benötigte Energie pro Mol Injektant aufgetragen. Der erhaltene Graph wurde nach einem *one site-Model* analysiert. Für SAH und His₆-*rm*PIMT ergibt sich ein K_D von 42.5 nM und für SAM und His₆-*rm*PIMT ergibt sich ein K_D von 2.12 μ M.

Ergebnisse

3.5 Lokalisierungsstudien von PIMT mittels RT-PCR, *Western Blot*-Analyse und Fluoreszenzmikroskopie

3.5.1 Zelluläre und Subzelluläre Lokalisation von PIMT

PIMT ist ein ubiquitär vorkommendes Enzym, jenes konnte bereits durch mehrere Arbeitsgruppen gezeigt werden. Die Probiobdrug AG arbeitet im Bereich der Alzheimer-Forschung. Erste Verbindungen zwischen dem Entstehen der Krankheit Alzheimer und dem Auftreten der posttranslationalen Modifikation isoAsp konnten bereits durch mehrere wissenschaftliche Gruppen aufgezeigt werden (siehe Einleitung). Nun stellte sich die Frage, ob isoAsp im APP repariert werden kann bzw. ob PIMT und APP überhaupt in räumliche Nähe gelangen. Hierfür wurden die Lokalisierungsstudien durchgeführt.

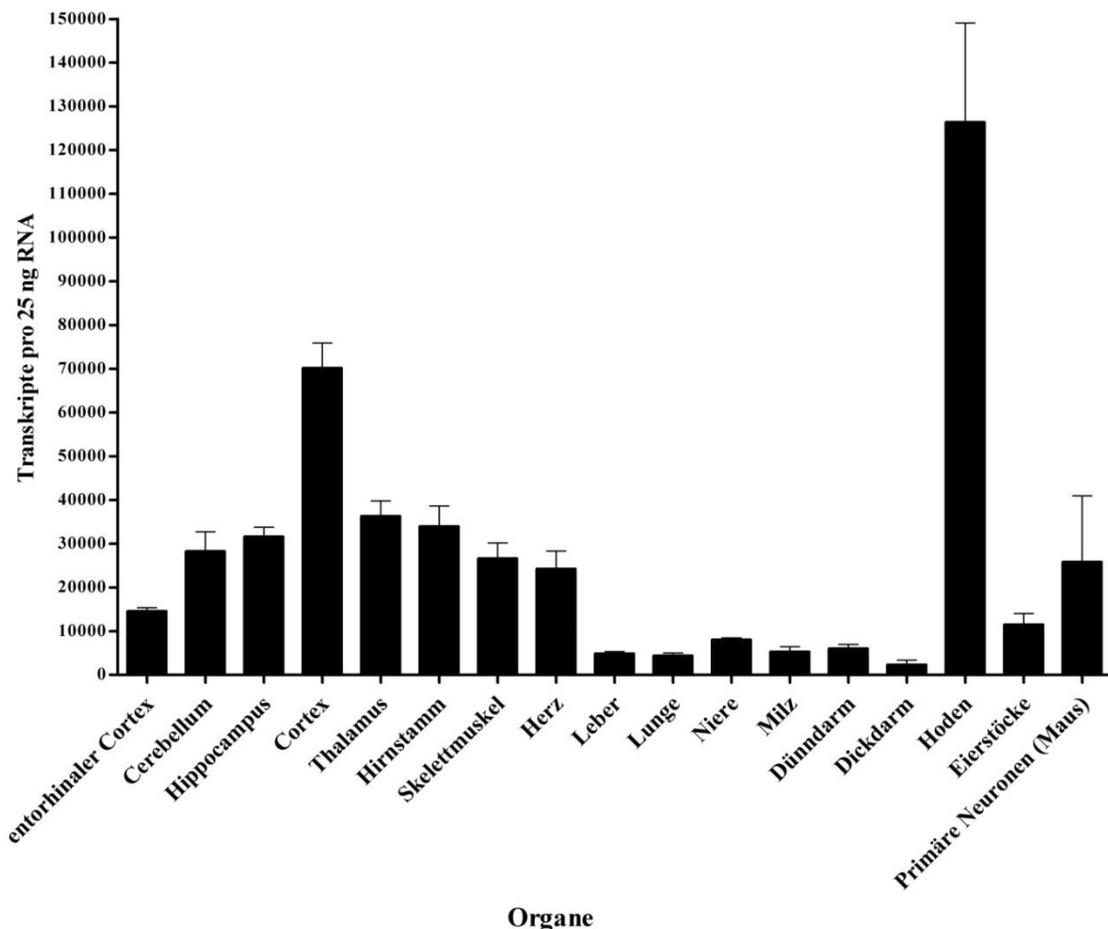


Abb. 50: mRNA-Konzentration in verschiedenen Mausorganen, muriner Hirnareale und primärer Neuronen aus der Maus (Linie C57BL6/N). Nach der PCR-Analyse zeigten sich besonders große Konzentrationen PIMT-mRNA im Gehirn, der Muskulatur und den Hoden.

Ergebnisse

Zur Vervollständigung dieser Promotionsarbeit wurden die Organe von sechs Mäusen (Linie C57BL6/N) sowie primäre Neuronen aus Mausfeten auf ihre PIMT-Expression hin untersucht. Wie erwartet, konnte in allen Organen PIMT-mRNA detektiert werden. Dabei zeigten sich besonders hohe Konzentrationen in den Hoden und im Gehirn. Die Ergebnisse sind in Abb. 50 graphisch dargestellt.

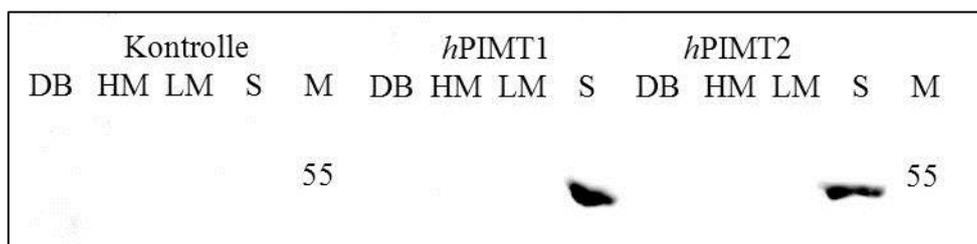


Abb. 51: Western Blot-Analyse zur Charakterisierung der subzellulären Lokalisation von humaner PIMT mit EGFP-tag in HEK 293-Zellen. Legende: M = Proteinmarker (Fermentas), DB = *debris* (Zellfragmente), HM = *heavy membrane*, LM = *light membrane*, S = *soluble*. Sowohl die Isoform 1 als auch die Isoform 2 der humanen PIMT wurden ausschließlich in der cytosolischen Fraktion detektiert.

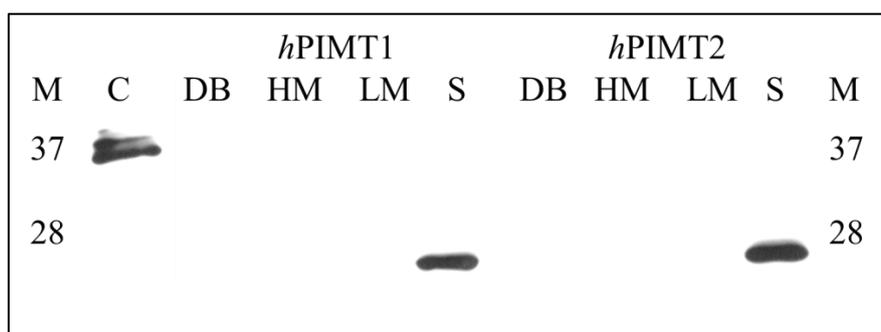


Abb. 52: Western Blot-Analyse zur Charakterisierung der subzellulären Lokalisation von humaner PIMT mit C-terminalem FLAG-tag in HEK293-Zellen. Legende: M = Proteinmarker (Fermentas), DB = *debris* (Zellfragmente), HM = *heavy membrane*, LM = *light membrane*, S = *soluble*, C = hQC mit FLAG-tag (Kontrolle des FLAG-Antikörpers). Sowohl die Isoform 1 als auch die Isoform 2 der humanen PIMT wurden ausschließlich in der cytosolischen Fraktion detektiert.

In Abb. 51 kann man erkennen, dass sich das PIMT-EGFP-Fusionsprotein ausschließlich in der cytosolischen Fraktion des fraktionierten Zellaufschlusses befindet. Als Kontrolle wurde das Plasmid pcDNA3.1, auf dessen Basis der PIMT-Expressionsvektor generiert wurde, in die HEK293-Zellen transfiziert und ebenfalls fraktioniert aufgeschossen. PIMT und EGFP haben ein Molekulargewicht von 52 kDa (24.6 kDa + 26.9 kDa), damit migriert das Fusionsprotein etwas unter dem 55 kDa-Marker auf der richtigen Höhe. Bestätigt wird diese Beobachtung durch FLAG-markierte PIMT, in welcher die Lokalisierung der beiden Isoformen mit C-

Ergebnisse

terminalen FLAG-tag mittels fraktioniertem Zellaufschluss und *Western Blot*-Analyse gezeigt werden konnte (Abb. 52). Auch hier können beide Proteine ausschließlich im Cytosol beobachtet werden. Demnach hat die ER-Retentionssequenz der Isoform 2 offenbar keinen Einfluss auf die zelluläre Lokalisation.

3.5.2 Lokalisierungsstudien mittels Immunfluoreszenz

Nachdem in der Literatur viele PIMT-Substrate aus dem Cytosol und dem Zellkern publiziert wurden, sollte nun auch die Lokalisierung der humanen PIMT und genauer die (unterschiedliche) Lokalisierung der beiden Isoformen zellbiologisch untersucht werden. Mit Hilfe des fraktionierten Zellaufschlusses mit anschließender *Western Blot*-Analyse konnten bereits erste Hinweise auf die Lokalisierung der PIMT entdeckt werden. Nun wurden die Fusionsproteine aus Isoform 1 der humanen PIMT oder Isoform 2 der humanen PIMT mit dem eukaryotischem grünfluoreszierenden Protein (EGFP) in humanen Glioblastoma-Astrocyten (LN-405) transfiziert und anschließend mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Hier sollte die Verteilung der PIMT durch Fluoreszenz visualisiert werden bzw. sollten Co-Lokalisierungen mit bestimmten Kompartiment-Marker-Proteinen (zum Bsp.: ER) realisiert werden und auch mit APP. Abb. 53 zeigt die Verteilung des Fusionsproteins aus PIMT Isoform 1 und EGFP. Dabei kann das Fusionsprotein sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma beobachtet werden. Hier fallen cytoskelettähnliche Strukturen auf. Diese Beobachtung konnte auch durch andere Kollegen der Arbeitsgruppe bestätigt werden (Cynis & Lommatzsch, unveröffentlicht). Auch die Isoform 2 der humanen PIMT, wie in Abb. 54 dargestellt, kann als Fusionsprotein in der ganzen Zelle, inklusive innerhalb des Zellkerns, beobachtet werden. Auch hier kann eine cytoskelettähnliche Struktur erkannt werden. Jedoch gibt es auch hier, wie in der *Western Blot*-Analyse, keinerlei Hinweise auf eine Retention im Endoplasmatischen Retikulum.

Für die Isoform 1 der humanen PIMT konnte die zelluläre Verteilung auch in Fibroblasten der Niere der grünen Meerkatze (COS-7-Zellen, Abb. 55) gezeigt werden. Diese zeigt in COS-7-Zellen die gleiche Verteilung wie in LN-405-Zellen (Abb. 53). Das Fusionsprotein kann sowohl im Zellkern als auch im Rest der Zelle beobachtet werden. Auch hier können wieder cytoskelettartige Strukturen vermutet werden.

Ergebnisse

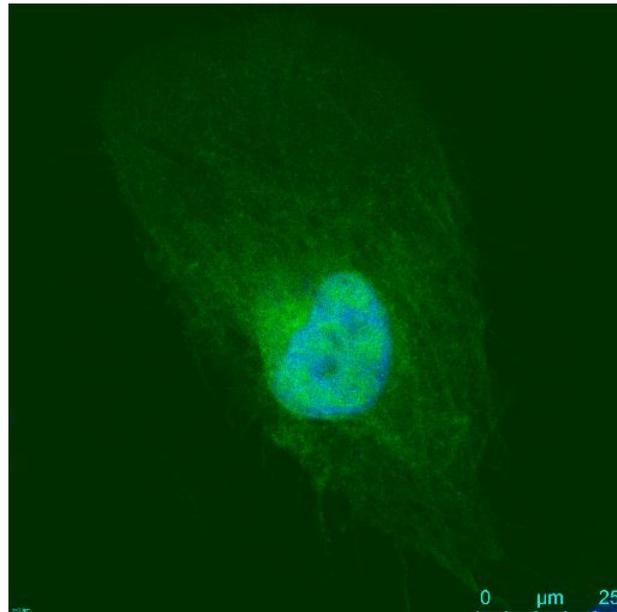


Abb. 53: *hPIMT1-EGFP* in LN-405-Zellen. Abgebildet sind die Eigenfluoreszenz des EGFP (grün) und der angeregte DAPI-Farbstoff (blau). Man kann deutlich erkennen, dass sich das Fusionsprotein sowohl im Cytosol als auch im Kern (blau) befindet. Es lässt sich vermuten, dass das Fusionsprotein Interaktionen mit Proteinen des Cytoskeletts eingeht. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe eines konfokalen *laser-scanning*-Mikroskops angefertigt.

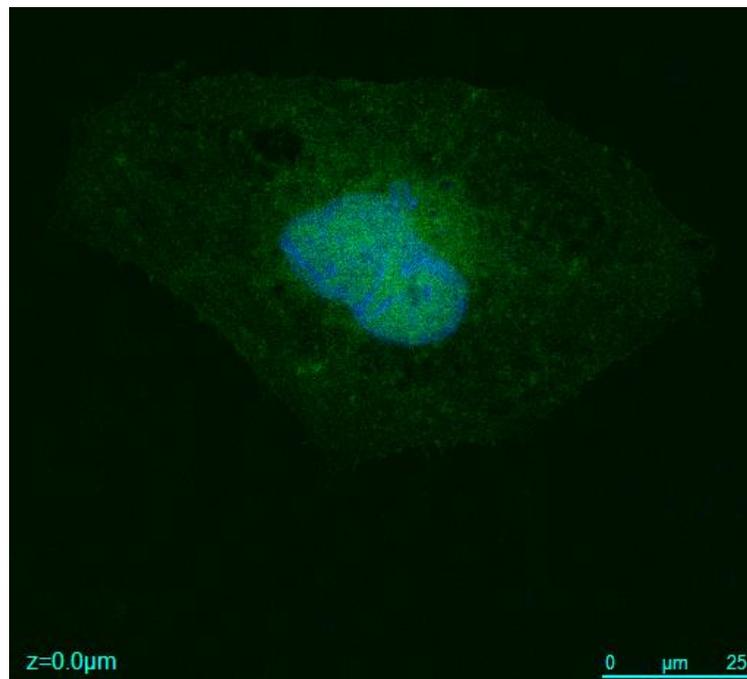


Abb. 54: *hPIMT2-EGFP* in LN-405-Zellen. Abgebildet sind die Eigenfluoreszenz des EGFP (grün) und der angeregte DAPI-Farbstoff (blau). Man kann deutlich erkennen, dass sich das Fusionsprotein sowohl im Cytosol als auch im Kern (blau) befindet. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe eines konfokalen *laser-scanning*-Mikroskops angefertigt.

Ergebnisse

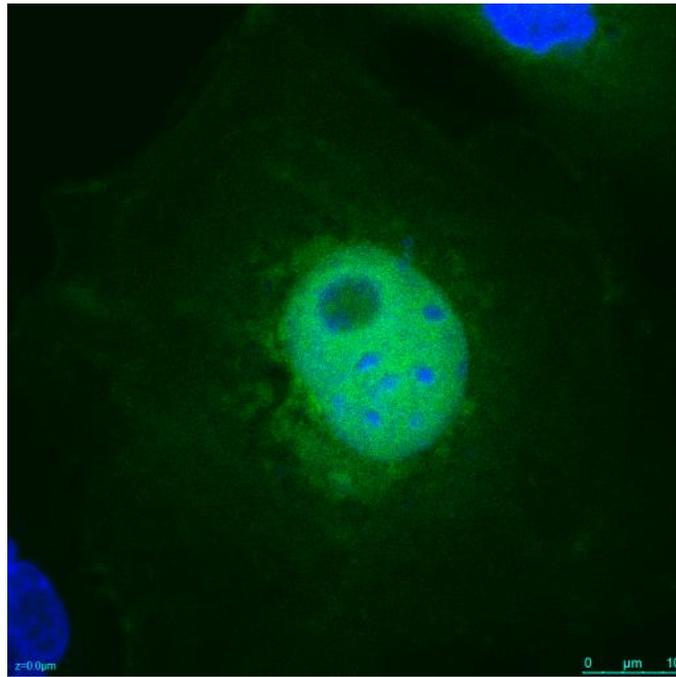


Abb. 55: *hPIMT1-EGFP* in COS-7-Zellen. Abgebildet sind die Eigenfluoreszenz des EGFP (grün) und der angeregte DAPI-Farbstoff (blau). Man kann deutlich erkennen, dass sich das Fusionsprotein sowohl im Cytosol als auch im Kern (blau) befindet. Auch in COS-7-Zellen lässt sich vermuten, dass das Fusionsprotein Interaktionen mit Proteinen des Cytoskeletts eingeht. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe eines konfokalen *laser-scanning*-Mikroskops angefertigt.

Aus zeitlichen Gründen konnte leider bis zum Abschluss der praktischen Arbeiten zur Promotionsarbeit keine Colokalisation von APP und PIMT in Zellkultur untersucht werden.

Diskussion

4. Diskussion

Alzheimer ist eine Krankheit, die vermutlich viele unterschiedliche Ursachen hat. Man nimmt an, dass eine Ursache davon die Ablagerung von A β ist bzw. lösliche toxische A β -Oligomere sein können. Nachdem nicht nur in den A β -Fibrillen N-terminales isoAsp detektiert werden konnte (Saido et al. 1996), sondern auch innerhalb des *amyloid precursor protein* isoAsp identifiziert und als Ursache verstärkter alternativer Prozessierung durch Cathepsin B ausgemacht werden konnte (Böhme et al. 2008b; Böhme et al. 2008a), stellte sich die Frage, ob isoAsp am freien N-Terminus von A β entstehen kann. Der N-Terminus vieler Peptide und Proteine kann Ziel posttranslationaler Modifikationen sein. In Eukaryoten wird dieser häufig durch Acetyltransferasen acetyliert, der N-Terminus kann aber auch myristyliert, palmityliert oder es kann Pyroglutamat aus N-terminalem Glutamin oder Glutamat gebildet werden. Alle diese posttranslationalen Modifikationen haben gemeinsam, dass sie durch Enzyme katalysiert werden. Im Gegensatz dazu ist die Bildung von N-terminalem isoAsp eine spontane Reaktion, die nach der Deamidierung von Asparagin oder durch Isomerisierung von Asparaginsäure abläuft. Momentan wird angenommen, dass die Bildung von N-terminalem isoAsp *in vivo* und *in vitro* gar nicht oder sehr langsam verläuft. In dieser Promotionsarbeit wurden unter anderem die Geschwindigkeit und der Mechanismus der N-terminalen isoAsp-Bildung aus Asparagin und Asparaginsäure untersucht, um Rückschlüsse auf A β -Ablagerungen mit N-terminalem isoAsp ziehen zu können.

Die bisherigen Analysen von isoAsp innerhalb der Peptidkette wurden durch die Trennung von Produkt und Substrat mittels HPLC (Stephenson, Clarke 1989; Patel, Borchardt 1990; Aswad et al. 2000; Capasso et al. 1993) durchgeführt oder, wie in kürzlich veröffentlichten Arbeiten beschrieben, durch den Abbau der Proteine und Peptide durch die Endoprotease Asp-N mit anschließender Analyse durch ETD-Massenspektrometrie (Sargaeva et al. 2011; Ni et al. 2010). Da diese Methoden nicht in der Lage sind Peptide mit N-terminalem isoAsp zu trennen, haben wir, als erste Arbeitsgruppe die CE-UV genutzt, um die verwendeten Modellpeptide zu analysieren. Dabei wurden die unterschiedlichen pK_a-Werte der Carboxylgruppe der Seitenkette von Asp und isoAsp unter sauren pH-Bedingungen ausgenutzt. Das Grundprinzip der Trennung beruht dabei auf der unterschiedlichen Nettogesamtladung des Peptides. So konnte man in einem pH-Bereich von 2-3 nicht nur N-terminale Asn-, Asp- und isoAsp-Peptide mittels CE-UV trennen und detektieren, sondern auch Peptide mit einem Asn, Asp oder isoAsp innerhalb der Peptidkette. Somit konnte man

Diskussion

direkte Vergleiche zwischen der N-terminalen isoAsp-Bildung und der isoAsp-Bildung innerhalb der Peptidkette aufstellen. Mit den benutzten Parametern konnten die Modellpeptide innerhalb von acht Minuten analysiert werden, wobei nur 5 µl Probe injiziert werden musste. Damit bietet diese neu eingeführte CE-Methode die Möglichkeit Asx-Isomerisierung zuverlässig und kostengünstig zu analysieren, wodurch sich auch Optionen für andere Versuchsaufbauten, wie die Reparatur von isoAsp-Stellen in Peptiden und Proteinen durch PIMT, ergeben. Weitere Vorteile der Methode sind die geringe Probenaufbereitung und der Verzicht auf radioaktiv-markierte Komponenten. Ein Nachteil ist die begrenzte Länge der trennbaren Peptide, da mit steigendem Molekulargewicht die Trennung erschwert wird.

Die isoAsp-Bildung am N-Terminus findet unter physiologischen pH-Bedingungen statt. Die berechneten Halbwertszeiten bei diesem pH-Wert liegen zwischen 79 Tagen für die A β -Sequenz DAEF und 140 min für D_(OMe)GEF. Obwohl wir für NGEF im Vergleich zum _(Ac)NGEF und AANGF eine beschleunigte isoAsp-Bildung beobachten konnten, liegen die Halbwertszeiten im Rahmen von Beobachtungen vieler anderer Peptide und Proteine (Stephenson, Clarke 1989; Geiger, Clarke 1987). Hier wurden Halbwertszeiten von 1-100 Tage für Asparagin und 40-300 Tage für Asparaginsäure in Abhängigkeit von der Aminosäuresequenz ermittelt. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen sind Asx-Gly-Sequenzen schnell isomerisierende Bereiche in Proteinen oder Peptiden. Daher ist anzunehmen, dass die N-terminale isoAsp-Bildung und isoAsp-Bildung innerhalb der Peptidkette den gleichen Bedingungen und dem gleichen Mechanismus folgen. Dieser Schluss konnte ebenfalls durch unsere initialen mechanistischen Untersuchungen bestätigt werden. Die Daten zeigen eine unterschiedliche pH-Abhängigkeit der Isomerisierungsreaktion von Asn und Asp. Im Vergleich dazu bedingt die Modifizierung von Asp, wie in D_(OMe)GEF, eine ähnliche pH-Abhängigkeit wie Asn. Folglich ist die Isomerisierungsgeschwindigkeit generell abhängig von der Elektrophilie des β -Carbonylkohlenstoffes. Gleichmaßen ist die Seitenkette von Asp bei einem pH-Wert unter 3 protoniert, wodurch die Elektrophilie und somit die Bildung des Succinimidyl-Intermediates begünstigt wird. Die signifikante Beschleunigung der isoAsp-Bildung beim D_(OMe)GEF und die pH-Abhängigkeiten sind konsistent mit einer geschwindigkeitsbestimmenden Bildung des Succinimidyl-Intermediates, welches sowohl beim NGEF und DGEF als auch beim D_(OMe)GEF auf die gleiche Weise gebildet wird. Weiterhin wird angenommen, dass die Deprotonierung des angreifenden Stickstoffes bei pH < 3 möglicherweise für die Gesamtreaktion geschwindigkeitsbestimmend sein könnte (Capasso et al. 1993). Die kinetischen Isotopieeffekte und die beiden *proton inventories* in diesem Teil der Promotionsarbeit unterstützen diese Annahme. Die nahezu

Diskussion

identische Größe der Isotopieeffekte und die parallelen Anstiege der *proton inventories* von NGEF und $D_{(OMe)}GEF$ bekräftigen die Annahme, dass ein Proton im *transition state* übertragen wird. Darüber hinaus ist die Beobachtung eines geschwindigkeitsbestimmenden Protonentransfers nicht überraschend, da für viele beschriebene Acyltransferreaktionen ein solcher Faktor ermittelt wurde (Barnett, Jencks 1969; Cox, Jencks 1978; Satterthwait, Jencks 1974). Es bleibt jedoch weiterhin unklar, ob N-terminales isoAsp die Funktion von Proteinen in der gleichen Weise beeinflusst wie isoAsp innerhalb der Peptidkette (Velazquez et al. 1997; Weber, McFadden 1997; Corti, Curnis 2011; George-Nascimento et al. 1990). Wenn man die Halbwertszeiten der N-terminalen isoAsp-Bildung von Tagen bis Monaten betrachtet, ist der Lebenszyklus der meisten Proteine vermutlich zu kurz, um N-terminales isoAsp in messbaren Konzentrationen zu bilden (Varshavsky 1996). Im Gegensatz dazu wurden A β -Peptide mit N-terminalem isoAsp oder isoAsp innerhalb der Peptidkette im extrazellulären Raum beschrieben, vermutlich weil sie kaum oder gar nicht abgebaut wurden (Lowenson, Clarke 1990; Saido et al. 1996; Roher et al. 1993). Das ist konsistent mit den ermittelten biochemischen Eigenschaften und der zellulären Verteilung von PIMT. Bisherige Untersuchungen der Substratspezifität der PIMT lassen darauf schließen, dass die „Reparatur“ von isoAsp stark von der Größe und der Primärsequenz des Substrates abhängig ist (Lowenson, Clarke 1990; Lowenson, Clarke 1991). Zum Beispiel konnten wir für das Substrat $D_{iso}AEF$ nur eine geringe Affinität der PIMT beobachten (Tab.7). Weiterhin konnten verschiedene Studien PIMT hauptsächlich in intrazellulären Kompartimenten zeigen, möglicherweise wird es auch im Endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten (Potter et al. 1992; MacLaren et al. 1992; Lowenson et al. 1994). Daraus ergibt sich, dass extrazelluläres A β möglicherweise der Reparatur durch PIMT entgehen kann (Lowenson et al. 1994). Neben der isoAsp-Bildung wurden auch andere posttranslationale Modifikationen von A β beschrieben (He, Barrow 1999; Kummer et al. 2011; Schilling et al. 2006). Von diesen wecken N-terminal verkürzte und zu Pyroglutamat (pE) cyclisierte A β -Spezies (A β 3pE-42) aufgrund ihrer Tendenz zur Aggregation und ihrer Oligomer-Toxizität vermehrt Interesse (Schilling et al. 2008; Schlenzig et al. 2009; Nussbaum et al. 2012). Verglichen mit der spontanen pE-Bildung am N-Terminus von A β mit einer Halbwertszeit um die 10 Jahre bei pH 7 (Seifert et al. 2009), ist die spontane isoAsp-Bildung am N-Terminus des A β -Modellpeptides DAEF (A β 1-4) bei neutralem pH mit einer Halbwertszeit von 78 Tagen eher schnell. Im Gegensatz zur isoAsp-Bildung konnte für die Bildung von pE *in vivo* ein Enzym, die Glutaminylcyclase, ausgemacht werden (Schilling et al. 2008; Schilling et al. 2004). Folglich können die Ergebnisse dieser Promotionsarbeit mit einer spontanen N-terminalen

Diskussion

isoAsp-Bildung nach der Ablagerung von A β im Krankheitsbild von Alzheimer in Einklang gebracht werden. Es sollte jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass frühere Untersuchungen zeigen konnten, dass isoAsp-Modifikationen im A β -Vorläufer-Protein (APP) den Umsatz und die Freisetzung von A β beeinflussen können (Böhme et al. 2008b; Böhme et al. 2008a). Dieser Befund wird durch weitere epidemiologische Studien ergänzt, die zeigen, dass die Primärsequenz um die *β -secretase cleavage site* eine entscheidende Rolle für die Bildung des N-Terminus von A β spielt (Haass et al. 1995; Difede et al. 2009; Jonsson et al. 2012). Damit kann nicht ausgeschlossen werden, dass zu mindestens teilweise bereits vor der Ablagerung von A β isoAsp entsteht, welches, wie beschrieben, zelluläre Abläufe beeinflussen kann. Zusammengefasst wurde in diesem Teil der Promotionsarbeit zum ersten Mal eine quantitative Analyse zur isoAsp-Bildung am N-Terminus von Modellpeptiden durchgeführt. Diese wurde durch den Einsatz der CE-UV zur Trennung und Quantifizierung von Substrat und Produkt ermöglicht. Die ermittelten Halbwertszeiten zur isoAsp-Bildung am N-Terminus von Asx-Peptiden waren im Vergleich zur Bildung innerhalb der Peptidkette kürzer, jedoch immer noch innerhalb der Halbwertszeiten, welche in anderen Studien veröffentlicht wurden. Durch die hier generierten Daten können weitere Rückschlüsse auf das Vorhandensein von N-terminalem isoAsp bei abgelagerten amyloiden Peptiden gezogen werden und möglicherweise auch auf eine Vielzahl anderer Proteine, welche eine höhere Lebensspanne haben oder für längere Zeit gelagert werden, wie zum Beispiel Antikörper oder Medikamente auf Proteinbasis.

Methyltransferasen (EC 2.1.1.X) haben eine wichtige Funktion in einer Vielzahl von biologischen Prozessen. Sie methylieren DNA, kleine Moleküle, Polysaccharide, Lipide und Proteine, und dabei setzen viele den Cofaktor *S*-Adenosyl-L-methionin (SAM) als Methylgruppendonator um. Aufgrund dieser Diversität, führt eine Fehlregulation oder strukturelle Veränderung dieser Proteine meist zu verschiedenen Krankheitsbildern. Umso wichtiger ist die Erforschung dieser Enzymgruppe und umso bessere Analysemethoden werden benötigt. Dazu gehört auch ein schneller und valider Aktivitätsassay. Die momentan zur Verfügung stehenden PIMT-Aktivitätsassays benutzen den Cofaktor SAM oder das entstehende Methanol um die Aktivität der PIMT durch Radiographie, UV/Vis-Detektion oder Fluoreszenz messbar zu machen. Dieser Teil der Promotionsarbeit beschreibt einen neuen Ansatz der Detektion der PIMT-Aktivität, bei dem das Produkt der PIMT-vermittelten Reaktion nach APN-Abbau durch Fluoreszenz quantifiziert wird. Dabei konnten neue Einblicke auf die Effektivität der PIMT-Reaktion gewonnen und eine weitere biochemische Charakterisierung der PIMT durchgeführt werden. Der hier vorgestellte Aktivitätsassay beruht

Diskussion

darauf, dass die APN nicht in der Lage ist Isopeptidbindungen zu spalten. Somit konnten Ansätze mit isoAsp-Peptiden, SAM und PIMT dazu benutzt werden, die PIMT-Aktivität durch zeitabhängige Probenentnahme zu bestimmen. Parallel konnte die Menge an entstehendem SAH durch einen modifizierten HPLC-UV-Assay nach Schurter & Aswad (Schurter, Aswad 2000) bestimmt werden. Dadurch war es möglich alle AMC-Substrate mit zwei verschiedenen Methoden zu untersuchen. Dabei wurden nahezu identische K_M -Werte für die Substrate $ARD_{iso}A-AMC$ (60 & 64 μM), $AAD_{iso}A-AMC$ (78 & 73 μM) und $AAAD_{iso}A-AMC$ (62 & 62 μM) ermittelt. Bei Verwendung des PIMT-Substrates $AED_{iso}A-AMC$ konnte sogar eine dritte Methode, CE-UV, benutzt werden, um den APN-gekoppelten PIMT-Aktivitätsassay zu validieren. Wie in Tab. 6 veranschaulicht liefern die K_M -Bestimmungen per APN-gekoppelten Assay, per HPLC-UV und per CE-UV mit 62, 67 und nochmal 62 μM nahezu identische K_M -Werte. Diese liegen auch im Bereich von anderen endogenen PIMT-Substraten, wie HPr-2 (isoAsp-12, -38) mit 197 μM und Ovalbumin mit 30 μM (Brennan et al. 1994; Thapar, Clarke 2000), welche mit Hilfe des radioaktiven *vapor-diffusion-assays* nach Lowenson & Clarke bei 37 °C und pH 7.4 bestimmt wurden (Lowenson, Clarke 1990). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass der APN-gekoppelte PIMT-Aktivitätsassay valide ist. Zur weiteren Überprüfung der Validität des APN-gekoppelten PIMT-Aktivitätsassays wurde das pH- und das Temperaturoptimum der durch PIMT vermittelten Reaktion zusammen mit zwei weiteren voneinander unabhängigen Methoden bestimmt. Dabei konnte ein optimaler pH-Wert von circa 9.5 und ein Temperaturoptimum von 46 °C ermittelt werden. Interessanterweise liegen diese Werte nicht im physiologischen Bereich, sondern entsprechen extremen Situationen in der Zelle. Passend hierzu steigt, wie im ersten Abschnitt dieser Promotionsarbeit gezeigt, im basischen pH-Bereich die Bildung von isoAsp an, wodurch vermehrt beschädigte Proteine und somit Substrate für die PIMT entstehen. Daher ist es sinnvoll, wenn gleichzeitig die Aktivität des Reparatursystems steigt. Im Fall des Temperaturoptimums verhält es sich ähnlich. Dieses liegt mit 46 °C weit über dem physiologischen Wert von 37 °C. Auch hier werden bei erhöhter Temperatur vermehrt beschädigte Proteine generiert, die repariert werden müssen. Demnach kommt der PIMT eine Funktion als Hitzeschockprotein zu. Diese Funktion konnte auch für *E.coli* gezeigt werden, das bei wiederholten Stresssituationen auf das Vorhandensein der PIMT angewiesen ist (Kindrachuk et al. 2003; Hicks et al. 2005; Kern et al. 2005). In der Pflanze *Arabidopsis thaliana*, die normalerweise zwischen 16-25 °C wächst, konnte auch ein Aktivitätsmaximum der PIMT bei 50 °C bestimmt werden, indem die Pflanze nach längerer Exposition bei höheren, nicht letalen Temperaturen kurzzeitig letalen Temperaturen über 45 °C ausgesetzt

Diskussion

wurde (Villa et al. 2006). Auch hier vermuten die Autoren, dass PIMT zu einem Stressabwehrsystem der Pflanze gehört. Die doppelt gewundene $\alpha/\beta/\alpha$ -sandwich-Struktur der PIMT, wie in Abb. 10 gezeigt, zeichnet sich durch mehrere α -Helices und β -Faltblätter aus. Das konnte durch die Messungen im Fern-UV-Bereich des CD-Spektrometers bestätigt werden (Abb. 45-47). Darüber hinaus konnte die Verfolgung der Änderung der Sekundärstruktur der PIMT benutzt werden, um die Temperaturstabilität von drei PIMT-Konstrukten (humane PIMT, nativ; humane PIMT mit His-tag; murine PIMT mit His-tag) zu bestimmen. Hier konnte ein mittlerer Temperaturübergang von 50 °C für das native humane Protein bestimmt werden (Abb. 45). DeVry *et al.* konnten das ebenfalls bereits 1999 zeigen (DeVry, Clarke 1999). Die Stabilität konnte durch den His-tag um weitere 3 °C gesteigert werden (Abb. 46). Das murine Protein hat sogar eine um 10 °C erhöhte Stabilität (Abb. 47). Hier liegen in der Literatur keine Vergleichswerte vor. Allerdings passen die ermittelten Stabilitätstemperaturen zu dem beobachteten Temperaturoptimum der humanen PIMT, was die Beobachtung zum Temperaturoptimum der durch PIMT katalysierten Reaktion bekräftigt. Weiterhin konnte mit Hilfe des APN-gekoppelten PIMT-Aktivitätsassays der K_M von SAM bestimmt werden. Dabei stellte sich heraus, dass der K_M stark von der Konzentration des isoAsp-Substrates abhängig ist. Bei einer isoAsp-Substratkonzentration von 250 μM wurde dabei ein K_M für SAM zwischen 259 – 268 μM und bei einer isoAsp-Substratkonzentration von 60 μM zwischen 116 – 118 μM bestimmt, sowohl durch den APN-gekoppelten PIMT-Aktivitätsassay als auch mittels SAH-Quantifizierung durch HPLC-UV. In der Literatur sind K_M -Werte zwischen 2 – 2.2 μM publiziert, die damit deutlich niedriger liegen (Ichikawa, Clarke 1998; Thapar, Clarke 2000; Thapar et al. 2002). Auch diese Werte wurden mittels radioaktiven *vapor-diffusion-assay* bestimmt. Interessanterweise stimmen diese mit den von uns bestimmten K_D -Werten für SAM und PIMT zwischen 1.35 – 2.12 μM (Abb. 48 & Abb. 49) überein. Lowenson und Clarke benutzten bei ihren Bestimmungen hochaffine PIMT-Substrate ($K_M < 20 \mu\text{M}$). Vermutlich gelang ihnen deshalb eine K_M -Bestimmung für SAM, die am K_D -Wert desselbigen liegt. Wir vermuten, dass sich die beiden Substrate bei der Bindung behindern, da der K_M größer wird, gleichzeitig steigt jedoch auch die Umsatzgeschwindigkeit des einzelnen Substrates. Das an PIMT gebundene Substrat oder Cosubstrat begünstigt also die Katalyse des anderen. Nach Smith *et al.* läuft die PIMT-Reaktion nach einem geordneten sequentiellen Mechanismus ab. (1) Übertragung der Methylgruppe (2) Freilassung des methylierten isoAsp-Restes (3) Konformationsänderung um das SAH freizusetzen (4) Bindung von neuem SAM-Substrat (5) Rückbildung der Konformation (6) Bindung von neuem isoAsp-Substrat (Smith et al. 2002). Möglicherweise wird der Austausch der

Diskussion

verbrauchten Substrate durch das Vorhandensein einer größeren Konzentration unverbrauchter Substrate durch die Reduzierung der Produkthemmung begünstigt und damit auch die Umsatzgeschwindigkeit. Um diese Hypothese zu bestätigen, müssen jedoch noch weitere Experimente durchgeführt werden. Bei ihren Untersuchungen stellten Lowenson und Clarke auch fest, dass PIMT bei der Reparaturreaktion mit 6 Resten interagiert ($\text{isoAsp}^{-2} - \text{isoAsp}^{+3}$) (Lowenson, Clarke 1991). Ein Modell der Substraterkennung der PIMT ist in Abb. 56 dargestellt. Besonders einflussreich sind dabei die Positionen isoAsp^{-1} , isoAsp^{+1} und isoAsp^{+2} . Das erklärt auch, weshalb D_{isoAEF} mit einem K_M von $3533 \mu\text{M}$ ein wenig affines PIMT-Substrat ist und den mehr als dreimal so hohen K_M von AED_{isoA} ($212 \mu\text{M}$) im Vergleich zu $\text{AED}_{\text{isoA-AMC}}$ ($67 \mu\text{M}$). Nachdem wir bei der Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante für PIMT und SAM eine Konzentrationsabhängigkeit festgestellt hatten, lag eine Bestimmung der Bindungskonstante nahe. Dabei stellten wir eine wesentlich schlechtere Bindung für den Cofaktor SAM mit einem K_D von $1.35 \mu\text{M}$ für das humane Protein und $2.13 \mu\text{M}$ für das murine Protein fest. Eine starke Bindung konnte für den verbrauchten Cofaktor, SAH, mit einem K_D zwischen $40\text{-}60 \text{ nM}$ ermittelt werden, woraus sich vermutlich auch die relativ starke kompetitive Hemmung ableiten lässt. Des Weiteren konnte mit Hilfe des neuen PIMT-Aktivitätsassays ein IC_{50} für SAH von $131 \mu\text{M}$ bestimmt werden, wenn man $250 \mu\text{M}$ SAM, $100 \mu\text{M}$ $\text{AED}_{\text{isoA-AMC}}$ und $1 \mu\text{M}$ $\text{His}_6\text{-rhPIMT}$ einsetzt. Der APN-gekoppelte PIMT-Aktivitätsassay ist somit zur Bestimmung von Effektoren geeignet, die an der SAM/SAH-Bindungsstelle interagieren.

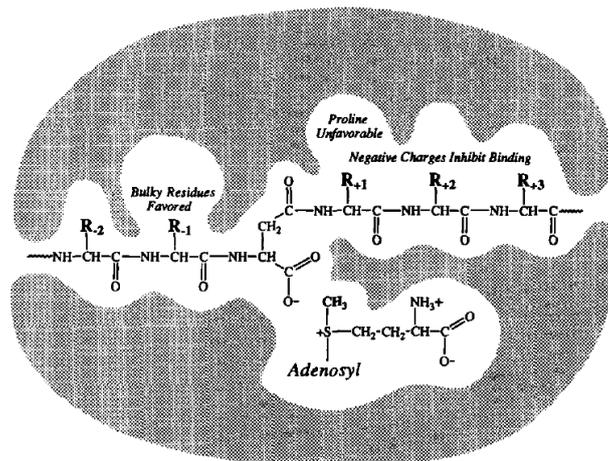


Abb. 56: Modell der isoAsp -Substraterkennung der PIMT von Lowenson & Clarke, 1991.

Im Rahmen der Assay-Validierung stellten wir eine nicht-lineare Konzentrationsabhängigkeit der PIMT-Aktivität fest, die vermutlich auf die Aggregation von PIMT zurückzuführen ist.

Diskussion

Kontrovers dazu konnten Furuchi *et al.* in ihrem HPLC-Ansatz eine Linearität bis 8 μM *hPIMT* nachweisen (Furuchi *et al.* 2009), jedoch haben sie den Umsatz nach einer Minute gegen die Konzentration *hPIMT* aufgetragen. Hierbei muss beachtet werden, dass sich nach den Daten von Furuchi *et al.* die PIMT-Reaktion in eine schnelle und eine langsame Phase unterteilt. Die schnelle Phase der Reaktion ist innerhalb einer Minute abgeschlossen und geht dann nach und nach in eine langsame Phase über, die ab fünf Minuten linear verläuft. Wohlmöglich, dass die schnelle Phase der PIMT-Reaktion linear abhängig und die langsame nicht-linear abhängig ist. Zusammengefasst konnte im zweiten Teil der Promotionsarbeit ein neuartiger, nicht radioaktiver PIMT-Aktivitätsassay etabliert und durch zwei unabhängige Methoden validiert werden. Dabei kann die Reparaturreaktion der PIMT auf ihre Effektivität hin untersucht werden, da nicht wie in den bisherigen Aktivitätstests der verbrauchte Cofaktor oder das entstehende Methanol detektiert werden, sondern das erfolgreich reparierte Substrat. Weiterhin konnte der hier beschriebene Assay benutzt werden, um die kinetischen Parameter K_M und k_{cat} für verschiedene PIMT-Substrate, den IC_{50} -Wert für SAH, sowie pH- und Temperaturoptimum der durch PIMT katalysierten Reaktion zu ermitteln. Der APN-gekoppelte PIMT-Aktivitätsassay bietet in Verbindung mit den bereits verwendeten Assays die Möglichkeit, die Effizienz der PIMT-Katalyse zu beurteilen, was im Bereich des *protein engineering*s genutzt werden könnte, um z.B. den Erfolg einer PIMT-Strukturänderung zu ermitteln. Weiterhin bietet der Assay die Möglichkeit, Effektoren der PIMT mittels Hochdurchsatzanalysen zu untersuchen, da er auf Mikrotiterplatten durchgeführt wird, die keine weiteren Sicherheitsmaßnahmen erfordern und die in automatisierten Systemen zur Anwendung kommen.

Die PIMT ist ein weit verbreitetes Enzym in Eukaryoten, Prokaryoten und sogar Archaeobakterien (Li, Clarke 1992; Griffith *et al.* 2001). Im Menschen und in der Maus kommt es ebenfalls vor. Aus diesem Grund haben wir zunächst die Organe von sechs Mäusen auf das Vorhandensein und die Menge an PIMT-mRNA mittels RT-PCR untersucht. Dabei haben wir besonders hohe Mengen in den verschiedenen Gehirnarealen, dem Herz- und Skelettmuskel und vor allem in den Hoden beobachten können. Diese Verteilung konnte teilweise durch Kim *et al.* und Boivin *et al.* bestätigt werden, die eine hohe PIMT-Aktivität im Gehirn und im Herzmuskel bzw. hohe PIMT-Konzentrationen mittels *Western Blot* im Gehirn, dem Herzen und den Hoden detektierten. Zusätzlich beobachteten Kim *et al.* im Gehirn und im Herzen von PIMT-KO-Mäuse auch hohe Konzentrationen an beschädigten Proteinen (Kim *et al.* 1997; Boivin *et al.* 1995). Die hohe Konzentration an PIMT-mRNA im Gehirn ist nur konsequent, da dort auch viele PIMT-Substrate, wie Synapsin und Tubulin,

Diskussion

lokalisiert sind (Zhu et al. 2006b). Des Weiteren ist das Gehirn auch der Ort, wo beschädigte Proteine, den meisten Schaden anrichten. So haben PIMT-KO-Mäuse eine stark verkürzte Lebenserwartung, die Tiere sterben nach durchschnittlich 42 Tagen an tödlichen Anfällen (Kim et al. 1997) bzw. entwickeln sie bei PIMT-Mangel eine fatale progressive Epilepsie und sterben nach 4-12 Wochen (Yamamoto et al. 1998). In den Hoden werden vermutlich hinsichtlich der Lagerung größere PIMT-Mengen benötigt, um die reifen Spermien fruchtbar zu halten. So konnte in Spermien ein einzigartiges PIMT-Transkript entdeckt werden. Weitere Analysen ergaben, dass PIMT nicht für die Entwicklung als vielmehr für Aufrechterhaltung der Proteinfunktionen im Spermium benötigt wird (Chavous et al. 2000).

Nachdem die makroskopische Verteilung der PIMT im Organismus geklärt war, widmeten wir uns der subzellulären Verteilung. Hier wollten wir unter anderem klären, ob PIMT und APP colokalisiert sind. Weiterhin wird vermutet, dass die beiden PIMT-Isoformen aufgrund der unterschiedlichen C-Termini möglicherweise eine andere Lokalisierung innerhalb der Zelle haben. Hierfür haben wir EGFP- und FLAG-*getagte* PIMT-Konstrukte in HEK293-Zellen transfiziert und diese anschließend mittels fraktioniertem Zellaufschluss und *Western Blot* analysiert. Dabei konnten wir die Konstrukte ausschließlich in der cytosolischen Fraktion detektieren (Abb. 51 & 52). Im Widerspruch dazu lassen sich beide PIMT-Konstrukte mit der konfokalen Laserrastermikroskopie sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern visualisieren. Dabei fallen Strukturen auf, welche dem Cytoskelett ähneln (Abb. 53-55). Auf Grund der vielen unterschiedlichen endogenen Substrate von PIMT, zu denen auch das Tubulin (Najbauer et al. 1996), das Aktin (Zhu et al. 2006b) und das Tau-Protein (Yamamoto et al. 1998) gehören, welche alle am Aufbau und der Stabilisierung des Cytoskeletts beteiligt sind, war das zu erwarten. Die Lokalisierung von PIMT im Zellkern konnte auch in der Pflanze *Arabidopsis thaliana* gezeigt werden (Xu et al. 2004). Des Weiteren ist PIMT ein monomeres, globuläres Protein mit einer Größe von nicht mehr als 25 kDa. Damit sollte es frei durch die Kernporen in den Zellkern gelangen können, da kleine Proteine bis zu einer Größe von ca. 40 kDa hierfür keine Kern-Lokalisierungssequenz benötigen (Koolman, Röhm 2003). Das könnte auch erklären, weshalb man die EGFP- und FLAG-markierten PIMT-Konstrukte nur im Cytoplasma detektieren konnte, da möglicherweise ein Großteil der PIMT-Moleküle während der Präparation aus dem Zellkern diffundiert ist oder herausgedrückt wurde. Die Konzentration der PIMT-Konstrukte in anderen Kompartimente war dann vermutlich so gering, dass keine Detektion erfolgen konnte. Interessanterweise haben Boivin *et al.* membrangebundene PIMT gefunden, die vermutlich eine hydrophobe Bindung zur Zellmembran eingeht, da sie nur mit Detergenzien, nicht aber mit Salz oder Harnstoff von der

Diskussion

Zellmembran getrennt werden konnte (Boivin et al. 1995). Daher stellt sich verstärkt die Frage, weshalb man keine Spur von PIMT in den anderen Fraktionen fand. Möglicherweise wurde durch die Fusion von PIMT und EGFP bzw. dem FLAG-tag die hydrophobe Interaktion mit der Zellmembran gestört oder die Interaktionsstelle von PIMT und Zellmembran stört die Bindung des Antikörpers. Zusammengefasst konnte im letzten Teil der Promotionsarbeit gezeigt werden, dass die PIMT sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert ist. Bei genauerer Betrachtung der Verteilung innerhalb der Zelle fällt zusätzlich eine cytoskelettähnliche Struktur auf. PIMT hat also eine Vielzahl von unterschiedlichsten Substraten in allen Bereichen eines Organismus. Erstaunlich ist dabei, dass die PIMT in Situationen vermehrter Substratbildung, basischem pH oder erhöhter Temperatur die eigene Aktivität steigert. Gebremst wird die Aktivität nur durch die Produktion des kompetitiven Inhibitors SAH. Somit muss bei zukünftigen Therapieansätzen die Konzentration von SAH und SAM in der Zelle stärker berücksichtigt werden. Es kann ebenfalls versucht werden, die Affinität der PIMT für SAH durch gezielte Veränderung der Proteinstruktur zu verringern oder die Affinität für SAM zu erhöhen.

Zusammenfassung & Ausblick

5. Zusammenfassung & Ausblick

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Promotionsarbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass die N-terminale Isoaspartbildung von physiologischer Relevanz ist, sofern es Proteine betrifft, die eine hohe Lebensdauer haben, wie z.B. extrazelluläres A β , Proteine in den Erythrozyten, der Augenlinse oder den Zähnen. Es wurde zum ersten Mal eine quantitative Analyse der isoAsp-Bildung am N-Terminus von Modellpeptiden mittels CE-UV angefertigt, die Rückschlüsse auf andere Proteine mit langer Lebensdauer zulässt. So müssen Medikamente auf Proteinbasis hinsichtlich ihrer Potenz zur isoAsp-Bildung, auch am N-Terminus, untersucht und bewertet werden, um Nebenwirkungen von Medikamenten zu minimieren. Weiterhin bietet der in dieser Promotionsarbeit etablierte und validierte APN-gekoppelte PIMT-Aktivitätsassay die Möglichkeit einer genaueren Analyse der PIMT. Der Assay benötigt keine radioaktiv markierten Substanzen, wenig Probenmaterial und ist für eine automatisierte Analyse von verschiedenen Effektoren der PIMT geeignet. In Verbindung mit den bereits vorhandenen Assays können weitere Rückschlüsse auf die biochemischen Eigenschaften der PIMT geschlossen werden. Mit Hilfe des neuen Assays konnten sowohl diverse kinetische Parameter verschiedener PIMT-Substrate, das Temperatur- und pH-Optimum der durch PIMT katalysierten Reaktion als auch der IC₅₀-Wert von SAH bestimmt werden. Im letzten Teil der Promotionsarbeit konnte mittels *Western Blot* und Laserrastermikroskopie gezeigt werden, dass die PIMT sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert ist, wobei eine cytoskelettähnliche Struktur erkennbar wurde. Eine hohe PIMT-mRNA-Konzentration konnte zudem vermehrt im Gehirn, dem Skelett- und Herzmuskel sowie dem Hoden beobachtet werden. Damit stellt sich PIMT als ein sehr interessantes Enzym da, da es zum einen dort stärker lokalisiert ist, wo Proteindefekte stärkere Auswirkungen haben, wie im Gehirn oder dem Herzmuskel, und zum anderen passt sich die Aktivität der PIMT den Bedingungen für das verstärkte Auftreten von Fehlfaltungen, wie ein erhöhter pH-Wert oder eine erhöhte Temperatur, an. Die Frage nach der Co-Lokalisation von PIMT und APP konnte nicht abschließend geklärt werden.

Die große Anzahl an unterschiedlichen Substraten für die PIMT und die damit verbundene Involvierung in die verschiedensten Krankheiten macht PIMT zu einem äußerst interessanten Ziel für die Entwicklung von Therapeutika. Daher muss weiter versucht werden einen kontinuierlichen Aktivitätsassay für die PIMT zu entwickeln, damit das Enzym weiter im

Zusammenfassung & Ausblick

Detail untersucht und die Suche nach Aktivatoren bzw. Inhibitoren vorangetrieben werden kann.

Literaturverzeichnis

Aswad,D.W. 1984. Stoichiometric methylation of porcine adrenocorticotropin by protein carboxyl methyltransferase requires deamidation of asparagine 25. Evidence for methylation at the alpha-carboxyl group of atypical L-isoaspartyl residues. *J. Biol. Chem.* **259**:10714-10721.

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.

Axelrod,J. and Daly,J. 1965. Pituitary gland: enzymic formation of methanol from S-adenosylmethionine. *Science* **150**:892-893.

Barnett,R.E. and Jencks,W.P. 1969. Diffusion-controlled proton transfer in intramolecular thiol ester aminolysis and thiazoline hydrolysis. *J. Am. Chem. Soc.* **91**:2358-2369.

Bennett,E.J., Bjerregaard,J., Knapp,J.E., Chavous,D.A., Friedman,A.M., Royer,W.E., Jr., and O'Connor,C.M. 2003. Catalytic implications from the Drosophila protein L-isoaspartyl methyltransferase structure and site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **42**:12844-12853.

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.

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.

Boivin,D., Bilodeau,D., and Beliveau,R. 1995. Immunochemical characterization of L-isoaspartyl-protein carboxyl methyltransferase from mammalian tissues. *Biochem. J.* **309 (Pt 3)**:993-998.

Bradford,M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.

Brennan,T.V., Anderson,J.W., Jia,Z., Waygood,E.B., and Clarke,S. 1994. Repair of spontaneously deamidated HPr phosphocarrier protein catalyzed by the L-isoaspartate-(D-aspartate) O-methyltransferase. *J. Biol. Chem.* **269**:24586-24595.

Brennan,T.V. and Clarke,S. 1995. Effect of adjacent histidine and cysteine residues on the spontaneous degradation of asparaginyl- and aspartyl-containing peptides. *Int. J. Pept. Protein Res.* **45**:547-553.

Capasso,S., Mazzarella,L., Sica,F., Zagari,A., and Salvadori,S. 1993. Kinetics and mechanism of succinimide ring formation in the deamidation process of asparagine residues. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 2*:679-682.

Literaturverzeichnis

- Chavous,D.A., Hake,L.E., Lynch,R.J., and O'Connor,C.M. 2000. Translation of a unique transcript for protein isoaspartyl methyltransferase in haploid spermatids: implications for protein storage and repair. *Mol. Reprod. Dev.* **56**:139-144.
- Chavous,D.A., Jackson,F.R., and O'Connor,C.M. 2001. Extension of the *Drosophila* lifespan by overexpression of a protein repair methyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**:14814-14818.
- Cimmino,A., Capasso,R., Muller,F., Sambri,I., Masella,L., Raimo,M., De Bonis,M.L., D'Angelo,S., Zappia,V., Galletti,P., and Ingrosso,D. 2008. Protein isoaspartate methyltransferase prevents apoptosis induced by oxidative stress in endothelial cells: role of Bcl-Xl deamidation and methylation. *PLoS. One.* **3**:e3258.
- Cook,P.F. 1991. *Enzyme mechanism from isotope effects.* CRC Press.
- Corti,A. and Curnis,F. 2011. Isoaspartate-dependent molecular switches for integrin-ligand recognition. *J. Cell Sci.* **124**:515-522.
- Cox,M.M. and Jencks,W.P. 1978. General acid catalysis of the aminolysis of phenyl acetate by a preassociation mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **100**:5956-5957.
- Desrosiers,R.R. and Fanelus,I. 2011. Damaged proteins bearing L-isoaspartyl residues and aging: a dynamic equilibrium between generation of isomerized forms and repair by PIMT. *Curr. Aging Sci.* **4**:8-18.
- DeVry,C.G. and Clarke,S. 1999. Polymorphic forms of the protein L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase involved in the repair of age-damaged proteins. *J. Hum. Genet.* **44**:275-288.
- Difede,J., Cukor,J., Lee,F., and Yurt,R. 2009. Treatments for common psychiatric conditions among adults during acute, rehabilitation, and reintegration phases. *Int. Rev. Psychiatry* **21**:559-569.
- Doyle,H.A., Gee,R.J., and Mamula,M.J. 2007. Altered immunogenicity of isoaspartate containing proteins. *Autoimmunity* **40**:131-137.
- Ellis,K.J. and Morrison,J.F. 1982. Buffers of constant ionic strength for studying pH-dependent processes. *Methods Enzymol.* **87**:405-426.
- Fabian,H., Szendrei,G.I., Mantsch,H.H., Greenberg,B.D., and Otvos,L., Jr. 1994. Synthetic post-translationally modified human A beta peptide exhibits a markedly increased tendency to form beta-pleated sheets in vitro. *Eur. J. Biochem.* **221**:959-964.
- Fang,P., Li,X., Wang,J., Xing,L., Gao,Y., Niu,L., and Teng,M. 2010. Crystal structure of the protein L-isoaspartyl methyltransferase from *Escherichia coli*. *Cell Biochem. Biophys.* **58**:163-167.
- Farris,W., Mansourian,S., Chang,Y., Lindsley,L., Eckman,E.A., Frosch,M.P., Eckman,C.B., Tanzi,R.E., Selkoe,D.J., and Guenette,S. 2003. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**:4162-4167.

Literaturverzeichnis

- Flatmark,T. and Sletten,K. 1968. Multiple forms of cytochrome c in the rat. Precursor-product relationship between the main component Cy I and the minor components Cy II and Cy 3 in vivo. *J. Biol. Chem.* **243**:1623-1629.
- Fujii,N., Shimo-Oka,T., Ogiso,M., Momose,Y., Kodama,T., Kodama,M., and Akaboshi,M. 2000. Localization of biologically uncommon D-beta-aspartate-containing alphaA-crystallin in human eye lens. *Mol. Vis.* **6**:1-5.
- Furuchi,T., Kosugi,S., Ohno,K., Egawa,T., Sekine,M., Katane,M., and Homma,H. 2009. High-performance liquid chromatographic method to measure protein L-isoaspartyl/D-aspartyl o-methyltransferase activity in cell lysates. *Anal. Biochem.* **384**:207-212.
- Geiger,T. and Clarke,S. 1987. Deamidation, isomerization, and racemization at asparaginyll and aspartyl residues in peptides. Succinimide-linked reactions that contribute to protein degradation. *J. Biol. Chem.* **262**:785-794.
- 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.
- Gomez,T.A., Banfield,K.L., and Clarke,S.G. 2008. The protein L-isoaspartyl-O-methyltransferase functions in the Caenorhabditis elegans stress response. *Mech. Ageing Dev.* **129**:752-758.
- Gotz,J., Chen,F., van,D.J., and Nitsch,R.M. 2001. Formation of neurofibrillary tangles in P3011 tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. *Science* **293**:1491-1495.
- Griffith,S.C., Sawaya,M.R., Boutz,D.R., Thapar,N., Katz,J.E., Clarke,S., and Yeates,T.O. 2001. Crystal structure of a protein repair methyltransferase from Pyrococcus furiosus with its L-isoaspartyl peptide substrate. *J. Mol. Biol.* **313**:1103-1116.
- Haass,C., Lemere,C.A., Capell,A., Citron,M., Seubert,P., Schenk,D., Lannfelt,L., and Selkoe,D.J. 1995. The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway. *Nat. Med.* **1**:1291-1296.
- 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.
- Hicks,W.M., Kotlajich,M.V., and Visick,J.E. 2005. Recovery from long-term stationary phase and stress survival in Escherichia coli require the L-isoaspartyl protein carboxyl methyltransferase at alkaline pH. *Microbiology* **151**:2151-2158.
- Hock,C., Konietzko,U., Streffer,J.R., Tracy,J., Signorell,A., Muller-Tillmanns,B., Lemke,U., Henke,K., Moritz,E., Garcia,E., Wollmer,M.A., Umbricht,D., de Quervain,D.J., Hofmann,M., Maddalena,A., Papassotiropoulos,A., and Nitsch,R.M. 2003. Antibodies against beta-amyloid slow cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neuron* **38**:547-554.
- Hook,V., Schechter,I., Demuth,H.U., and Hook,G. 2008. Alternative pathways for production of beta-amyloid peptides of Alzheimer's disease. *Biol. Chem.* **389**:993-1006.

Literaturverzeichnis

- Ichikawa,J.K. and Clarke,S. 1998. A highly active protein repair enzyme from an extreme thermophile: the L-isoaspartyl methyltransferase from *Thermotoga maritima*. *Arch. Biochem. Biophys.* **358**:222-231.
- Ingrosso,D., Fowler,A.V., Bleibaum,J., and Clarke,S. 1989. Sequence of the D-aspartyl/L-isoaspartyl protein methyltransferase from human erythrocytes. Common sequence motifs for protein, DNA, RNA, and small molecule S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *J. Biol. Chem.* **264**:20131-20139.
- Iwata,N., Tsubuki,S., Takaki,Y., Shirotani,K., Lu,B., Gerard,N.P., Gerard,C., Hama,E., Lee,H.J., and Saido,T.C. 2001. Metabolic regulation of brain A β by neprilysin. *Science* **292**:1550-1552.
- Jonsson,T., Atwal,J.K., Steinberg,S., Snaedal,J., Jonsson,P.V., Bjornsson,S., Stefansson,H., Sulem,P., Gudbjartsson,D., Maloney,J., Hoyte,K., Gustafson,A., Liu,Y., Lu,Y., Bhangale,T., Graham,R.R., Huttenlocher,J., Bjornsdottir,G., Andreassen,O.A., Jonsson,E.G., Palotie,A., Behrens,T.W., Magnusson,O.T., Kong,A., Thorsteinsdottir,U., Watts,R.J., and Stefansson,K. 2012. A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature* **488**:96-99.
- Kagan,R.M. and Clarke,S. 1995. Protein L-isoaspartyl methyltransferase from the nematode *Caenorhabditis elegans*: genomic structure and substrate specificity. *Biochemistry* **34**:10794-10806.
- Kamenetz,F., Tomita,T., Hsieh,H., Seabrook,G., Borchelt,D., Iwatsubo,T., Sisodia,S., and Malinow,R. 2003. APP processing and synaptic function. *Neuron* **37**:925-937.
- Kanemitsu,H., Tomiyama,T., and Mori,H. 2003. Human neprilysin is capable of degrading amyloid beta peptide not only in the monomeric form but also the pathological oligomeric form. *Neurosci. Lett.* **350**:113-116.
- Kern,R., Malki,A., Abdallah,J., Liebart,J.C., Dubucs,C., Yu,M.H., and Richarme,G. 2005. Protein isoaspartate methyltransferase is a multicopy suppressor of protein aggregation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **187**:1377-1383.
- Khare,S., Linster,C.L., and Clarke,S.G. 2011. The interplay between protein L-isoaspartyl methyltransferase activity and insulin-like signaling to extend lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS. One.* **6**:e20850.
- Kim,E., Lowenson,J.D., MacLaren,D.C., Clarke,S., and Young,S.G. 1997. Deficiency of a protein-repair enzyme results in the accumulation of altered proteins, retardation of growth, and fatal seizures in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**:6132-6137.
- Kim,S. and Paik,W.K. 1970. Purification and properties of protein methylase II. *J. Biol. Chem.* **245**:1806-1813.
- Kindrachuk,J., Parent,J., Davies,G.F., Dinsmore,M., Attah-Poku,S., and Napper,S. 2003. Overexpression of L-isoaspartate O-methyltransferase in *Escherichia coli* increases heat shock survival by a mechanism independent of methyltransferase activity. *J. Biol. Chem.* **278**:50880-50886.

Literaturverzeichnis

- Kinzel,V., Hotz,A., Konig,N., Gagelmann,M., Pyerin,W., Reed,J., Kubler,D., Hofmann,F., Obst,C., Gensheimer,H.P., and . 1987. Chromatographic separation of two heterogeneous forms of the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase holoenzyme type I and type II from striated muscle of different mammalian species. *Arch. Biochem. Biophys.* **253**:341-349.
- Kinzel,V., Konig,N., Pipkorn,R., Bossemeyer,D., and Lehmann,W.D. 2000. The amino terminus of PKA catalytic subunit--a site for introduction of posttranslational heterogeneities by deamidation: D-Asp2 and D-isoAsp2 containing isozymes. *Protein Sci.* **9**:2269-2277.
- Klyubin,I., Betts,V., Welzel,A.T., Blennow,K., Zetterberg,H., Wallin,A., Lemere,C.A., Cullen,W.K., Peng,Y., Wisniewski,T., Selkoe,D.J., Anwyl,R., Walsh,D.M., and Rowan,M.J. 2008. Amyloid beta protein dimer-containing human CSF disrupts synaptic plasticity: prevention by systemic passive immunization. *J. Neurosci.* **28**:4231-4237.
- Koolman,J. and Röhm,K.-H. 2003. *Taschenatlas der Biochemie*. Thieme.
- Kosugi,S., Furuchi,T., Katane,M., Sekine,M., Shirasawa,T., and Homma,H. 2008. Suppression of protein L-isoaspartyl (d-aspartyl) methyltransferase results in hyperactivation of EGF-stimulated MEK-ERK signaling in cultured mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **371**:22-27.
- Kummer,M.P., Hermes,M., Delekarte,A., Hammerschmidt,T., Kumar,S., Terwel,D., Walter,J., Pape,H.C., Konig,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.
- Kuo,Y.M., Emmerling,M.R., Woods,A.S., Cotter,R.J., and Roher,A.E. 1997. Isolation, chemical characterization, and quantitation of A beta 3-pyroglutamyl peptide from neuritic plaques and vascular amyloid deposits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **237**:188-191.
- Kuo,Y.M., Webster,S., Emmerling,M.R., De,L.N., and Roher,A.E. 1998. Irreversible dimerization/tetramerization and post-translational modifications inhibit proteolytic degradation of A beta peptides of Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1406**:291-298.
- Lanthier,J., Bouthillier,A., Lapointe,M., Demeule,M., Beliveau,R., and Desrosiers,R.R. 2002. Down-regulation of protein L-isoaspartyl methyltransferase in human epileptic hippocampus contributes to generation of damaged tubulin. *J. Neurochem.* **83**:581-591.
- Lanthier,J. and Desrosiers,R.R. 2004. Protein L-isoaspartyl methyltransferase repairs abnormal aspartyl residues accumulated in vivo in type-I collagen and restores cell migration. *Exp. Cell Res.* **293**:96-105.
- Lee,H.G., Perry,G., Moreira,P.I., Garrett,M.R., Liu,Q., Zhu,X., Takeda,A., Nunomura,A., and Smith,M.A. 2005. Tau phosphorylation in Alzheimer's disease: pathogen or protector? *Trends Mol. Med.* **11**:164-169.
- Lee,J.C., Kang,S.U., Jeon,Y., Park,J.W., You,J.S., Ha,S.W., Bae,N., Lubec,G., Kwon,S.H., Lee,J.S., Cho,E.J., and Han,J.W. 2012. Protein L-isoaspartyl methyltransferase regulates p53 activity. *Nat. Commun.* **3**:927.

Literaturverzeichnis

- Leissring, M.A., Farris, W., Chang, A.Y., Walsh, D.M., Wu, X., Sun, X., Frosch, M.P., and Selkoe, D.J. 2003. Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. *Neuron* **40**:1087-1093.
- Lewis, J., Dickson, D.W., Lin, W.L., Chisholm, L., Corral, A., Jones, G., Yen, S.H., Sahara, N., Skipper, L., Yager, D., Eckman, C., Hardy, J., Hutton, M., and McGowan, E. 2001. Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* **293**:1487-1491.
- Li, C. and Clarke, S. 1992. Distribution of an L-isoaspartyl protein methyltransferase in eubacteria. *J. Bacteriol.* **174**:355-361.
- Liss, M., Maxam, A.M., and Cuprak, L.J. 1969. Methylation of protein by calf spleen methylase. A new protein methylation reaction. *J. Biol. Chem.* **244**:1617-1622.
- Lottspeich, F. and Engels, J.E. 2006. *Bioanalytik*. Elsevier GmbH: München.
- Lowenson, J.D. and Clarke, S. 1990. Identification of isoaspartyl-containing sequences in peptides and proteins that are usually poor substrates for the class II protein carboxyl methyltransferase. *J. Biol. Chem.* **265**:3106-3110.
- 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.
- Lowenson, J.D., Roher, A.E., and Clarke, S. 1994. Protein aging Extracellular amyloid formation and intracellular repair. *Trends Cardiovasc. Med.* **4**:3-8.
- Lue, L.F., Kuo, Y.M., Roher, A.E., Brachova, L., Shen, Y., Sue, L., Beach, T., Kurth, J.H., Rydel, R.E., and Rogers, J. 1999. Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* **155**:853-862.
- MacLaren, D.C., Kagan, R.M., and Clarke, S. 1992. Alternative splicing of the human isoaspartyl protein carboxyl methyltransferase RNA leads to the generation of a C-terminal -RDEL sequence in isozyme II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **185**:277-283.
- Mamula, M.J., Gee, R.J., Elliott, J.I., Sette, A., Southwood, S., Jones, P.J., and Blier, P.R. 1999. Isoaspartyl post-translational modification triggers autoimmune responses to self-proteins. *J. Biol. Chem.* **274**:22321-22327.
- McGeer, P.L. and McGeer, E. 2003. Is there a future for vaccination as a treatment for Alzheimer's disease? *Neurobiol. Aging* **24**:391-395.
- McKerrow, J.H. and Robinson, A.B. 1974. Primary sequence dependence of the deamidation of rabbit muscle aldolase. *Science* **183**:85.
- 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.
- Midelfort, C.F. and Mehler, A.H. 1972. Deamidation in vivo of an asparagine residue of rabbit muscle aldolase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **69**:1816-1819.

Literaturverzeichnis

- Murray,E.D., Jr. and Clarke,S. 1984. Synthetic peptide substrates for the erythrocyte protein carboxyl methyltransferase. Detection of a new site of methylation at isomerized L-aspartyl residues. *J. Biol. Chem.* **259**:10722-10732.
- Najbauer,J., Orpiszewski,J., and Aswad,D.W. 1996. Molecular aging of tubulin: accumulation of isoaspartyl sites in vitro and in vivo. *Biochemistry* **35**:5183-5190.
- Ni,W., Dai,S., Karger,B.L., and Zhou,Z.S. 2010. Analysis of isoaspartic Acid by selective proteolysis with Asp-N and electron transfer dissociation mass spectrometry. *Anal. Chem.* **82**:7485-7491.
- 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.
- O'Connor,C.M. 1987. Regulation and subcellular distribution of a protein methyltransferase and its damaged aspartyl substrate sites in developing *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* **262**:10398-10403.
- Oddo,S., Caccamo,A., Shepherd,J.D., Murphy,M.P., Golde,T.E., Kaye,R., Metherate,R., Mattson,M.P., Akbari,Y., and LaFerla,F.M. 2003. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* **39**:409-421.
- 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.
- Potter,S.M., Johnson,B.A., Henschen,A., Aswad,D.W., and Guzzetta,A.W. 1992. The type II isoform of bovine brain protein L-isoaspartyl methyltransferase has an endoplasmic reticulum retention signal (...RDEL) at its C-terminus. *Biochemistry* **31**:6339-6347.
- Qiu,W.Q., Walsh,D.M., Ye,Z., Vekrellis,K., Zhang,J., Podlisny,M.B., Rosner,M.R., Safavi,A., Hersh,L.B., and Selkoe,D.J. 1998. Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *J. Biol. Chem.* **273**:32730-32738.
- Querfurth,H.W. and LaFerla,F.M. 2010. Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* **362**:329-344.
- Rehm,H. 2006. *Der Experimentator Proteinbiochemie / Proteomics*. Elsevier GmbH: München.
- Reissner,K.J. and Aswad,D.W. 2003. Deamidation and isoaspartate formation in proteins: unwanted alterations or surreptitious signals? *Cell Mol. Life Sci.* **60**:1281-1295.
- Reissner,K.J., Paranandi,M.V., Luc,T.M., Doyle,H.A., Mamula,M.J., Lowenson,J.D., and Aswad,D.W. 2006. Synapsin I is a major endogenous substrate for protein L-isoaspartyl methyltransferase in mammalian brain. *J. Biol. Chem.* **281**:8389-8398.

Literaturverzeichnis

- 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.
- Robinson,N.E. and Robinson,A.B. 2001. Molecular clocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**:944-949.
- Roher,A.E., Lowenson,J.D., Clarke,S., Woods,A.S., Cotter,R.J., Gowing,E., and Ball,M.J. 1993. beta-Amyloid-(1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: implications for the pathology of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**:10836-10840.
- Rutherford,K. and Daggett,V. 2009. The V119I polymorphism in protein L-isoaspartate O-methyltransferase alters the substrate-binding interface. *Protein Eng Des Sel* **22**:713-721.
- Ryttersgaard,C., Griffith,S.C., Sawaya,M.R., MacLaren,D.C., Clarke,S., and Yeates,T.O. 2002. Crystal structure of human L-isoaspartyl methyltransferase. *J. Biol. Chem.* **277**:10642-10646.
- Saido,T.C., Yamao-Harigaya,W., Iwatsubo,T., and Kawashima,S. 1996. Amino- and carboxyl-terminal heterogeneity of beta-amyloid peptides deposited in human brain. *Neurosci. Lett.* **215**:173-176.
- 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.
- Satterthwait,A.C. and Jencks,W.P. 1974. Mechanism of the aminolysis of acetate esters. *J. Am. Chem. Soc.* **96**:7018-7031.
- Schilling,S., Hoffmann,T., Manhart,S., Hoffmann,M., and Demuth,H.U. 2004. Glutaminyl cyclases unfold glutamyl cyclase activity under mild acid conditions. *FEBS Lett.* **563**:191-196.
- 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.
- 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. 2008. Glutaminyl cyclase inhibition attenuates pyroglutamate A β and Alzheimer's disease-like pathology. *Nat. Med.* **14**:1106-1111.
- 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.
- Schurter,B.T. and Aswad,D.W. 2000. Analysis of isoaspartate in peptides and proteins without the use of radioisotopes. *Anal. Biochem.* **282**:227-231.

Literaturverzeichnis

- 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.
- Selkoe,D.J. 2001. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev.* **81**:741-766.
- Shimizu,T., Matsuoka,Y., and Shirasawa,T. 2005. Biological significance of isoaspartate and its repair system. *Biol. Pharm. Bull.* **28**:1590-1596.
- 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.
- Siemers,E.R., Quinn,J.F., Kaye,J., Farlow,M.R., Porsteinsson,A., Tariot,P., Zoulnouni,P., Galvin,J.E., Holtzman,D.M., Knopman,D.S., Satterwhite,J., Gonzales,C., Dean,R.A., and May,P.C. 2006. Effects of a gamma-secretase inhibitor in a randomized study of patients with Alzheimer disease. *Neurology* **66**:602-604.
- Skinner,M.M., Puvathingal,J.M., Walter,R.L., and Friedman,A.M. 2000. Crystal structure of protein isoaspartyl methyltransferase: a catalyst for protein repair. *Structure.* **8**:1189-1201.
- Smith,C.D., Carson,M., Friedman,A.M., Skinner,M.M., Delucas,L., Chantalat,L., Weise,L., Shirasawa,T., and Chattopadhyay,D. 2002. Crystal structure of human L-isoaspartyl-O-methyl-transferase with S-adenosyl homocysteine at 1.6-Å resolution and modeling of an isoaspartyl-containing peptide at the active site. *Protein Sci.* **11**:625-635.
- 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.
- Thapar,N. and Clarke,S. 2000. Expression, purification, and characterization of the protein repair L-isoaspartyl methyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Protein Expr. Purif.* **20**:237-251.
- Thapar,N., Griffith,S.C., Yeates,T.O., and Clarke,S. 2002. Protein repair methyltransferase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. Unusual methyl-accepting affinity for D-aspartyl and N-succinyl-containing peptides. *J. Biol. Chem.* **277**:1058-1065.
- Thapar,N., Kim,A.K., and Clarke,S. 2001. Distinct patterns of expression but similar biochemical properties of protein L-isoaspartyl methyltransferase in higher plants. *Plant Physiol* **125**:1023-1035.
- Tomidokoro,Y., Rostagno,A., Neubert,T.A., Lu,Y., Rebeck,G.W., Frangione,B., Greenberg,S.M., and Ghiso,J. 2010. Iowa variant of familial Alzheimer's disease: accumulation of posttranslationally modified Aβ_{23N} in parenchymal and cerebrovascular amyloid deposits. *Am. J. Pathol.* **176**:1841-1854.
- Varshavsky,A. 1996. The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**:12142-12149.

Literaturverzeichnis

Velazquez,P., Cribbs,D.H., Poulos,T.L., and Tenner,A.J. 1997. Aspartate residue 7 in amyloid beta-protein is critical for classical complement pathway activation: implications for Alzheimer's disease pathogenesis. *Nat. Med.* **3**:77-79.

Verma,P., Singh,A., Kaur,H., and Majee,M. 2010. Protein L-isoaspartyl methyltransferase1 (CaPIMT1) from chickpea mitigates oxidative stress-induced growth inhibition of *Escherichia coli*. *Planta* **231**:329-336.

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.

Villa,S.T., Xu,Q., Downie,A.B., and Clarke,S.G. 2006. Arabidopsis Protein Repair L-Isoaspartyl Methyltransferases: Predominant Activities at Lethal Temperatures. *Physiol Plant* **128**:581-592.

Visick,J.E., Cai,H., and Clarke,S. 1998. The L-isoaspartyl protein repair methyltransferase enhances survival of aging *Escherichia coli* subjected to secondary environmental stresses. *J. Bacteriol.* **180**:2623-2629.

Wagenknecht,H.-A. and Knapp,H. Roempp Online [Version 3.5]. 2009.

Ref Type: Online Source

Wagner,A.M., Cloos,P., Bergholdt,R., Boissy,P., Andersen,T.L., Henriksen,D.B., Christiansen,C., Christgau,S., Pociot,F., and Nerup,J. 2007. Post-translational protein modifications in type 1 diabetes: a role for the repair enzyme protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase? *Diabetologia* **50**:676-681.

Walsh,D.M., Townsend,M., Podlisny,M.B., Shankar,G.M., Fadeeva,J.V., El,A.O., Hartley,D.M., and Selkoe,D.J. 2005. Certain inhibitors of synthetic amyloid beta-peptide (A β) fibrillogenesis block oligomerization of natural A β and thereby rescue long-term potentiation. *J. Neurosci.* **25**:2455-2462.

Weber,D.J. and McFadden,P.N. 1997. Injury-induced enzymatic methylation of aging collagen in the extracellular matrix of blood vessels. *J. Protein Chem.* **16**:269-281.

Xie,M. and Schowen,R.L. 1999. Secondary structure and protein deamidation. *J. Pharm. Sci.* **88**:8-13.

Xu,Q., Belcastro,M.P., Villa,S.T., Dinkins,R.D., Clarke,S.G., and Downie,A.B. 2004. A second protein L-isoaspartyl methyltransferase gene in *Arabidopsis* produces two transcripts whose products are sequestered in the nucleus. *Plant Physiol* **136**:2652-2664.

Yamamoto,A., Takagi,H., Kitamura,D., Tatsuoka,H., Nakano,H., Kawano,H., Kuroyanagi,H., Yahagi,Y., Kobayashi,S., Koizumi,K., Sakai,T., Saito,K., Chiba,T., Kawamura,K., Suzuki,K., Watanabe,T., Mori,H., and Shirasawa,T. 1998. Deficiency in protein L-isoaspartyl methyltransferase results in a fatal progressive epilepsy. *J. Neurosci.* **18**:2063-2074.

Literaturverzeichnis

Zhao,R., Follows,G.A., Beer,P.A., Scott,L.M., Huntly,B.J., Green,A.R., and Alexander,D.R. 2008. Inhibition of the Bcl-xL deamidation pathway in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* **359**:2778-2789.

Zhu,H., Yang,W., Lu,W., Zhang,J., Shaw,G.M., Lammer,E.J., and Finnell,R.H. 2006a. A known functional polymorphism (Ile120Val) of the human PCMT1 gene and risk of spina bifida. *Mol. Genet. Metab* **87**:66-70.

Zhu,J.X., Doyle,H.A., Mamula,M.J., and Aswad,D.W. 2006b. Protein repair in the brain, proteomic analysis of endogenous substrates for protein L-isoaspartyl methyltransferase in mouse brain. *J. Biol. Chem.* **281**:33802-33813.

Anhang

6. Anhang

6.1 Kontinuierlicher MDH-gekoppelter PIMT-Aktivitätsassay

Anzucht und Zellernte

Methylobacterium extorquens (DSM 1337) wurde ausplattiert und von Kontaminationen befreit. Danach konnte der Stamm in 2x 1.65 l Kultivierungsmedium über 3 Tage bei 30 °C und 200 rpm kultiviert werden. Die Kultur verfärbte sich rosa bis rot. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation bei 7000 g geerntet. Aus 3.3 l Flüssigkultur konnte eine Zellmasse von 9.18 g gewonnen werden.



Kultivierungsmedium:

- 0.57 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
- 3.00 g/l NH_4Cl
- 1.53 g/l K_2HPO_4
- 0.20 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
- 1 ‰ (v/v) Spurenelementlösung (DSM 141 + 0.2 % (v/v) $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$)

Abb. 57: Geerntetes *Methylobacterium extorquens*.

Aufschluss und Reinigung

Das Zellpellet wurde mit 50 ml Puffer A (100 mM Mes pH 5.5) versetzt und resuspendiert. Zusätzlich wurden standardmäßig Proteinase-Inhibitoren hinzugefügt. Der Ansatz wurde auf Eiswasser gelagert. Der Aufschluss erfolgte per *french press* mit 3x 700 bar. Das Zelllysate wurde 40 min bei 108 000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde über einen Acetatfilter (0.45 µm, 30 mm Durchmesser) gereinigt. Danach wurden die circa 80 ml Proteinlösung mit Hilfe eines Superloops auf die SP-Sepharose-Säule (V=5 ml) mit 1 ml/min gegeben. Anschließend wurde mit 200 ml Puffer A mit 2 ml/min gewaschen. Die Elution erfolgte über einen Gradienten über 100 ml (0-50 % Puffer B (100 mM Mes pH 5.5, 250 mM NaCl)) mit 2 ml/min. Es wurden 2 ml-Fractionen gesammelt. Die Fractionen wurden mittels

Anhang

SDS-PAGE analysiert. Danach wurden die Fraktionen 15-20 vereinigt, konzentriert und in 20 mM Phosphat-Puffer pH 7 umgepuffert. Insgesamt konnten circa 7 ml mit einer Konzentration von 4 mg/ml gereinigt werden, also ungefähr 28 mg gereinigte native MDH.

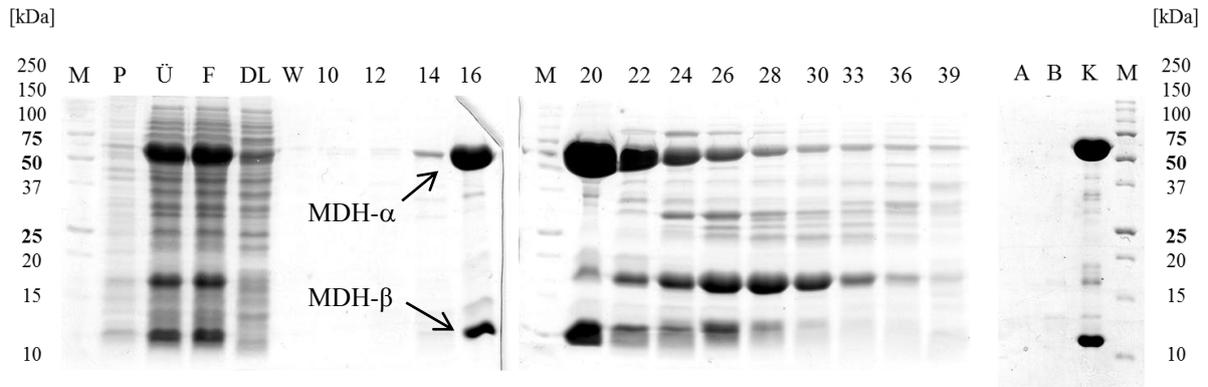


Abb. 58: SDS-PAGE der Reinigung der MDH aus dem *Methylobacterium extorquens*. Verwendet wurde ein 15%iges Trenngel. M = Proteinstandard (Biorad #161-0363), P = Sediment nach 40 min, 4 °C, 108000 g, Ü = Überstand nach 40 min, 4 °C, 108000 g, F = Überstand nach Filterung, DL = Durchlauf der SP-Sepharose-Säule, W = Waschfraktion der SP-Sepharose-Säule, A = Durchlauf des 10 kDa-Konzentrators, B = Durchlauf des 50 kDa-Konzentrators, K = MDH-Konzentrat

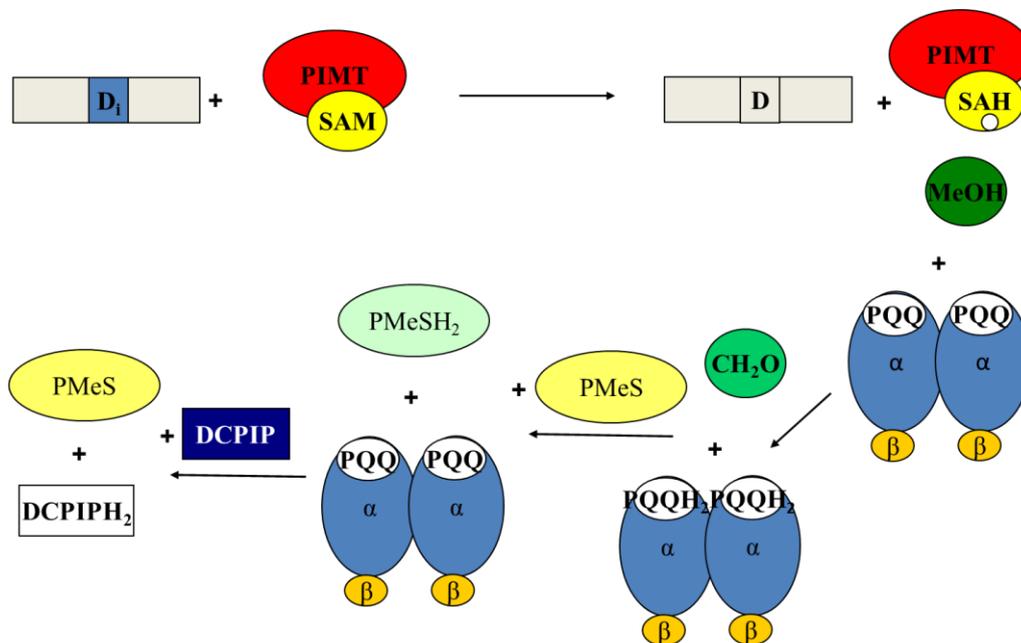


Abb. 59: Idee des MDH-gekoppelten PIMT-Aktivitätsassays. Nachdem das isoAsp-Substrat durch PIMT und SAM methyliert worden ist, sollte das entstandene Methanol durch die MDH (EC 1.1.99.8) zu Formaldehyd oxidiert werden. Die reduzierte MDH würde danach durch das Phenazinmethosulfat (PMeS) regeneriert werden. Das reduzierte PMeS könnte dann durch DCPIP regeneriert werden und man könnte die Reaktion optisch bei 595 nm verfolgen (blau → farblos).

Anhang

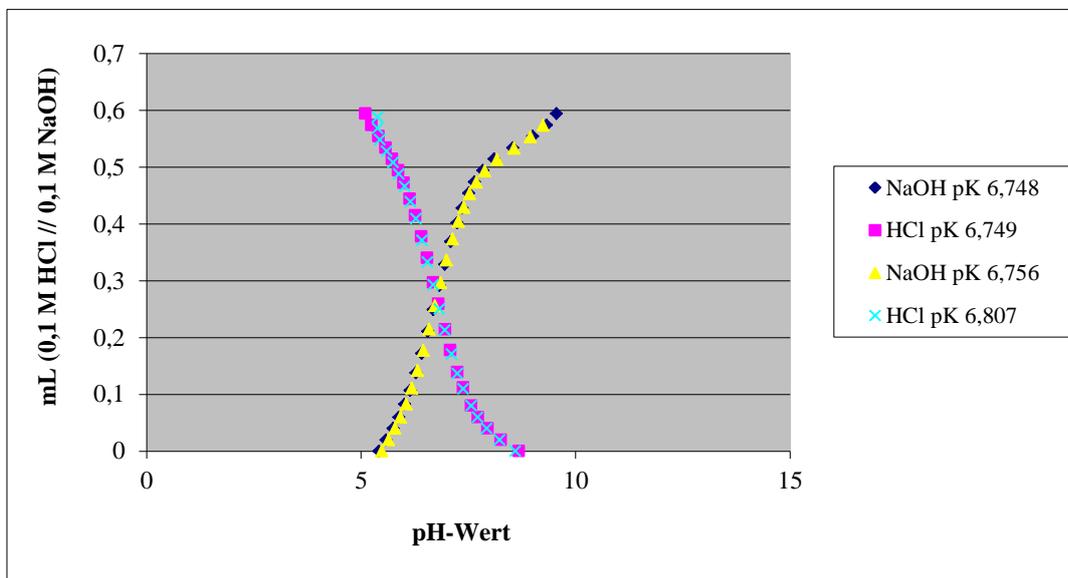
Ergebnis der initialen Tests

Die Reaktion läuft bereits ohne Zugabe von Methanol ab. Auch das Entgasen der Puffer konnte daran nichts ändern.

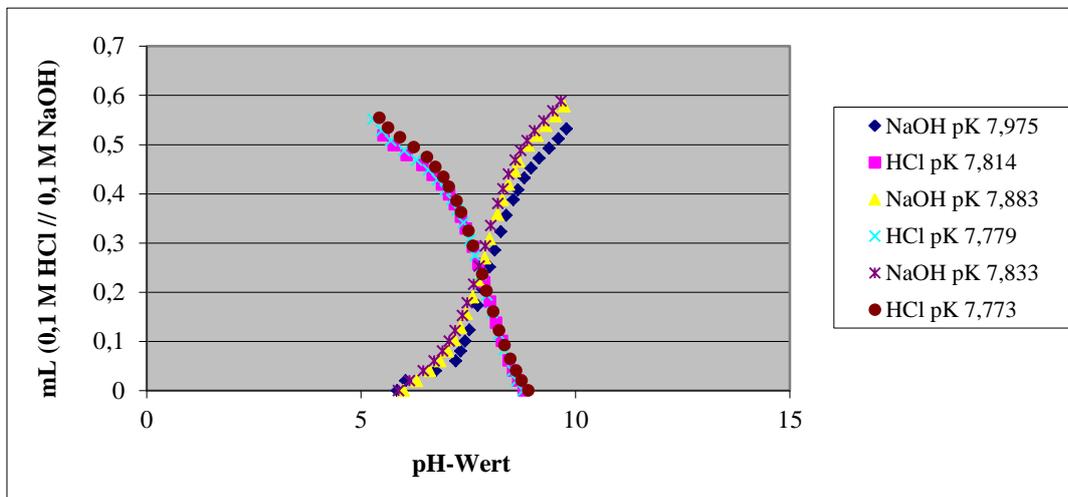
6.2 Titration der N-Termini von NGEF, DGEF, NAEF & DAEF

Die Titrations wurden mit jeweils 2 mM Peptid bei 37 °C in 25 ml bidestilliertem Wasser durchgeführt.

Titrationen für das Peptid NGEF: pK ~ 6.8

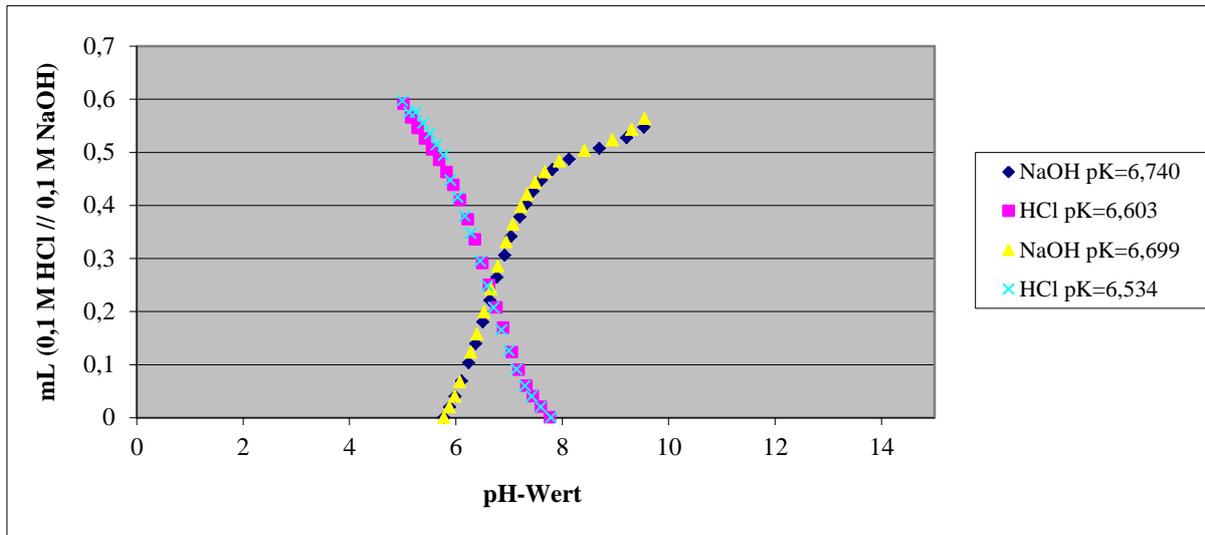


Titrationen für das Peptid DGEF: pK ~ 7.8

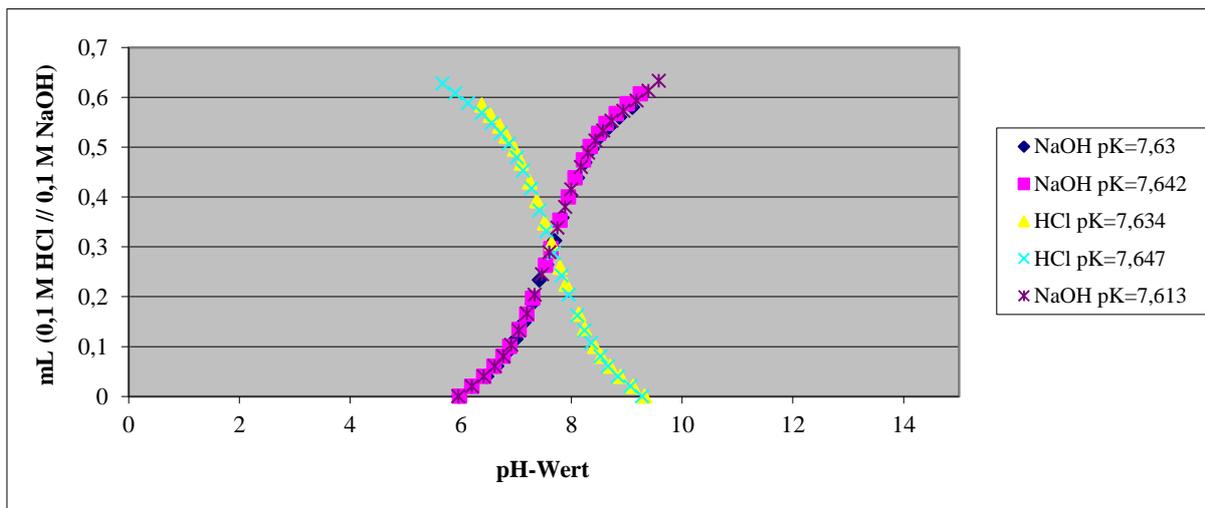


Anhang

Titrationen für das Peptid NAEF: $pK \sim 6.6$



Titrationen für das Peptid DAEF: $pK \sim 7.6$



Ergebnis: Der pK -Wert der N-Termini der Asn- und Asp-Peptide unterscheidet sich um circa 1 pH-Einheit.

Anhang

6.3 Kinetischer Isotopieeffekt von NGEF in Tricinpuffer

Um eine Abhängigkeit des kinetischen Isotopieeffektes von den Pufferionen auszuschließen, wurden die Messungen in Tricinpuffer mit identischer Ionenstärke im Vergleich zum 3-Komponenten-Puffer durchgeführt.

Tab. 8: Isomerisierungsgeschwindigkeit von NGEF in 23 mM Tricinpuffer pH/pD 8.

23 mM Tricin pH/pD 8.0	1 mM NGEF in H ₂ O	1 mM NGEF in D ₂ O	KIE
k (d ⁻¹)	0.0329 ± 0.0004	0.0134 ± 0.0001	2.47

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Prof. Hans-Ulrich Demuth, Prof. Stephan von Hörsten und PD Ralph Golbik bedanken, für die Möglichkeit bei der Probiodrug AG praktisch zu arbeiten und an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg promovieren zu dürfen.

Mein Dank gilt Dr. rer. nat. Stephan Schilling und Dr. rer. nat. Holger Cynis für die ununterbrochene Bereitstellung ihrer Zeit für Diskussionen, Absprachen und vielen anderen Dingen, aber auch für den sportlichen Ausgleich neben der Arbeit.

Vielen Dank auch an Dr. rer. nat. Andrea Porzel, für die Durchführung und Auswertung der NMR-Experimente.

Bei Dr. rer. nat. Stefan Lüdtke und Dr. rer. nat. Dagmar Schlenzig möchte ich mich für die Korrekturen, den Ratschlägen und den wertvollen Tipps bezüglich dieser Promotionschrift bedanken.

Ein weiterer Dank gilt der Arbeitsgruppe Enzymologie, die die Zeit der Promotion gefühlt deutlich verkürzt hat. Vielen Dank, dass ihr mich so lieb aufgenommen habt.

Natürlich möchte ich auch der ganzen Probiodrug AG für die vielen kleinen Nettigkeiten hier und da und die ein oder andere Hilfe danken. Vielen Dank für die vielen Peptide (Christina & Hans), vielen Dank für die „Erklärung“ der *french press* (Anka), vielen Dank für die ITC-Messungen (Martin), vielen Dank für die Hilfe an allen Messgeräten (Torsten)....

Am Ende gilt der allergrößte Dank meiner Familie und meinen Freunden für ihre großartige Unterstützung und ihr Verständnis für die zeitlichen Entbehrungen.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name Bert Hans-Otto Güttler

Geburtsort/-datum 12.06.1982 in Potsdam

Staatsangehörigkeit deutsch

Familienstand verheiratet, 2 Kinder

Werdegang

11/2014 – heute wissenschaftlicher Außendienst bei der Santis GmbH

09/2012 – 10/2014 Produktmanager bei der Abena GmbH Deutschland

01/2009 – 08/2012 Promotion bei der Probiodrug AG in Halle an der Saale (Thema: Untersuchungen zur Bildung von Isoaspartat am Peptid-N-Terminus sowie zur Reparatur durch die Protein-L-isoaspartyl-O-methyltransferase)

09/2008 – 12/2008 wissenschaftlicher Mitarbeiter in der AG von Prof. Hüttelmaier am ZAMED in Halle an der Saale

08/2008 – 08/2008 selbstständige Arbeit als Diplom-Biochemiker

10/2003 – 07/2008 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität in Halle an der Saale, Diplomarbeit wurde angefertigt bei Juniorprofessor Kai Tittmann in der Abteilung Enzymologie der Martin-Luther-Universität (Thema: Untersuchungen zum Mechanismus der reduktiven Acetylierung des humanen Pyruvat-Dehydrogenase Multienzymkomplexes)

07/2002 – 09/2003 freiwillig-verlängerter Grundwehrdienst bei der Deutschen Marine

08/1995 – 06/2002 Gymnasium Michendorf

08/1989 – 07/1995 August-Bebel-Grundschule in Michendorf

Curriculum Vitae

Publikationen, Poster & Vorträge

Publikationen

2013 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 asparaginyll and aspartyl residues.“ *Amino Acids*

Poster

05/2010 „International Meeting on Proline-Specific Cleavage and Oxoprolyl Formation - Functions and Therapeutic Strategies“ Halle (Saale) / Deutschland

03/2010 „NEURAD Ph.D. graduate school“ Amsterdam / Niederlande

10/2008 „Meeting SFB 610“ Leipzig / Deutschland

05/2008 „Kongress Thiamin-abhängiger Enzyme“ Wittenberg / Deutschland

Vorträge

02/2011 „28th Winter School on Proteinases and Their Inhibitors“ Tiers/Italien

02/2010 „27th Winter School on Proteinases and Their Inhibitors“ Tiers/Italien

09/2009 „NEURAD Ph.D. graduate school“ Lille/Frankreich

Eidesstattliche Erklärung

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe. Die benutzten Quellen und Hilfsmittel wurden vollständig angegeben. Diese Arbeit wurde an keinerlei anderen wissenschaftlichen Instituten vorgelegt.

A handwritten signature in blue ink, reading "B. Gütler". The signature is written in a cursive style with a large initial "B" and a stylized "Gütler".

Bert Hans-Otto Güttler

Halle/Saale, den 24.06.2015