

Untersuchungen zur Struktur und Funktion menschlicher
und tierischer Glutaminyl-Zyklasen

Dissertation

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

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Anett Stephan

geb. am 28.11.1981 in Potsdam

Gutachter:

1. Prof. Dr. Milton Stubbs
2. Prof. Dr. Hans-Ulrich Demuth
3. Prof. Dr. Thomas Reinheckel

Halle (Saale), 06.09.2016

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	X
1. Einleitung	1
1.1. Bildung und Rolle der N-terminalen Modifikation Pyroglutamat	1
1.2. Glutaminylzyklasen (QC)	3
1.2.1. Vorkommen und Funktion	3
1.2.2. Das Isoenzym der tierischen Glutaminylzyklase	5
1.3. Rolle von QC/isoQC in pathophysiologischen Prozessen	9
1.3.1. Rolle der QC in der Alzheimer Erkrankung	9
1.3.2. Rolle der QC/isoQC in inflammatorischen Erkrankungen	12
1.4. Zielstellung der Arbeit	14
2. Material und Methoden	15
2.1. Nährmedien	15
2.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	15
2.3. Verwendete Stämme	16
2.4. Kommerziell gefertigte Präparationsmaterialien (Kits)	16
2.5. Plasmide	17
2.6. Verwendete Zelllinien	17
2.7. Antikörper	18
2.8. Pufferscreening-Kits für die Kristallisation	18
2.9. Zellkultur	19
2.9.1. Kultivierung der Zelllinien	19
2.9.2. Transfektion von LN405, COS-7 und HEK293 Zellen mit Plasmiden	19
2.9.3. Transfektion von HEK293 Zellen mit siRNA	19
2.9.4. Bestimmung der zellulären Toxizität	20
2.9.5. Immunfluoreszenzfärbung	21
2.10. Molekularbiologische Methoden	22
2.10.1. Molekularbiologische Standardmethoden	22
2.10.2. Transformation von <i>P. pastoris</i>	22
2.10.3. Isolation von gesamt-RNA und Reverse Transkription	23
2.10.4. quantitative PCR (qRT-PCR)	23
2.11. Proteinbiochemische Methoden	24
2.11.1. Expression von isoQC in <i>P. pastoris</i>	24
2.11.2. Reinigung der isoQCs	26
2.11.3. Expression und Reinigung von GPP34 und VPS74	28

2.11.4.	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	29
2.11.5.	Western Blot-Analyse	30
2.11.6.	Bestimmung des Metallgehalts in Proteinen mittels TXRF	31
2.11.7.	Inaktivierung und Reaktivierung der m-isoQC	31
2.11.8.	CD-Spektroskopie	32
2.11.9.	Proteinextraktion und Konzentrationsbestimmung	32
2.11.10.	Co-Immunpräzipitation	33
2.12.	Enzymologische Methoden	34
2.12.1.	Bestimmung der isoQC Aktivität und der katalytischen Parameter des Umsatzes von Peptidsurrogaten	34
2.12.2.	Bestimmung der katalytischen Parameter für Peptide und physiologischen Substrate	35
2.12.3.	Bestimmung der Inhibitorkonstante (K_i)	36
2.12.4.	Untersuchung der pH Abhängigkeit	37
2.12.5.	QC/isoQC Aktivitätsbestimmung mit HPLC-UV	38
2.13.	Kristallisation	39
2.13.1.	Deglykosylierung von h-isoQC	39
2.13.2.	Initiales Pufferscreening	39
2.13.3.	Validierung und Variation der Pufferbedingungen	40
3.	Ergebnisse	41
3.1.	Heterologe Expression von isoQC in der Hefe <i>P. pastoris</i>	41
3.1.1.	Isolierung der h-isoQC nach heterologer Expression	42
3.1.2.	Heterologe Expression und Reinigung von m-isoQC und r-isoQC	46
3.2.	Untersuchungen zur Substrat – und Inhibitorspezifität von isoQC	48
3.2.1.	Vergleich der kinetischen Parameter des Substratumsatzes durch h-isoQC	48
3.2.2.	Vergleich der Substratspezifität von h-isoQC und h-QC	50
3.2.3.	Untersuchung der Substrat- und Inhibitorspezifität von m- und r-isoQC im Vergleich zur h-isoQC	52
3.2.4.	Vergleich der pH-Abhängigkeit der katalysierten Reaktion von m-isoQC und mQC	54
3.3.	Identifizierung der m-isoQC als Metalloenzym	56
3.4.	Kristallstruktur der humanen isoQC	58
3.4.1.	Kristallisation der deglykosylierten humanen isoQC	59
3.4.2.	Kristallstruktur der deglykosylierten h-isoQC	60
3.5.	Untersuchung der Expression von QC und isoQC in verschiedenen Zelllinien und „knockout“ Mauslinien	65
3.5.1.	Generierung und Charakterisierung spezifischer QC/isoQC-Antikörper	66

3.5.2.	Analyse der Expression von QC und isoQC in verschiedenen Zelllinien	67
3.5.3.	Detektion der QC/isoQC in verschiedenen Mausorganen	69
3.5.4.	Analyse des Einflusses der <i>knockouts</i> auf die Proteinexpression des entsprechenden Isoenzym	70
3.6.	Untersuchung der subzellulären Lokalisation von isoQC	72
3.6.1.	Analyse der subzellulären Lokalisation der isoQC aus Maus und Ratte	72
3.6.2.	Bedeutung des N-Terminus von Typ II-Membranproteinen für die Lokalisation im Golgi-Apparat	74
3.6.3.	Retentionsmotiv der h-isoQC in zytoplasmatischen Sequenz	76
3.6.4.	Retentionsmotiv der h-isoQC gleicht Vps74-Bindesequenz von Glykosyltransferasen aus Hefe	77
3.6.5.	Konservierung des Vps74 Bindemotivs in humanen Proteinen des Golgi-Apparates	78
3.6.6.	Einfluß des <i>knockdown</i> von GPP34 und GPP34R auf die Lokalisation von isoQC und GnT-IX	79
3.6.7.	Interaktionsuntersuchungen von GPP34 mit Proteinen des Golgi-Apparates durch Co-Immünpräzipitation	82
4.	Diskussion	84
4.1.	Enzymatische und strukurelle Eigenschaften von QC und isoQC	85
4.1.1.	Expression der isoQCs in <i>P. pastoris</i>	85
4.1.2.	Enzymatische Eigenschaften der Säuger-isoQCs im Vergleich mit den QCs	87
4.1.3.	Kristallisation und Strukturaufklärung von isoQC	90
4.2.	Die GPP34-vermittelte Retention von isoQC im Golgi-Apparat bedingt eine differentielle Substratumsetzung durch QC und isoQC	94
5.	Zusammenfassung	103
6.	Literaturverzeichnis	105
7.	Anhang	117
Wissenschaftliche Publikationen		128
Lebenslauf		129
Danksagung		130
Eidesstattliche Erklärung		131

Abkürzungsverzeichnis

AD	Alzheimer Demenz
AMC	7-Amino-4-Methylcoumarin
AOX	Alkoholoxidase Gen
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i>
BMGY	<i>Buffered glycerol complex Medium</i>
BMMY	<i>Buffered methanol complex Medium</i>
β -NA	L-Glutaminyl-2-Naphtylamin
B3GnT 5	Lactosylceramide 1,3-N-Acetyl- β -D-Glucosaminyltransferase
B4GalT 1	β -1,4-Galactosyltransferase 1
°C	Grad Celsius
CCL2	Monocyte Chemoattractant Protein 1, auch MCP-1
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CV	<i>Column volume</i> (Säulenvolumen)
Cy3	Cyanine 3 Farbstoff
DNA	Desribonukleinsäure
dNTP	Desribonukleosidtriphosphat
D-MEM	<i>Dulbecco´s Modified Eagle Medium</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>Enhanced green fluorescence protein</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> ; und andere
FAP	Fibroblasten-aktivierendes Protein
FBS	Fötales Kälberserum
FucT-III	Galactoside 3(4)-L-Fucosyltransferase
g	Gravitationskonstante
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GDH	Glutamatdehydrogenase
GF	Gelfiltration
GnT-IX	α -1,6-Mannosylglycoprotein 6- β -N-Acetylglucosaminyltransferase B
GPP34	Golgi Phosphoprotein 3, auch GOLPH 3
h	Human
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HRP	<i>Horse radish peroxidase</i>
IMAC	Immobilisierte Metall-Ionen Chromatographie
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid

isoQC	Isoenzym der Glutaminylyklase
ko	<i>Knockout</i>
Kre2	Glykolipid 2-alpha-mannosyltransferase
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
LDH	Laktatdehydrogenase
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
OD ₆₀₀	Optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pGAP	Pyroglutamylaminopeptidase
pGlu	Pyroglutamat
QC	Glutaminylyklase
rpm	<i>Rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RNA	Ribonukleinsäure
TFA	Tri-Fluoressigsäure
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TRH	Tyrothropin-releasing Hormon
ToPro3	Carbocyanin zellulärer Säurefarbstoff
TXRF	<i>Total reflection X-ray fluorescence</i>
UV	Ultraviolett
Vps74	<i>Vacuolar protein sorting-associated protein 74</i>
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
YPDS	<i>Yeast extract peptone dextrose medium</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1:	Schema der dreidimensionalen Strukturen der humanen QC (2AFM) und der QC aus <i>C. papaya</i> (pQC, 2FAW).	4
Abbildung 1-2:	Vergleich der Aminosäuresequenz von hQC und h-isoQC.	6
Abbildung 1-3:	Verteilung der isoQC innerhalb der Zelle und in verschiedenen Organen.	7
Abbildung 1-4:	Schema der Struktur des aktiven Zentrums der hQC (2AFM).	9
Abbildung 3-1:	Aminosäuresequenzvergleich der h-, m- und r-isoQC.	42
Abbildung 3-2:	Schematische Darstellung von h-isoQC-Varianten, welche nach heterologer Expression der cDNA isoliert wurden.	43
Abbildung 3-3:	Untersuchung der heterologen Expression von h-isoQC mittels Aktivitätstest und Western-Blot -Analyse.	45
Abbildung 3-4:	Charakterisierung der Reinigung von isoQC _(E60,I73N,C369A) N-His mittels SDS-PAGE.	46
Abbildung 3-5:	Darstellung der m-isoQC- (A) und r-isoQC Aktivität (B) im Medium verschiedener <i>P. pastoris</i> -Zelllinien, welche zuvor transformiert wurden.	47
Abbildung 3-6:	Analyse der Reinigungsschritte von m-isoQC _(E61,I74N) (A) und r-isoQC _(E61,I73N) N-His (B) mittels SDS-PAGE.	48
Abbildung 3-7:	Vergleich der kinetischen Parameter k_{cat}/K_M (A) und K_M (B) des Umsatzes verschiedener physiologischer Substrate durch h-isoQC und h-QC.	51
Abbildung 3-8:	Vergleich der Spezifitätskonstanten (k_{cat}/K_M) des Umsatzes verschiedener Substrate durch isoQCs aus Mensch, Maus und Ratte.	53
Abbildung 3-9:	Modell der Protonierungszustände von m-isoQC und des Substrates als Grundlage für die Auswertung der beobachteten pH-Abhängigkeit der katalytischen Effizienz des Enzyms.	54
Abbildung 3-10:	Abhängigkeit des katalytischen Parameters k_{cat}/K_M der Umsetzung von H-Gln-AMC durch mQC und m-isoQC _(E61,I74N) vom pH-Wert des Reaktionsansatzes unter Geschwindigkeitsbedingungen 2. Ordnung mit $[S] \ll K_M$.	56
Abbildung 3-11:	Untersuchung der Zinkbindung in der humanen isoQC.	58
Abbildung 3-12:	Foto von h-isoQC-Kristallen, erhalten aus einem Kristallisationsansatz von deglykosylierter h-isoQC in 0,1M NaCitrat, 0,1M Ammoniumsulfat pH 6,5 und 13% (w/v) PEG 35000.	60
Abbildung 3-13:	Anordnung der 11 Moleküle der h-isoQC innerhalb der asymmetrischen Einheit.	62
Abbildung 3-14:	Schema der Struktur eines h-isoQC Moleküls (Kette C). (A) Die h-isoQC weist eine α/β -Hydrolase-Faltung auf.	63
Abbildung 3-15:	Vergleich der Struktur von der asymmetrischen Einheit enthaltenen h-isoQC Moleküle.	64
Abbildung 3-16:	Detaillierte Darstellung der Lage von PQ50 im aktiven Zentrum sowie der potentiell interagierenden Aminosäuren (Darstellung als <i>sticks</i>).	65
Abbildung 3-17:	Aminosäuresequenzvergleich von mQC und m-isoQC.	66

Abbildung 3-18: Darstellung der Untersuchung von Spezifität und Sensitivität der Antikörper 5407 und 10269, welche gegen isoQC bzw. QC gerichtet sind.	67
Abbildung 3-19: Analyse der QC/isoQC-Expression in verschiedenen Zelllinien.	69
Abbildung 3-20: Untersuchung der mQC und m-isoQC Expression in verschiedenen Mausorganen.	70
Abbildung 3-21: Untersuchung der Expression von isoQC in QC-ko-Mäusen mittels Western-Blot-Analyse.	71
Abbildung 3-22: Charakterisierung der Expression von QC im Hirn von isoQC-ko-Mäusen.	72
Abbildung 3-23: Untersuchung der subzellulären Lokalisation von m/r-isoQC.	74
Abbildung 3-24: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Lokalisation von Fusionsproteinen.	76
Abbildung 3-25: Subzelluläre Lokalisation von Fusionsproteinen, welche die cytoplasmatische Sequenz von ST6Gal I- oder isoQC aufwiesen.	77
Abbildung 3-26: Subzelluläre Lokalisation von isoQC-FAP-Fusionsproteinen in LN405- und COS-7-Zellen im Vergleich zur Bindungsmotiv-Mutante.	78
Abbildung 3-27: Subzelluläre Lokalisation von GnT-IX-Fusionsproteinen in LN405- und COS-7-Zellen im Vergleich zur Bindungsmotiv-Mutante.	79
Abbildung 3-28: Untersuchung des Einflusses von GPP34 und GPP34R auf die Lokalisation von isoQC.	80
Abbildung 3-29: <i>Western Blot</i> -Analyse von Zelllysaten nach GPP34- und GPP34R <i>knockdown</i> .	81
Abbildung 3-30: Interaktionsanalysen von GPP34 und Golgi-Proteinen mittels Co-Immunpräzipitation.	83
Abbildung 4-1: Schematischer Vergleich verschiedener Kristallstrukturen der h-isoQC.	91
Abbildung 4-2: Vergleich der Orientierung des Inhibitors PQ50 im aktiven Zentrum von h-isoQC in verschiedenen Kristallstrukturen.	93
Abbildung 4-3: Hypothetisches Fließschema des Reifungsprozesses von pGlu-Hormonen oder –Proteinen einschließlich der potentiellen Funktion der QC und isoQC bei dieser Substratreifung.	95
Abbildung 4-4: Modell der Vps74 vermittelten Proteinsortierung und des PtdIns4P Signalwegs im Golgi-Apparat.	97
Abbildung 4-5: Aminosäuresequenzen des N-terminalen Bereiches verschiedener TyplI-Membranproteine.	98
Abbildung 4-6: Schematische Darstellung der Proteinoberfläche des M-GPP34-Dim/P, farblich markiert von grün zu rot.	101
Abbildung 4-7: Schematische Darstellung verschiedener putativer Retentionsformen von Golgi-Proteinen.	102
Abbildung 7-1: N-terminale Aminosäuresequenzen der untersuchten physiologischen Glutaminylzyklase-Substrate	119
Abbildung 7-2: Untersuchung der Spezifität sowie Sensitivität der m-isoQC Antikörper 6004.	120
Abbildung 7-3: Untersuchung der Spezifität sowie Sensitivität der mQC Antikörper 6001.	120

Abbildung 7-4:	Darstellung des Inhibitors PQ50 mit der dazugehörigen Elektronendichte.	121
Abbildung 7-5	Untersuchung der subzellulären Lokalisation der r-isoQC.	122
Abbildung 7-6:	Subzelluläre Lokalisation von N-terminalen Fragmenten der isoQC, ST6Gal I und FAP.	123
Abbildung 7-7:	Subzelluläre Lokalisation der ST6Gal I- und isoQC-FAP-Chimären in COS-7-Zellen.	124
Abbildung 7-8:	Subzelluläre Lokalisation der isoQC Bindungsmotivmutante (isoQC Cyt//FAPTM GPP34A EGFP) nach Transfektion in Cos-7 Zellen.	124
Abbildung 7-9:	Untersuchung des Einflusses der Mutation des GPP34-Bindemotivs (isoQC GPP34A) auf die Lokalisation der isoQC.	125
Abbildung 7-10:	Subzelluläre Lokalisation des N-Terminus von GnT-IX sowie der Variante ohne potentiell GPP34-Bindemotiv.	125
Abbildung 7-11:	3D und 2D-Darstellung der Bindung von PQ50 im aktiven Zentrum der h-isoQC von 2 Molekülen.	126
Abbildung 7-12:	Alternative Darstellung des M-GPP34-Dim/P-Komplexes aus Abbildung 4-6.	127

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Auswahl humaner, physiologisch aktiver Peptide mit N-terminalem pGlu-Rest.	2
Tabelle 2-1: Verwendete Chemikalien zur Herstellung der verschiedenen Medien.	15
Tabelle 2-2: Zusammensetzung der verwendeten Medien	15
Tabelle 2-3: Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	15
Tabelle 2-4: Verwendete Stämme	16
Tabelle 2-5: Verwendete Kits	16
Tabelle 2-6: Verwendete Plasmide	17
Tabelle 2-7: Verwendete Zelllinien und deren Ursprung	17
Tabelle 2-8: Verwendete Antikörper	18
Tabelle 2-9: Verwendete Pufferkits für screening von Kristallisationsbedingungen	18
Tabelle 2-10: Verwendete siRNAs	20
Tabelle 2-11: PCR-Programm der quantitativen PCR	24
Tabelle 2-12: Verwendete qRT-PCR Primer.	24
Tabelle 2-13: Reinigung der h-isoQC Varianten und r-isoQC nach Expression in Hefe.	27
Tabelle 2-14: Zusammensetzung der verwendeten Tris-Glycin-Gele	29
Tabelle 2-15: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur fluorimetrischen Bestimmung der QC-Aktivität.	35
Tabelle 2-16: Zusammensetzung der Reaktionsansätze zur spektrophotometrischen Bestimmung von K_M und V_{max} .	36
Tabelle 2-17: Struktur der untersuchten kompetitiven Inhibitoren.	37
Tabelle 2-18: HPLC Programm zur Trennung von pE- β NA und Q- β NA.	39
Tabelle 3-1: Bestimmung der kinetischen Parameter des Substratumsatzes durch verschiedene h-isoQC Varianten.	49
Tabelle 3-2: Inhibitor konstanten K_i der Hemmung von h-isoQC durch Imidazolderivate.	49
Tabelle 3-3: Inhibitor konstanten einiger Inhibitoren der humanen, Maus und Ratten isoQC.	53
Tabelle 3-4: Zusammenfassung der Datenerhebung aus der Messung eines h-isoQC Kristalls am Synchrotron (BESSY) sowie die dazugehörigen Statistiken der Datenbearbeitung und der Modellierung (Durchführung von D. Ruiz-Carillo).	61
Tabelle 4-1: Kinetische Parameter der Substratumsetzung durch humane und Maus isoQC im Vergleich zu den QC-Enzymen.	88
Tabelle 4-2: Inhibitor konstanten einiger Inhibitoren der humanen und Maus isoQC im Vergleich zu den QC-Enzymen.	89
Tabelle 7-1: Verwendete Oligonukleotide	117
Tabelle 7-2: Kinetische Parameter der Umsetzung verschiedener Substrate durch humane, Maus und Ratten isoQC.	119

1. Einleitung

1.1. Bildung und Rolle der N-terminalen Modifikation Pyroglutamat

Im Verlauf der Biosynthese sekretorischer Peptide und Proteine kommt es zu post-translationalen Modifikationen. Zu diesen gehören unter anderem proteolytische Spaltung, Glykosylierung, C-terminale Amidierung oder Phosphorylierung. Es können mit Hilfe einer proteolytischen Spaltung z.B. inaktive Vorläuferpeptide in die aktive Form überführt werden. Durch die Phosphorylierung wird die Aktivität von Proteinen modifiziert.

Eine weitere N-terminale Modifikation von z.B. Peptidhormonen ist die Bildung der zyklischen, nicht-proteinogenen Aminosäure Pyroglutamat (pGlu, 5-Oxo-L-Prolin). Diese kann aus Glutamin durch Deamidierung oder aus Glutamat durch Dehydratation gebildet werden (Abraham & Podell, 1981; Meister, 1985; Awade *et al.*, 1994). Die Peptidhormone Neurotensin, Gastrin, Thyrotropin-releasing Hormon (TRH) oder die Chemokine CCL2, CCL7, CCL8 beispielsweise tragen an ihrem N-Terminus einen Pyroglutamat-Rest, der aus Glutamin gebildet wird (Awade *et al.*, 1994; Garavelli *et al.*, 2001). In der nachfolgenden Tabelle 1-1 ist eine Auswahl bekannter physiologisch aktiver Peptide mit N-terminalem pGlu-Rest sowie deren Funktion dargestellt.

Die Zyklisierung des Glutamins oder Glutamats führt zu einem Verlust der Basizität am N-Terminus der Peptide, wodurch diese gegenüber N-terminalem Abbau stabilisiert werden. Im Fall von TRH und GnRH konnte gezeigt werden, dass sie dadurch eine erhöhte Halbwertszeit aufweisen. Außerdem ist für beide Peptidhormone der pGlu-Rest für die Bindung an spezifische Rezeptoren essentiell (Abraham & Podell, 1981; Morty *et al.*, 2006). Ähnliches konnte ebenfalls für CCL2 gezeigt werden. Neben der gesteigerten Stabilität gegenüber dem Abbau durch Aminopeptidasen führt der pGlu-Rest zu einer erhöhten chemotaktischen Aktivität des CCL2 (Van Coillie *et al.*, 1998; Cynis *et al.*, 2011).

Tabelle 1-1: Auswahl humaner, physiologisch aktiver Peptide mit N-terminalem pGlu-Rest.

Hormon	Funktion	Funktion des pGlu-Rest
Gastrin 17	Magenschleimhaut: Induktion der HCl-Sekretion; Pankreas: Freisetzung von Verdauungsenzymen; kontraktile Wirkung auf glatte Muskulatur des Magen-Darm-Traktes und Steigerung der Durchblutung.	unbekannt
Neurotensin	endokrine oder parakrine Rolle bei der Regulation des Fettstoffwechsels; kontraktile Wirkung auf glatte Muskulatur	unbekannt
Thyreoliberin	Regulator der Thyreotropinbiosynthese in der vorderen Hirnanhangsdrüse; Neurotransmitter / -modulator des zentralen und peripheren Nervensystems	Bindung und Stabilität
CCL2 (small inducible cytokine A2)	positive chemotaktische Wirkung auf Monozyten; verstärkt die anti-tumorale Aktivität von Monozyten; Rolle bei der Pathogenese von Monozyteninfiltration assoziierten Erkrankungen (Psoriasis, rheumatoide Arthritis, Atherosklerose)	Bindung und Aktivierung
FPP (<i>fertilisation promoting peptide</i>)	Thyreoliberin verwandtes Tripeptid des Seminalplasmas; mögliche Beteiligung bei der Regulation der Spermatogenese	unbekannt
Gonadoliberin	Stimulator der Sekretion von Gonadotropin, lutenisierendem und follikelstimulierendem Hormon	Stabilität

Ursprünglich wurde angenommen, dass die pGlu-Bildung nicht-enzymatisch und spontan abläuft, da die Zyklisierung von Glutamin unter physiologischen Bedingungen nachgewiesen werden konnte (Richter *et al.*, 1984). In späteren Untersuchungen wurde die Glutaminylyklase (QC) als physiologischer Katalysator identifiziert (Messer, 1963; Fischer & Spiess, 1987). Das Vorkommen der QC in Hypothalamus und Hypophyse zeigte zusätzlich, dass das Enzym mit TRH und GnRH in sekretorischen Vesikeln co-lokalisiert ist, was ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung an der pGlu-Bildung bei diesen Hormonen ist (Bockers *et al.*, 1995). In neueren *in vitro*-Untersuchungen der spontanen und QC-katalysierten pGlu-Bildung aus Glutamin wurde gezeigt, dass die enzymkatalysierte Reaktion um 2-3 Größenordnungen schneller abläuft (Seifert *et al.*, 2009). Dies unterstreicht weiterhin die Bedeutung der QC als physiologischer Katalysator der pGlu-Bildung. In Untersuchungen von QC *knockout*-Mäusen konnte allerdings auch die Bedeutung der spontanen Zyklisierung gezeigt werden. Die Untersuchung von QC *knockout*-Mäusen zeigte, dass keine deutlicher Phänotyp auftritt. Zusätzlich wurde z.B. die Bildung von pGlu-TRH

nachgewiesen. Es wird vermutet, dass die spontane Zyklisierung von Glutamin als eine Art Kompensationsmechanismus beim Verlust der QC-Aktivität fungiert (Schilling *et al.*, 2011).

1.2. Glutaminylzyklasen (QC)

1.2.1. Vorkommen und Funktion

Der erste Vertreter der Glutaminylzyklasen wurde 1963 aus der Pflanze *Carica papaya* isoliert (Messer, 1963). Obwohl die pflanzlichen QCs seit diesem Zeitraum bekannt sind, konnte ihnen bis heute noch keine eindeutige physiologische Funktion zugeordnet werden. In ersten Untersuchungen wurde die gesteigerte Bildung von Ammoniumionen durch QCs als Teil pflanzlicher Abwehrprozesse diskutiert (El Moussaoui *et al.*, 2001; Azarkan *et al.*, 2004). Neuere Untersuchungen weisen jedoch auf eine Funktion bei der Bildung pflanzlicher pGlu-Proteine hin (Schilling *et al.*, 2007b).

In den 1980er Jahren wurden orthologe Proteine in den Geweben verschiedener Säugetiere sowie auch im Menschen nachgewiesen (Busby, Jr. *et al.*, 1987; Fischer & Spiess, 1987). Die QCs von Mensch, Rind, Maus und Ratte weisen eine 80-90% Sequenzidentität auf (Schilling *et al.*, 2005).

Ein Vergleich der Primärstruktur pflanzlicher und tierischer QCs weist jedoch nicht auf Homologien hin. Der Unterschied in der Primärstruktur spiegelt sich auch in der Tertiärstruktur der Proteine wieder (siehe Abbildung 1-1). Die tierischen QCs weisen ein α/β -Hydrolase-Faltungsmuster auf, mit einer von α -Helices umgebenen zentralen β -Faltblattstruktur und einem katalytischen Zinkion im aktiven Zentrum. Untersuchungen an den QC-Enzymen aus *Drosophila melanogaster* ergaben ein sehr ähnliches Faltungsmuster (Schilling *et al.*, 2007a).

Im Gegensatz dazu besitzen die pflanzlichen QCs überwiegend eine β -Faltblattstruktur, mit einem fünfblättrigem β -Propeller, und nur zwei α -Helices (siehe Abbildung 1-1). Durch diese kompakte Struktur erlangen die pflanzlichen QCs eine hohe Stabilität gegenüber proteolytischem Abbau sowie chemischer und thermischer Denaturierung (Oberg *et al.*, 1998; Wintjens *et al.*, 2006). Zu dieser Gruppe der QCs zählen aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit die bakteriellen QCs (Huang *et al.*, 2010). Für pflanzliche und bakterielle QCs konnte ein metallunabhängiger Reaktionsmechanismus nachgewiesen werden. Aufgrund der fehlenden Homologie zwischen beiden Enzymklassen wird vermutet, dass sie auf verschiedene evolutionäre Vorläufer zurückgehen (Dahl *et al.*, 2000). Daher ist es bemerkenswert, dass tierische und pflanzliche QCs sehr ähnliche enzymatische Aktivitäten aufweisen. Tierische und pflanzliche QCs haben zudem ein ähnliches Molekulargewicht und werden im

Reifungsprozess glykosyliert (Schilling *et al.*, 2003a; Schilling *et al.*, 2005; Schilling *et al.*, 2007b).

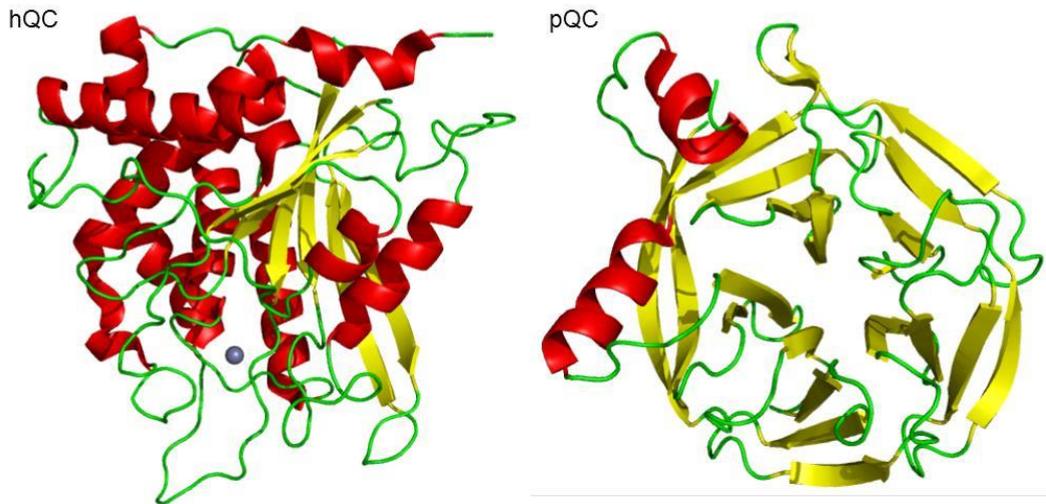


Abbildung 1-1: Schema der dreidimensionalen Strukturen der humanen QC (2AFM) und der QC aus *C. papaya* (pQC, 2FAW).

In den Darstellungen sind die α -Helices in rot, die β -Faltblätter in gelb und die *loops* in grün zu sehen. Das katalytisch aktive Zinkion in der hQC ist als graue Kugel gekennzeichnet. (Huang *et al.*, 2005a; Wintjens *et al.*, 2006)

Die QCs der Säuger (EC 2.3.2.5) weisen eine strukturelle Verwandtschaft zu den zinkabhängigen Aminopeptidasen des Clans MH auf (Booth *et al.*, 2004). Das charakteristische Zinkbindungsmotiv dieser Enzyme, gebildet aus His-Asp-Glu-Asp-His, ist auch in der Sequenz der Glutaminylzyklasen konserviert (Schilling *et al.*, 2003b). Diese bakteriellen Aminopeptidasen benötigen zwei Zinkionen im aktiven Zentrum um die volle katalytische Aktivität auszuprägen. Im Gegensatz dazu konnten Untersuchungen zum Zinkgehalt der Maus QC (mQC), humanen QC (hQC) und der QC aus *Drosophila melanogaster* zeigen, dass diese Enzyme nur ein Zinkion im aktiven Zentrum gebunden haben (Schilling *et al.*, 2003b; Schilling *et al.*, 2005; Schilling *et al.*, 2007a). Es wird vermutet, dass die QCs evolutionär aus einer Aminopeptidase hervorgegangen sind und eine partielle Umgestaltung der Proteinstruktur in dem Verlust einer Zinkbindungsstelle resultierte.

Die Konservierung der tierischen QCs spiegelt sich in einer ähnlichen Substrat- sowie Inhibitorspezifität wieder (Schilling *et al.*, 2005). Die QCs haben ein breites Substratspektrum, wobei längere Peptide mit hydrophoben Resten an zweiter oder dritter Position mit höherer Effizienz umgesetzt werden (Schilling *et al.*, 2003b; Schilling *et al.*, 2005). Die geringe Selektivität ist vermutlich für die Bildung der verschiedensten pGlu-Hormone von essentieller Bedeutung, wobei die Umsetzung der Glutaminsubstrate bei einem pH Optimum zwischen 7,5 und 8 erfolgt.

In verschiedenen Untersuchungen zur kompetitiven Inhibierung der QCs konnten sowohl Imidazol und -derivate sowie Cysteamine als Inhibitoren der Enzymaktivität

identifiziert werden (Schilling *et al.*, 2005). Die Inhibierung der QC durch Imidazol und dessen Derivate ist von einem deprotonierten Ringstickstoff abhängig, der mit dem Zinkion interagiert. Bei der Inhibierung durch Cysteamin Derivate sind sowohl die Amino- als auch Thiolgruppe von essentieller Bedeutung (Schilling *et al.*, 2005).

Neben der Fähigkeit der QC bei schwach basischem pH-Wert die pGlu-Bildung aus N-terminalem Glutamin zu katalysieren, ist das Enzym auch in der Lage bei saurem pH-Wert (pH von 6) Glutamylreste zu zyklisieren. Dies geschieht unter Freisetzung von Wasser. Die Umsatzraten von Glutamat-Substraten sind allerdings um mehr als drei Größenordnungen niedriger als bei Glutamin (Schilling *et al.*, 2004). Durch diese katalysierte Nebenreaktion wird die QC in Zusammenhang mit pathophysiologischen Prozessen gebracht wie z.B. der Alzheimer Krankheit, worauf später noch detaillierter eingegangen wird.

1.2.2. Das Isoenzym der tierischen Glutaminylzyklase

Im Verlauf der Charakterisierung der Säuger-Glutaminylzyklasen konnte mittels Homologievergleich ein katalytisch aktives Isoenzym (h-isoQC) identifiziert werden (Koch, 2006). Ein Sequenzvergleich der h-isoQC mit der hQC zeigt eine Sequenzidentität von 46% (siehe Abbildung 1-2). Die Unterschiede zwischen den beiden Enzymen sind hauptsächlich am N-Terminus zu finden. Die hQC trägt eine Signalsequenz für den co-translationalen Transport ins Endoplasmatische Retikulum (Schilling *et al.*, 2003b). Die h-isoQC wird, vermittelt durch einen Signalanker im N-terminalen Bereich, ebenfalls in das ER transloziert.

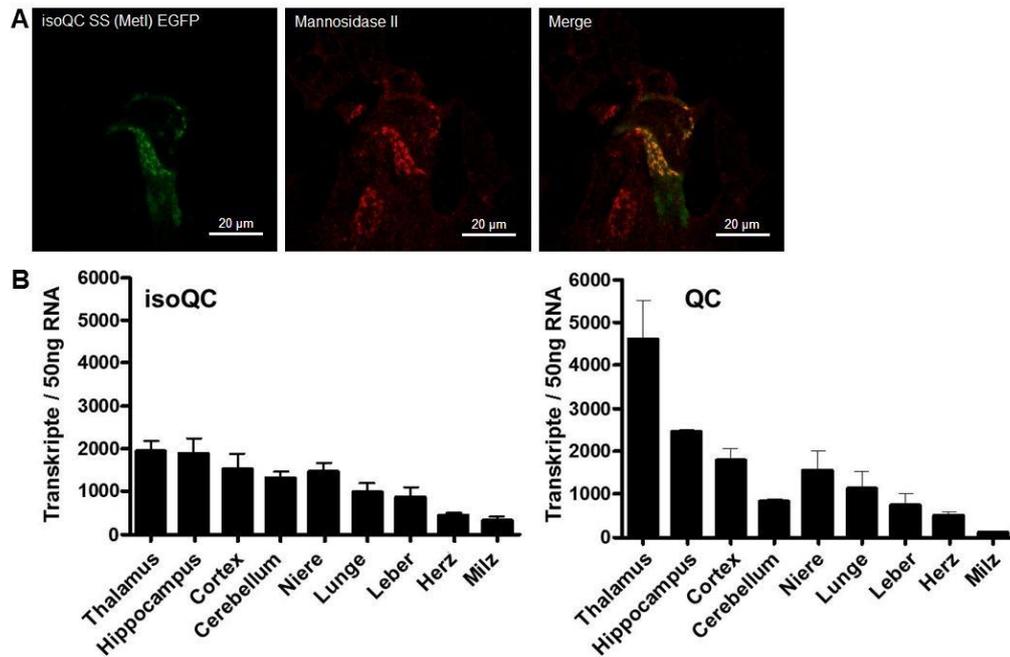


Abbildung 1-3: Verteilung der isoQC innerhalb der Zelle und in verschiedenen Organen.

A) Subzelluläre Lokalisation des h-isoQC N-Terminus (Met1-Ser53) fusioniert mit einem EGFP im Golgi-Apparat. Bestimmung des Zellkompartimentes erfolgte durch Co-Färbung mit Mannosidase II Antikörper. B) Untersuchung der Transkriptmenge der m-isoQC im Vergleich zu mQC in verschiedenen Mauseorganen. Abbildung nach (Cynis *et al.*, 2008a)

Durch den Aminosäuresequenzvergleich von hQC und h-isoQC wird eine hohe Konservierung im C-terminalen Bereich (bis zu 60% Sequenzidentität) deutlich. Dies spiegelt sich auch in initialen Untersuchungen zur Substrat- und Inhibitorspezifität von h-isoQC im Vergleich zur hQC wieder. So wurde die gleiche Spezifität gegenüber verschiedenen Substraten, Präferenz für hydrophobe Aminosäuren an Position zwei oder drei des Substrates festgestellt sowie eine sehr ähnliche Hemmung der Aktivität durch Imidazol und Imidazolderivate beobachtet (Cynis *et al.*, 2008a; Stephan *et al.*, 2009). Dies lässt einen ähnlichen Aufbau der aktiven Zentren und die Beteiligung eines Zink-Ions an der Katalyse vermuten. Unterschiede im Mikromilieu des aktiven Zentrums können aus unterschiedlichen K_i -Werten potenter Inhibitoren, u.a. 1-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-3-(3-imidazol-1-yl-propyl)-thioharnstoff (PQ50) geschlossen werden (Stephan, 2007).

In weiteren Analysen wurde auch in *Drosophila melanogaster* ein Isoenzym (isoDromeQC) identifiziert (Schilling *et al.*, 2007a). Es zeigte sich bei der Untersuchung der subzellulären Lokalisation von DromeQC und isoDromeQC, dass auch diese beiden Enzyme in der Zelle unterschiedlich lokalisiert sind. Es wurde für die DromeQC eine Sekretion ins Medium, wie das schon für die Säuger QCs gezeigt wurde, nachgewiesen. Die isoDromeQC hingegen ist innerhalb der Mitochondrien-Membran zu finden. Diese Beobachtung unterstützt die Annahme, dass QC und isoQC aufgrund verschiedener Lokalisationen unterschiedliche Substrate umsetzen, wohingegen die

katalytischen Parameter sehr ähnlich sind. Anhand von detaillierten Untersuchungen der Substrat- und Inhibitorspezifität sowie der pH-Abhängigkeit zeigte sich, dass die isoDromeQC den Enzymen aus Säugern mehr ähnelt als die DromeQC (Schilling *et al.*, 2007a).

Schon durch die ersten Untersuchungen zur Säuger QC konnte gezeigt werden, dass die Katalyse einer Michaelis-Menten-Kinetik folgt (Fischer & Spiess, 1987). Der Mechanismus der Substratumsetzung wurde anschließend in Grundzügen aufgeklärt (Schilling *et al.*, 2005). Der Stickstoff der freien α -Aminogruppe des Glutamins greift den γ -Carbonylkohlenstoff der Seitenkette nukleophil an, woraufhin es zum Ringschluss und zur Abspaltung von Ammoniak kommt. Trägt das Substrat ein Glutamat erfolgt die Zyklisierung gleichermaßen, allerdings wird anstelle von Ammoniak Wasser freigesetzt. Eine unprotonierte α -Aminogruppe ist in jedem Fall eine Voraussetzung für die Substratbindung und die γ -Aminogruppe der Seitenkette muss in entsprechender Entfernung und passendem Winkel zur Aminogruppe liegen, um den Substratumsatz zu ermöglichen (Schilling *et al.*, 2005). Es wird vermutet, dass sich nach dem intramolekularen Angriff der α -Aminogruppe ein tetraedrisches Intermediat bildet, welches eventuell durch das Enzym stabilisiert wird, bevor es in pGlu und Ammoniak zerfällt (Schilling *et al.*, 2004).

Eine essentielle Rolle bei der Katalyse spielt das Zink-Ion im aktiven Zentrum, da die tierischen QCs nach dem Entfernen des Zink-Ions durch die Behandlung mit heterozyklischen Chelatoren inaktiv sind (Schilling *et al.*, 2003b; Schilling *et al.*, 2007a; Cynis *et al.*, 2008a). Durch die Aufklärung der Struktur von hQC und mQC wurde gezeigt, dass das Zink-Ion im aktiven Zentrum durch die Aminosäuren Asp, Glu und His (bei hQC 159, 202 und 330, bei der mQC 160, 203 und 331) koordiniert wird (Abbildung 1-4; Huang *et al.*, 2005a; Ruiz-Carrillo *et al.*, 2011). Diese Zink-bindenden Aminosäuren sind innerhalb aller tierischen QCs konserviert. Die vierte Koordinationsstelle wird durch ein Wassermolekül besetzt, welches bei der Bindung des Substrates verdrängt wird (Huang *et al.*, 2005a; Ruiz-Carrillo *et al.*, 2011). Es wird angenommen, dass das Zink-Ion mit der γ -Carbonylgruppe des Glutamylrestes des Substrates interagiert, wodurch es zu einer Erhöhung der Polarität der Carbonylgruppe kommt und der nukleophile Angriff der Aminogruppe beschleunigt wird (Schilling *et al.*, 2005).

Basierend auf Informationen der Kristallstruktur wurden von Huang *et al.* 2005 Mutationsanalysen durchgeführt, um einen möglichen Einfluss von Aminosäuren im aktiven Zentrum auf die Katalyse zu untersuchen. Es wurde postuliert, dass es während der Katalyse zum Protonentransfer zwischen Glu201, Asp248 und Asp305, als geschwindigkeitsbestimmender Schritt kommt (siehe Abbildung 1-4). Dies wurde

durch ein in der Kristallstruktur bestehendes Wasserstoffbrücken-Netzwerk begründet, wobei eine Unterbrechung der Wasserstoffbrücken zwischen Asp248-Asp305 oder Glu201-Asp305, durch Mutation der Aminosäuren, zu einem dramatischen Verlust der katalytischen Aktivität führte. Eine primäre Beteiligung von Asp305 an der Katalyse ist sehr wahrscheinlich, da der Austausch zu einer Erhöhung des K_M -Wertes und zu Verringerung des k_{cat} -Wertes führte (Huang *et al.*, 2008).

In neueren Untersuchungen mit der isoDromeQC zum Katalysemechanismus wurden andere Ergebnisse erhalten. Es konnten keine Lösungsmittelisotopieeffekte, die bei einem geschwindigkeitsbestimmenden Protonentransfer zu erwarten wären, gefunden werden. Zusätzlich wurde anhand von Elektronenspinresonanzspektroskopie (ESR), und *stopped-flow*-Absorptionsspektroskopie mit isoDromeQC, welche Kobalt an Stelle von Zink im aktiven Zentrum hatte, gezeigt, dass sich ein sehr kurzlebiges Reaktionsintermediat bildet und die Dissoziation des pGlu-Produktes der geschwindigkeitsbestimmende Schritt zu sein scheint (Seifert *et al.*, 2015).

Erste Untersuchungen zur Produktinhibierung der hQC scheinen die Dissoziation des pGlu-Produktes als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt auch für die Säuger QCs zu bestätigen (Weichler, 2012).

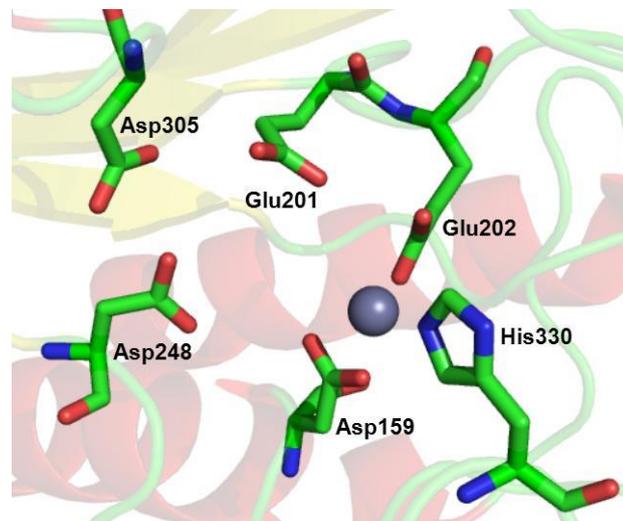


Abbildung 1-4: Schema der Struktur des aktiven Zentrums der hQC (2AFM).

Die Aminosäuren des Zink-Bindungsmotivs (Asp159, Glu202, His330) sowie weitere Aminosäuren des aktiven Zentrums sind als *sticks* und das katalytische Zink-Ion in Form einer grauen Kugel hervorgehoben (Huang *et al.*, 2005a).

1.3. Rolle von QC/isoQC in pathophysiologischen Prozessen

1.3.1. Rolle der QC in der Alzheimer Erkrankung

Wie bereits erwähnt katalysiert die QC die pGlu-Bildung am N-Terminus einiger physiologischer Peptide. Einige dieser Peptide sind involviert in pathophysiologischen

Prozessen wie z.B. bei Amyloidosen. Diese sind bekannt durch Ablagerung modifizierter Peptide. Zu den Amyloidosen zählt die Alzheimer-Krankheit welche u.a. durch eine Ablagerung von pGlu-A β charakterisiert ist.

Die Alzheimer-Krankheit wurde erstmals 1906 durch Dr. Alois Alzheimer beschrieben, der seine Patientin Auguste Deter untersuchte (Alzheimer *et al.*, 1995). Die typischen Symptome sind Störung des Kurz- und Langzeitgedächtnisses, Depressionen, Orientierungslosigkeit, Halluzinationen, Sprachstörungen und Verhaltensänderungen. Im Endstadium der Krankheit verlieren die Patienten die Kontrolle über sämtliche Körperfunktionen und es kommt in den meisten Fällen nach fünf bis zehn Jahren zum Tod. Die Krankheit zeichnet sich außerdem durch einen fortschreitenden Verlust von Neuronen aus. Durch die stetig ansteigende Lebenserwartung des Menschen nimmt die Zahl der neurodegenerativen Erkrankungen, zu denen auch die Alzheimer Krankheit (AD) zählt, stetig zu. So sind allein in Deutschland ca. 1,3 Millionen Männer und Frauen an einer Demenz erkrankt und es wird geschätzt, dass es bis 2050 etwa 2,6 Millionen Menschen sein werden.

Die charakteristischen histopathologischen Merkmale der AD sind neurofibrilläre Bündel innerhalb der Nervenzellen sowie amyloide Plaques im extrazellulären Raum der Neuronen. Diese Merkmale treten zuerst im Hippocampus und der Hirnrinde auf. Beim Fortschreiten der Krankheit sind die Bündel und Plaques auch in anderen Gehirnregionen zu finden.

Bei den neurofibrillären Bündeln, auch *tangles* genannt, handelt es sich um Ablagerungen des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986). Tau ist für Transport und Stabilisierung der Mikrotubuli zuständig. Es kann durch verschiedene Kinasen phosphoryliert werden, wodurch es nicht mehr an die Mikrotubuli binden kann (Illenberger *et al.*, 1998). Eine Hyperphosphorylierung führt zu einer erhöhten Aggregationsneigung des Tau-Proteins und schließlich zur *tangle*-Bildung (Fibrillen bzw. Filamente - auch PHFs genannt), welche dann toxisch auf die Zellen wirken (Patrick *et al.*, 1999).

Die amyloiden Plaques bestehen hauptsächlich aus aggregierten β -Amyloid-Peptiden (A β). Diese werden aus dem Amyloid-Vorläuferprotein (APP) gebildet (Goldgaber *et al.*, 1987; Kang *et al.*, 1987). Die physiologische Funktion des A β -Peptides ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Es wird dem Peptid u.a. eine Funktion als antimikrobielles Peptid, oder ein Schutz vor oxidativem Stress und auch eine Funktion in der Gedächtnisbildung innerhalb verschiedener Untersuchungen zugeschrieben (Zou *et al.*, 2002; Soscia *et al.*, 2010; Morley *et al.*, 2010).

In diesen Plaques ist das A β -Molekül N-terminal modifiziert. Es konnte schon 1995 durch Saido *et al.* gezeigt werden, dass innerhalb familiären Demenzen wie familiäre

Britische Demenz (FBD) und familiäre Dänische Demenz (FAD) 25-50% der A β -Moleküle ein pGlu am N-Terminus besitzen (Saido *et al.*, 1996). Diese entstehen aus der Modifizierung nach der APP Spaltung und es handelt sich dabei um Fragmente mit dem Namen pGlu-A β (3-40/42) und pGlu-A β (11-40/42) (Saido *et al.*, 1995; Saido *et al.*, 1996; Vidal *et al.*, 1999; Harigaya *et al.*, 2000). Der pGlu-Rest entsteht aus der Zyklisierung von Glutamat. Da die Halbwertszeit der spontanen Zyklisierung von Glutamat zu Pyroglutamat *in vivo* und *in vitro* Jahre beträgt, liegt es nahe, dass es sich dabei um eine Enzym-katalysierte Reaktion handelt (Schilling *et al.*, 2004; Schilling *et al.*, 2008a; Cynis *et al.*, 2008b; Seifert *et al.*, 2009).

Der pGlu-Rest verleiht den A β -Peptiden eine Hydrophobizität, die zu einer verringerten Löslichkeit im Basischen führt. Zudem scheint er auch einen Einfluss auf die Sekundärstruktur des Proteins zu haben und dadurch auch auf die Plaque-Morphologie (Schlenzig *et al.*, 2009). Der pGlu-Rest am N-Terminus schützt außerdem das A β -Peptid vor dem proteolytischen Abbau durch Aminopeptidasen. Zusätzlich zeigte sich, dass pGlu-A β aufgrund der veränderten biophysikalischen Eigenschaften als ein Keim für die Aggregation anderer A β -Spezies fungiert (Schilling *et al.*, 2006; Nußbaum *et al.*, 2012). Bis heute konnte nicht vollständig aufgeklärt werden, welche A β -Spezies toxisch auf die Neuronen wirken. So wurde in Untersuchungen gezeigt, dass intraneuronales pGlu-A β zur Neurodegeneration im Mausmodell führten (Wirhth *et al.*, 2009). Andere Analysen zeigten, dass lösliche Oligomere toxisch auf die Zellen wirken können (Klein, 2002; Nussbaum *et al.*, 2012; Schlenzig *et al.*, 2012). In diesen Analysen wurde geschlussfolgert, dass die Zytotoxizität von pGlu-A β auf einem Tau-abhängigen Mechanismus beruht und zu einer Missfaltung von A β 1-42 führt (Nussbaum *et al.*, 2012).

Anhand der Untersuchungen zu pGlu-A β -Peptiden kann geschlussfolgert werden, dass verstärkte Pyroglutamatbildung eine Ursache für AD darstellen könnte. Die Inhibierung der QC könnte die pGlu-A β -Bildung hemmen, wodurch es zum verstärkten proteolytischen Abbau von nicht aggregiertem A β kommt. Mit Hilfe von Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen wurden bereits potente kompetitive Inhibitoren der QC entwickelt (Buchholz *et al.*, 2006). Erste Erfolge zur Inhibierung der QC-Aktivität und somit zur Reduktion der pGlu-A β -Bildung wurden sowohl in Zellkulturuntersuchungen als auch im Tiermodell gezeigt (Cynis *et al.*, 2006; Schilling *et al.*, 2008a). Zusätzlich konnte eine Verminderung der Alzheimer-Pathologie im Mausmodell durch QC-Inhibitor-Gabe erreicht werden (Schilling *et al.*, 2008b). Anhand dieser Untersuchungen wird ein von der Probiobdrug AG hergestellter QC-Inhibitor z.Z. in der klinischen Entwicklung verwendet.

1.3.2. Rolle der QC/isoQC in inflammatorischen Erkrankungen

Neben pGlu-Amloidpeptiden kommen auch zahlreiche Chemokine in inflammatorischen Prozessen vor, deren N-Terminus durch pGlu modifiziert ist.

Das Chemokin CCL2, auch bekannt unter dem Namen *Monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), wird mit verschiedenen inflammatorischen Erkrankungen wie z.B. Arteriosklerose (Charo & Taubman, 2004), Multiple Sklerose (Tanuma *et al.*, 2006), Rheumatoide Arthritis (Rantapaa-Dahlqvist *et al.*, 2007) und der Alzheimer-Krankheit (Ishizuka *et al.*, 1997; Galimberti *et al.*, 2006) in Verbindung gebracht.

CCL2 ist ein sogenanntes CC-Chemokin und wird in einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen exprimiert, wobei Monozyten und Makrophagen eine Hauptquelle der CCL2-Bildung darstellen (Yoshimura *et al.*, 1989). Die Bildung erfolgt sowohl konstitutiv als auch durch Induktion von oxidativem Stress, Zytokinen oder Wachstumsfaktoren (Deshmane *et al.*, 2009). Nach der Sekretion des CCL2 in den extrazellulären Raum bindet es an Glukosaminoglykane der extrazellulären Matrix. Dadurch baut sich ein CCL2-Gradient auf, der in Richtung der entzündeten Stelle zunimmt und für das Anlocken der Immunzellen wichtig ist (Proudfoot *et al.*, 2003; Lau *et al.*, 2004). Außerdem wird CCL2 auch am Endothel der Blutgefäße gebunden und vermittelt dadurch die Rekrutierung von Immunzellen aus dem Blutkreislauf (Ni *et al.*, 2004). Die Bindung erfolgt an einen spezifischen Rezeptor - das CCR2, ein G-Protein gekoppelter Rezeptor der nach Dimerisierung verschiedene Signalkaskaden auslöst (Montecarlo & Charo, 1997; Rodriguez-Frade *et al.*, 1999).

In verschiedenen Struktur-Aktivitätsuntersuchungen wurde gezeigt, dass ein intakter N-Terminus von CCL2 für das Anlocken von Monozyten essentiell ist. So kann das CCL2 nach Verkürzung oder Verlängerung des N-Terminus zwar noch an den Rezeptor binden, aber es kommt zu einer Reduzierung bzw. einem Verlust der chemotaktischen Aktivität (Zhang *et al.*, 1994; Masure *et al.*, 1995; Proost *et al.*, 1998; Hemmerich *et al.*, 1999).

Ein charakteristisches Merkmal am N-Terminus aller CC-Chemokine (CCL2, CCL7, CCL8 und CCL13) ist ein pGlu-Rest. Dieser pGlu-Rest scheint bei den Chemokinen eine protektive Funktion zu besitzen, wodurch es zu einer Stabilisierung der chemotaktischen Aktivität kommt (Van Damme *et al.*, 1999). Zumindest CCL2 und CCL8 sind durch den N-terminalen pGlu-Rest vor einer Spaltung durch die Aminopeptidase DP4 geschützt (Van Coillie *et al.*, 1998; Cynis *et al.*, 2011). Durch eine Unterdrückung der pGlu-Bildung könnte die chemotaktische Aktivität von CCL2 in den verschiedenen Krankheitsgeschehen moduliert werden.

Erste Erfolge wurden durch die Inhibierung der QC/isoQC-Aktivität im arteriosklerotischen Mausmodell erhalten (Cynis *et al.*, 2011). Diese Untersuchungen

zeigten, dass in der Maus die isoQC die Katalyse des pGlu-Restes am CCL2 übernimmt. Innerhalb von isoQC-*knockout*-Mäusen kommt es zu einer signifikanten Reduktion der pGlu-CCL2 Bildung nach Induktion einer Peritonitis (Cynis *et al.*, 2011). Im Gegensatz dazu wurde mit Hilfe eines anderen Versuchsaufbaus in humanen Zellen postuliert, dass die QC für die Katalyse von humanem pGlu-CCL2 verantwortlich ist (Haegele, 2012). Dementsprechend ist bisher unklar, ob QC oder isoQC für die pGlu-Bildung am humanen CCL2 zuständig ist. Allerdings konnte auch innerhalb dieser Versuche gezeigt werden, dass die Inhibierung der QC/isoQC eine Möglichkeit zur Regulierung der chemotaktischen Aktivität des CCL2 darstellt (Cynis *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2011).

1.4. Zielstellung der Arbeit

Da eine Beteiligung von pGlu-modifizierten Peptiden innerhalb verschiedener pathophysiologischer Prozesse nachgewiesen werden konnte, stellt die Reduktion der Mengen an pGlu-Peptiden einen neuen Ansatz zur Behandlung dieser Krankheiten dar. Eine Verminderung könnte durch die Inhibierung der QC und isoQC erreicht werden. Für eine effiziente Inhibitorentwicklung ist eine Charakterisierung der Enzyme von essentieller Bedeutung. Erste QC-Inhibitoren befinden sich in der Phase II der klinischen Prüfung.

Im Rahmen der Entwicklung von QC-Inhibitoren als Wirkstoffe bestand das Ziel, die isoQCs aus Säuger zu exprimieren und zu charakterisieren. Für die Analyse der enzymatischen Eigenschaften der humanen, Maus und Ratten isoQC hinsichtlich ihrer Substratspezifität, Inhibitorspezifität und der Zinkabhängigkeit der Katalyse sollte die Expression der isoQC in der Hefe *Pichia pastoris* etabliert werden. Neben der enzymatischen Charakterisierung sollte eine strukturelle Analyse der h-isoQC mit Hilfe von Co-Kristallisation mit kompetitivem Inhibitor, für eine detaillierte Untersuchung des aktiven Zentrums, erfolgen.

Ein weiteres Ziel der Arbeit bestand in der Aufklärung der isoQC Lokalisation in Geweben sowie im zellulären Kompartiment. Hierfür wurden Antikörper gegen QC und isoQC hergestellt. Mit Hilfe dieser war die Untersuchung der QC/isoQC Gewebeverteilung in verschiedenen Mausorganen mit unterschiedlichem genetischem Hintergrund vorgesehen.

Da ein Hauptunterschied zwischen QC und isoQC in der subzellulären Lokalisation liegt, sollte anhand der Antikörper auch dies untersucht werden. Dies bezog sich zum einen auf die Lokalisation bzw. Expression der QC und isoQC innerhalb verschiedener Zelllinien und zum anderen auf die subzelluläre Lokalisation der isoQC. Da für die Golgi-Enzyme kein eindeutiges Retentionssignal bekannt ist, erfolgte eine Identifizierung eines möglichen Retentionssignals für die isoQC und andere Enzyme im Golgi-Apparat.

2. Material und Methoden

2.1. Nährmedien

Tabelle 2-1: Verwendete Chemikalien zur Herstellung der verschiedenen Medien.

Chemikalien	Hersteller
Pepton	Duchefa Biochemie
Hefeextrakt	Duchefa Biochemie
NaCl	Roth
Agar	Roth
Glukose	Roth
Sorbitol	Roth
KH ₂ PO ₄	Roth
YNB	Difco
Biotin	Roth
Glycerol	Roth
Methanol	Roth

Tabelle 2-2: Zusammensetzung der verwendeten Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB-Medium	1% Pepton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl
LB-Agar	1% Pepton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl, 1,5% Agar
YPDS-Medium	2% Pepton, 1% Hefeextrakt, 2% Glukose, 1M Sorbitol
YPDS-Agar	2% Pepton, 1% Hefeextrakt, 2% Glukose, 1M Sorbitol, 1,5% Agar
BMGY-Medium	2% Pepton, 1% Hefeextrakt, 100mM KH ₂ PO ₄ (pH=6), 1,34% YNB, 4*10 ⁻⁵ % Biotin, 1% Glycerol
BMMY-Medium	2% Pepton, 1% Hefeextrakt, 100mM KH ₂ PO ₄ (pH=6), 1,34% YNB, 4*10 ⁻⁵ % Biotin, 0,5% Methanol

2.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2-3: Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien/Verbrauchsmaterialien	Hersteller
DMEM high Glucose-Medium	Invitrogen
RPMI 1640 Medium	Invitrogen
DMEM F12 Medium	Invitrogen
Trypsin/EDTA Lösung	Invitrogen
Agarose	PeqLab
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich
Zeozin	Duchefa Biochemie D.V.

Bromphenolblau	Serva
dNTPs	Promega
Prestained Protein Ladder	Fermentas
Marker Agarose-Gel	PeqLab
Restriktionsenzyme	NEB
6xLadepuffer Agarose-Gel	PeqLab
Super Signal West Pico/FemtoChemilumineszenz	Thermo Scientific
PBS	PAA (cell culture company)
Fluorescent Mounting Medium	Dako
ToPro®3	Invitrogen
Bradfordreagenz	Fermentas

Weitere Standardchemikalien sind nicht detailliert aufgeführt, wurden aber von der Firma Roth bezogen.

2.3. Verwendete Stämme

Tabelle 2-4: Verwendete Stämme

Stämme	Genotyp	Quelle
<i>P. pastoris</i> X-33	<i>Pichia pastoris</i> wildtyp	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B m_B) gal dcm me131</i> (DE3)	Novagen

2.4. Komerziell gefertigte Präparationsmaterialien (Kits)

Tabelle 2-5: Verwendete Kits

Bezeichnung	Name	Hersteller
Plasmid Mini-Präparations-Kit	GeneJeET™ Plasmid Miniprep / ZR Plasmid Miniprep™	Fermentas Life Science / Zymo Research
Plasmid Midi-Präparations-Kit	JETstar Plasmid Purification MIDI Kit/25	Genomed
Maxi-Präparations-Kit	EndoFree® Plasmid MaxiKit	Qiagen
RNA-Isolations-Kit	RNA-Isolationskit	MACHERAY-Nagel
Gelextraktions-Kit	Gel Extraction Kit	Genomed
PCR-Reinigungs-Kit	PCR Purification Kit	Genomed
LDH-Toxizitäts-Kit	CytoTox-One™	Promega

2.5. Plasmide

Tabelle 2-6: Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Quelle
pPICZ α A	live technologies
isoQC _(F48;C369) C-His pPICZ α A	(Cynis <i>et al.</i> , 2008a)
isoQC _(F48;I73N) N-His pPICZ α A	(Cynis <i>et al.</i> , 2008a)
isoQC _(F48;I73N;C369A) N-His pPICZ α A	(Cynis <i>et al.</i> , 2008a)
m-isoQC pcDNA	(Cynis <i>et al.</i> , 2008a)
r-isoQC pcDNA	Probiodrug
pPCR-Script Cam SK(+)-Vektor	Agilent Technologies
pJet-Cloning-Vektor	Fermentas
pcDNA (3.1) EGFP	(Karcher, 2010)
FAP pcDNA (3.1) EGFP	(Karcher, 2010)
ST6Gal I pcDNA (3.1) EGFP	(Reimann, 2011)
GnT-IX pcDNA (3.1) EGFP	(Reimann, 2011)

2.6. Verwendete Zelllinien

Tabelle 2-7: Verwendete Zelllinien und deren Ursprung

Zelllinie	Charakterisierung
HEK293	embryonale Nierenzellen, <i>Homo sapiens</i> (Graham <i>et al.</i> , 1977)
LN405	Astrozyten, <i>Homo sapiens</i> (Bodmer <i>et al.</i> , 1989)
COS-7	westliche grüne Meerkatze, Nierenzellen, <i>Chlorocebus sabaeus</i> (Gluzman, 1981)
SY5Y	Neuroblastom, <i>Homo sapiens</i> (Jalava <i>et al.</i> , 1990)
THP-1	Akute monozytäre Leukämie, <i>Homo sapiens</i> (Tsuchiya <i>et al.</i> , 1980)
PA-TU 8988S	pankreatisches Adenokarzinom, <i>Homo sapiens</i> (Elsasser <i>et al.</i> , 1992)
A549	Lungenkarzinom, <i>Homo sapiens</i> (Giard <i>et al.</i> , 1973)
HUVEC	„umbilical vein endothelial“ Zellen, <i>Homo sapiens</i> ; Firma Lonza präp.
U343	Glioblastom, <i>Homo sapiens</i> (Vaheri <i>et al.</i> , 1976)
N2A	Neuroblastom, <i>Mus musculus</i> (Olmsted <i>et al.</i> , 1970)
RAW	Makrophagen, <i>Mus musculus</i> (Ralph & Nakoinz, 1977)
Lewis	Lungenkarzinom, <i>Mus musculus</i> (Mayo, 1972)
L929	Fibroblasten, <i>Mus musculus</i> (Evans <i>et al.</i> , 1947)

2.7. Antikörper

Tabelle 2-8: Verwendete Antikörper; Die Antikörper wurden für Western Blot (WB), Immunofluoreszenzfärbung (IF) und Immunpräzipitation (IP) eingesetzt.

Primärantikörper	Hersteller	Typ	Verdünnung	Anwendung
anti-TGN46	Abnova	polyklonal, Schaf	1:250	IF
anti-GFP	GeneTex	polyklonal, Kanninchen	1:2500	WB
anti-GAPDH	Millipore	monoklonal, Maus	1:1000	WB
anti-GPP34R	Sigma-Aldrich	polyklonal, Kanninchen		IP
anti-GPP34	abcam	polyklonal, Maus		IP
anti-Mannosidase II	Millipore	polyklonal, Kanninchen	1:100	IF
anti-mQC (10269)	Diese Arbeit	polyklonal, Ziege	1:5000	WB
anti-m-isoQC 5407	Diese Arbeit	polyklonal Kanninchen	1:500	WB
anti-h-isoQC 5406	Diese Arbeit	polyklonal, Kanninchen	1:500	WB
anti-penta-His	Qiagen	Polyclonal, Maus	1:1000	WB
Sekundärantikörper				
anti-Kanninchen HRP	Cell Signaling	polyklonal, Ziege	1:2000	WB
anti-Maus HRP	Dianova	polyklonal, Ziege	1:10000	WB
anti-Ziege HRP	R&D Systems	polyklonal, Affe	1:1000	WB
anti-Schaf Cy ³	Dianova	polyklonal, Kanninchen	1:100	IF
anti-Kanninchen Cy ³	Millipore	polyclonal, Ziege	1:100	IF

2.8. Pufferscreening-Kits für die Kristallisation

Tabelle 2-9: Verwendete Pufferkits für *screening* von Kristallisationsbedingungen

Bezeichnung	Quelle
Basic Crystallography Kit	Sigma-Aldrich
Crystallization Cryo Kit	Sigma-Aldrich
Crystallization Extension Kit	Sigma-Aldrich
Crystallization Low Ionic	Sigma-Aldrich
Crystal Screen 1, Crystal Screen 2	Hampton Research
JBScreen Classic 1-10	Jena Bioscience
JBScreen JCSG++ 1-4	Jena Bioscience
Morpheus™	Molecular Dimensions Limited

2.9. Zellkultur

2.9.1. Kultivierung der Zelllinien

Die Kultivierung der verschiedenen Zelllinien erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers. Die verschiedenen Zelllinien wurden in 75cm² Kulturflaschen (Greiner) kultiviert. Zur Langzeitkultivierung wurden die Zellen entweder abgeklopft, mit Trypsin/EDTA oder Accutase behandelt und zweimal pro Woche nach Angaben des Herstellers verdünnt. Dazu bestimmte man die Lebendzellzahl mittels CASY-Cellcounter (Schärfe System). Die Kultivierung der Zellen erfolgte maximal bis Passage 30 und anschließend wurde eine neue Gefrierstammkultur der entsprechenden Zelllinie in Kultur genommen.

2.9.2. Transfektion von LN405, COS-7 und HEK293 Zellen mit Plasmiden

Zur Untersuchung der Lokalisation der isoQC wurden von LN405 Zellen 50.000 und von den COS-7 Zellen 75.000 in *chamber slides* (BD Bioscience) mit einer Oberfläche von ca. 4cm² eingesät. Für die am nächsten Tag durchgeführte Transfektion wurden 1,6µg Plasmid-DNA und 10µl Lipofectamin 2000 (Invitrogen) verwendet. Die Transfektion der Zellen mit Lipofectamin 2000 erfolgte über die Ausbildung eines Komplexes aus dem synthetischen Lipidpolymer und der DNA, wodurch eine Aufnahme in die Zelle vermittelt wird. Sie wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für eine Plasmidtransfektion der HEK293 Zellen wurden 1,5x10⁶ Zellen pro *well* einer 6-*well* Platte (Greiner bio-one) mit der Oberfläche von 10cm² eingesät. Die Transfektion erfolgte unter Einsatz von 4µg DNA und 10µl Lipofectamin 2000. Das Entfernen des Transfektionsansatzes erfolgte nach 5-6h und den Zellen wurde neues Medium zugesetzt. Die Färbung der Zellen bzw. die Ernte der HEK293 Zellen wurde am nächsten Tag durchgeführt.

2.9.3. Transfektion von HEK293 Zellen mit siRNA

Für die Analyse ob das Fehlen von GPP34 und GPP34R zu einer Veränderung der Lokalisation der isoQC führt, erfolgte eine siRNA vermittelte Herunterregulation von GPP34 und GPP34R in HEK293 Zellen. Die Herunterregulation von Proteinen bzw. Transkriptmengen beruhte auf einer lipid-vermittelten Transfektion der Zellen mit kurzen doppelsträngigen RNAs. Diese werden von einem Protein mit dem Namen *Dicer* erkannt und es erfolgt eine Rekrutierung weiterer zellulärer Proteine, die sich zu einem Multienzymkomplex verbinden. Der RISC-Komplex (*RNA-induced silencing complex*) wird durch die Entwindung der doppelsträngigen-siRNA aktiviert. Der zur Ziel-mRNA komplementäre siRNA-Strang vermittelt die Erkennung der zellulären mRNA durch komplementäre Paarung. Der an die mRNA gebundene RISC-Komplex besitzt eine

Nukleaseaktivität, wodurch es zur Degradation der Ziel-RNA kommt. Durch diese posttranskriptionelle Genregulation wird die Proteinsynthese effektiv gehemmt (Bernstein et al., 2001; Ahlquist 2002; Voorhoeve et al, 2003).

Die Herunterregulation von GPP34 und GPP34R wurde in HEK293 Zellen durchgeführt. Dafür erfolgte eine Einsaat von 2×10^5 Zellen pro *well* in einer 12 *well* Platte (Greiner bio-one). Nach einer Inkubation der Zellen über Nacht im Wachstumsmedium wurde die erste Transfektion mit einer Mischung von 4 verschiedenen siRNAs gegen GPP34 oder GPP34R (100pmol siRNA/*well*) (ABgene Ltd., Dharmacon), unter Verwendung des Transfektionsreagenzes DharmaFECT® 1 (Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Eine Übersicht über die verwendeten siRNAs ist in Tabelle 2-10 dargestellt. Als Transfektionskontrolle (Kontrolle) wurde ein Ansatz mit H₂O und ohne siRNA mitgeführt. Nach 48h erfolgte eine weitere Transfektion mit 40pmol siRNA und 300ng Plasmid (h-isoQC, h-isoQC EGFP, ST6Gal I EGFP, und GnT-IX EGFP) pro *well* mit Lipofectamin2000 als Transfektionsreagenz. Nach 5stündiger Inkubation wurde die Lösung durch D-MEM-Medium ersetzt und die Zellen über Nacht inkubiert. Abschließend erfolgte ein weiterer Mediumswechsel auf Serum- und Phenolrot-freies D-MEM mit einer weiteren Inkubation für 24h, bevor die Zellen sowohl für eine RNA Isolation als auch für die Präparation von Extrakten geerntet wurden. Mit dem Medium der Transfektion der h-isoQC wurde eine Aktivitätsbestimmung durchgeführt (siehe 2.12.5).

Tabelle 2-10: Verwendete siRNAs; die eingesetzten siRNAs wurden von Dharmacon hergestellt.

siRNA	siRNA Name (Dharmacon)	Zielsequenz
GOLPH3_1	J-006414-09	GUUAAGAAAUGUACGGGAA
GOLPH3_2	J-006414-10	GCUUGUGGAAUGAGACGUA
GOLPH3_3	J-006414-11	GCGGCAGCUUCUCGACUUA
GOLPH3_4	J-006414-12	GGAUUCUGCUGGUACGAGA
GOLPH3L_1	J-006413-05	GAAUCGAGCCAAGGACUUA
GOLPH3L_2	J-006413-06	GAUAUCCGCCUUACUCUUA
GOLPH3L_3	J-006413-07	GCAAAGAACCUAGUAGAGA
GOLPH3L_4	J-006413-08	GUAAAUGACCCUCAGCGUA

2.9.4. Bestimmung der zellulären Toxizität

Um auszuschließen, dass der gemessene Effekt nach Herunterregulation von GPP34 und GPP34R auf eine Toxizität der siRNA Behandlung zurückzuführen ist, wurde die zelluläre Toxizität nach siRNA Behandlung bestimmt.

Der angewendete Zytotoxizitätstest (Promega) beruht auf der Detektion von Laktat-Dehydrogenase (LDH), die von Zellen in das Medium abgegeben wird. Dies ist die Folge der Veränderung bzw. des Verlustes der Membranstruktur der Zellen. Die

Detektion der Aktivität erfolgte durch eine Untersuchung des Umsatzes eines fluorogenen LDH-Substrates. Bei der Umsetzung von Laktat zu Pyruvat entsteht NADH. In einer Folgereaktion wird NADH in einer Diaphorese-Katalyse als Co-Substrat umgesetzt, wobei Resorufin entsteht. Für die Analyse der Menge an LDH untersuchte man die Medien nach *knockdown* von GPP34 und GPP34R. Zusätzlich erfolgte ebenfalls eine LDH Bestimmung in Proben von unbehandelten Zellen. Es wurden 50µl Probe mit 50µl Substrat versetzt und für 10min im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe der Stop-Lösung (25µl) ist die Fluoreszenz mittels eines Spektrometers (TECAN) bei einer Anregungswellenlänge von 544nm und einer Emissionswellenlänge von 595nm ermittelt worden.

2.9.5. Immunfluoreszenzfärbung

Die Methode der Immunfluoreszenz kam bei Lokalisationsuntersuchung verschiedener Proteine in der Zelle zur Anwendung. Die Proteinvarianten konnten anhand einer C-terminalen EGFP Fusion detektiert werden. Durch die Verwendung von Mannosidase II - bzw. TGN46 Antikörpern wurde der Golgi Apparat bzw. Trans-Golgi spezifisch markiert (Kain *et al.*, 1998; Moremen & Touster, 1985). Die Fixierung der Zellen und die Antikörper-vermittelte Färbung des Zellkompartimentes erfolgten anhand eines generalisierten Protokolls. Zu Beginn der Färbung wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS versetzt. Zur Fixierung der Zellen und Permeabilisierung der Zellmembran erfolgte eine Inkubation mit Methanol für 10min bei -20°C. Anschließend fand ein dreimaliges Waschen mit PBS für 5min statt. Die Inkubation des primären Antikörpers, welcher in PBS verdünnt wurde, erfolgte bei Raumtemperatur für drei Stunden. Nach dreimaligem Waschen für 5min wurde die Inkubation der Zellen mit dem sekundären Antikörper für 45min im Dunkeln bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach erneutem Waschen erfolgte eine Zellkern-Färbung mittels ToPro3 für 10min bzw. mit DAPI (1µg/ml in Methanol verdünnt) für 2min im Dunkeln. Bevor die Objektträger mit *Fluorescent Mounting-Medium* (Dako) versiegelt und bei 4°C gelagert wurden, fand ein erneutes Waschen mit PBS statt.

Für die Detektion des N-terminalen FAP-Fragmentes war eine andere Fixierungsmethode notwendig. Diese erfolgte durch Inkubation der Zellen mit 4% Paraformaldehyd (PFA) für 20min bei Raumtemperatur. Diese Fixierungsmethode machte eine zusätzliche Permeabilisierung der Membran mittels 0,5%igem Triton/PBS für 5min bei Raumtemperatur erforderlich. Im Anschluss erfolgte ein dreimaliges Waschen für 5min bei Raumtemperatur. Die verwendeten Antikörper wurden ebenfalls in 0,5% Triton/PBS verdünnt. Der weitere Ablauf der Färbung erfolgte analog zu den zuvor beschriebenen Antikörper-Färbungen.

Die subzelluläre Lokalisation der gefärbten Proteine wurde mithilfe eines Laser-Scanning-Mikroskops (LSM; Carl Zeiss Jena) analysiert.

2.10. Molekularbiologische Methoden

2.10.1. Molekularbiologische Standardmethoden

Die Generierung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide erfolgte mittels DNA-Amplifikation, Reinigung des PCR-Produktes, Restriktionsspaltung, Ligation, Transformation durch Hitzeschock in *E.coli* Zellen und abschließender Überprüfung der Klone anhand von Kolonie-PCR and analytischer Restriktionsspaltung.

Die Amplifikation von DNA durch PCR wurde mit Hilfe der im Anhang (Tabelle 7-1) beschriebenen Primer und Verwendung der DNA-Polymerasen *Pfu* (Promega), *GoTaq* (Promega) oder *Phusion* (Fermentas) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Enzymatische Reaktionen wie die Restriktionsspaltung von DNA (New England Biolabs), Ligation (New England Biolabs) und Dephosphorylierung (Fermentas) erfolgten nach Angaben der Hersteller unter Verwendung der entsprechenden Enzyme und Puffer. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA wurde in Agarosegelen unter Verwendung von 1xTBE (100mM Tris, 100mM Borsäure, 2mM EDTA) als Laufpuffer durchgeführt. Je nach Größe der zu trennenden Fragmente wurden Agarosekonzentrationen von 0,8-2% (w/v) in 1xTBE verwendet. Zur Detektion und Auswertung auf einem UV-Leuchttisch erfolgte der Zusatz von 0,5µg Ethidiumbromid pro ml Gel. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 1/6 Volumen eines 6-fach konzentrierten DNA-Ladepuffers gemischt. Als Größenstandard diente je nach Fragmentgröße 1kb - oder 100bp- Marker (Fermentas).

Die Reinigung von PCR-Produkten oder DNA Fragmenten erfolgten entweder aus Agarosegelen unter Verwendung eines *Gelelutions-Kits* oder anhand eines *PCR-Purifikation Kits* nach Hersteller Angaben. Die Transformation der Plasmide erfolgte in chemokompetente DH5α *E.coli* Zellen mittels Hitzeschock bei 42°C für 45s. Die Präparation von kleinen Mengen Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe eines *Mini-Prep Kits*. Für die Herstellung großer Mengen an endotoxin-freier Plasmid-DNA, für die Transfektion in verschiedene Zelllinien, wurde ein Plasmid *Maxi-Prep Kit* verwendet. Alle hergestellten Plasmide wurden durch Sequenzierung bei der Firma GATC überprüft.

2.10.2. Transformation von *P. pastoris*

Für eine stabile Expression der verschiedenen isoQC Konstrukte in *P. pastoris* mussten diese in das Wirtsgenom integriert werden. Hierzu wurde das gereinigte Plasmid mittels des Enzyms *PmeI* im Bereich des *AOX1*-Promotors linearisiert.

Dadurch wurde ein stabiler Einbau durch homologe Rekombination im *AOX1*-Lokus im *P. pastoris* Genom gefördert. 5-7µg Plasmid wurden mittels *PmeI* verdaut, dabei richtete sich die zugesetzte Menge an Puffer und BSA nach dem Volumen des Reaktionsansatzes. Die Restriktionsspaltung erfolgte bei 37°C für 3h. Anschließend wurde das linearisierte Plasmid durch Zugabe des 3fachen Reaktionsvolumens an Isopropanol gefällt. Die Fällung erfolgte für 30 min bei -20°C mit anschließender Zentrifugation bei 13.000xg für 15min. Der Überstand ist nach der Zentrifugation dekantiert, das Pellet getrocknet und in 50µl Wasser resuspendiert worden. Nach der Linearisierung des Plasmides erfolgte die Transformation durch Elektroporation in elektrokompetente *P. pastoris* X-33 Zellen (Invitrogen). Hierzu versetzte man 1-1,5µg des Plasmids mit 40µl kompetenten Zellen. Nach 5 minütiger Inkubation auf Eis wurde der Ansatz in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt und ein Spannungspuls von $7.500\text{V}_{\text{cm}}/5\text{ms}$ angelegt. Sofort nach der Elektroporation ist 1ml gekühltes YPDS-Medium zu den Zellen gegeben und diese Suspension in ein 15ml Kulturröhrchen überführt worden. Es folgte eine Inkubation für 2h bei 30°C, wobei das Röhrchen alle 30min geschwenkt wurde. 100µl und 200µl Zellsuspension sowie das restliche Zellpellet sind anschließend auf YPDS-Agar mit 150µg/ml Zeozin ausplattiert worden. Diese Platten wurden für zwei Tage bei 30°C belassen und anschließend ca. 50 Kolonien auf *Masterplates* übertragen.

2.10.3. Isolation von gesamt-RNA und Reverse Transkription

Zur Isolation von Gesamt-RNA aus den Zellen kam das Nucleo-Spin® RNAII Kit (Machery-Nagel) zur Anwendung. Wie im Protokoll des Herstellers beschrieben, wurden Zellen nach Entfernung des Kulturmediums direkt auf den Kulturplatten durch mehrmaliges Auf-und Abpipettieren mit 350µl RA1-Puffer (enthält 1%TCEP) lysiert. In Abänderung des Protokolls erfolgte die Elution der gereinigten RNA nicht in 60µl sondern in 40µl RNase-freiem H₂O. Anschließend wurde die RNA-Konzentration spektroskopisch (Nanodrop-Photometer, Peqlab) bestimmt. Proben welche eine A_{260}/A_{280} von mindestens 1,8 aufwiesen, kamen für die reverse Transkription zur Anwendung. Die cDNA Synthese erfolgte unter Verwendung von 1µg Gesamt-RNA mit 100pmol Oligo-dT-Primer (Invitrogen) sowie Superscript II (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers.

2.10.4. quantitative PCR (qRT-PCR)

Für die sich an die reverse Transkription anschließende quantitative PCR wurde die *SYBR® Green I*-Technologie angewendet. Die Methode diente der Untersuchung der *knockdown*-Effizienz der eingesetzten GPP34- und GPP34R-siRNA. Die eingesetzten qRT-PCR Primer wiesen eine Anlagerungstemperatur von 60°C auf. Es wurden 1µl

cDNA mit 0,75µl Primer 1 (Konzentration 100 pmol/µl), 0,75µl Primer 2 (Konzentration 100 pmol/µl), 7,5µl qPCR Mastermix *Rotor-Gene®-SYBR®-Green* versetzt. Die Analyse der Proben erfolgte mittels *Thermocyclers Rotor-Gene™ 3000* unter Verwendung des folgenden PCR-Programms (Tabelle 2-11).

Tabelle 2-11: PCR-Programm der quantitativen PCR

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit
Aktivierung	95°C	5min
Denaturierung	95°C	5s
Anlagerung und Verlängerung	60°C	15s

Die verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion synthetisiert (Tabelle 2-12). Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte anhand der *Rotor-Gene Operating-Software*, wobei eine komparative Methode zur Anwendung kam. Die Auswertung ergab eine relative Expressionsrate, in der auf die Transkriptkonzentration einer Kontrolle sowie auf Referenzgene (GAPDH, YWHAZ und HPRT) normiert wurde.

Tabelle 2-12: Verwendete qRT-PCR Primer.

Genname	„left-hand“ Primer	„right-hand“ Primer
GAPDH	ACCCAGAAGACTGTGGATGG	TTCTAGACGGCAGGTCAGGT
YWHAZ	AGCAGGCTGAGCGATATGAT	TCTCAGCACCTTCCGTCTTT
HPRT	TGCTGACCTGCTGGATTACA	CCTGACCAAGGAAAGCAAAG
GPP34	AGGCGCTGCTTAATGTTGTT	TCCAGAAACGGTCCAGAACT
GPP34R	TGCTAGCCCACTCCTCTGAT	ACCTGCCGGCTTTAAGATTT

2.11. Proteinbiochemische Methoden

2.11.1. Expression von isoQC in *P. pastoris*

Zur Expression der verschiedenen isoQCs wurde die methylotrophe Hefe *P. pastoris* verwendet. Dabei wird die für die Umsetzung von Methanol notwendige Alkoholoxidase von den Genen AOX1 und AOX2 kodiert, wobei aber etwa 95% des Enzyms vom AOX1-Lokus gebildet wird. Dieser AOX1-Lokus besitzt einen starken, durch Methanol induzierbaren Promotor, welcher auch für die Induktion der Bildung von Fremdproteinen genutzt werden kann. Die Synthese des Proteins kann sowohl intrazellulär als auch sekretorisch erfolgen. Da *P. pastoris* nur geringe Mengen an eigenen Proteinen sezerniert, ist eine sekretorische Expression des Zielproteins für eine spätere Reinigung von Vorteil. Ein effizienter Export des heterologen Proteins wird durch die im Vektor kodierte Signalsequenz, dem α -Faktor-Präpropeptid aus *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), gewährleistet (Cereghino & Cregg, 2000).

Der Vektor wird mittels homologer Rekombination in den AOX1-Lokus integriert, wodurch die Expression des Zielproteins durch Methanolzugabe zum Medium induziert werden kann. Im Verlauf der sekretorischen Expression wird die α -Faktor-Präprosequenz durch die endogene Endopeptidase Kex-2 (Kexin) zwischen dem dibasischen Aminosäuremotif Lys-Arg abgespalten. Diese Prozessierung erfolgt bevorzugt vor Glu-Ala-Sequenzmotiven, weshalb diese ebenfalls innerhalb des Vektors kodiert sind. Die Glu-Ala-Dipeptide werden abschließend durch das endogene Enzym DPAP-A (Dipeptidyl Aminopeptidase A) innerhalb des Golgi-Apparates abgespalten und es kommt zur Freisetzung des Zielproteins in das Medium (Cereghino & Cregg, 2000).

Aus der Integration der isoQC-cDNA in das Wirtsgenom resultierte eine stark unterschiedliche Expression des Zielproteins. Dies machte eine Selektion von Transformanten auf die gebildete isoQC-Aktivität erforderlich. Hierfür wurden die Hefezellen in 2ml BMGY bei 30°C für 24h im Schüttelinkubator angezogen. Die Induktion der Expression der isoQC-cDNA erfolgte mit Medium (BMMY), welches 0,5% Methanol enthielt. Für den Medienwechsel wurden die Zellen für 10min bei 3000xg zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 2ml BMMY resuspendiert. Die Kulturen verblieben für weitere 96h im Schüttelinkubator, wobei nach je 24h 0,5% des Volumens an Methanol zugesetzt wurde. Im Anschluss wurde die isoQC-Aktivität im zellfreien Überstand mit Hilfe eines fluorometrischen Aktivitätstestes ermittelt (siehe Kapitel 2.12.1).

Die Synthese der verschiedenen h-isoQC Varianten im präparativen Maßstab erfolgte mittels Schüttelkolbenkultivierung der Hefezellen. Dafür wurden jeweils *P. pastoris* Klone verwendet, welche in den vorangegangenen Untersuchungen die höchste isoQC-Aktivität aufwiesen. BMGY-Medium (2L) wurde mit einer Vorkultur (50ml BMGY-Medium) inokuliert und über Nacht angezogen. Für die Expression des Zielproteins überführte man die Zellen wiederum in BMMY-Medium (8L). Das Zellpellet der BMGY-Vorkultur wurde im BMMY-Medium zu einer OD₆₀₀ von 1 verdünnt und für 96h bei 30°C unter schütteln inkubiert. Nach je 24h wurden 0,5% (v/v) 100%iges Methanol zugegeben. Die Proteinsynthese ist durch Zentrifugation bei 8000xg für 20min abgebrochen worden. Der Überstand konnte zur Bestimmung der isoQC-Aktivität und anschließender Reinigung eingesetzt werden.

Die m-isoQC und r-isoQC konnten durch Verwendung der Hochzelldichte Fermentation synthetisiert werden. Die Durchführung der Hochzelldichte-Fermentation beruhte auf den „*Fermentation Process Guidelines*“ von Invitrogen. Der Prozess unterteilte sich in die Glycerol-*Batch*-Phase gefolgt von der Glycerol-*Fedbatch*-Phase und abschließend die Methanol-*Fedbatch*-Phase.

Die Fermentation wurde im 2L Maßstab durchgeführt und erfolgte bei einem konstanten pH-Wert von 5,5 sowie bei konstanter Temperatur von 30°C. Außerdem musste die Konzentration an gelöstem Sauerstoff im Medium $\text{CO}_2 \geq 20\%$ betragen, was durch eine Begasung mit reinem Sauerstoff gewährleistet wurde. Die entsprechende Vorkultur (200ml) wurde in BMGY bei einer Temperatur von 30°C zu einer optischen Dichte von etwa 2-6 kultiviert. Innerhalb der Glycerol-*Batch*-Phase erfolgte der Verbrauch des Glycerols im Fermentationsmedium (für 2L: 53,4ml 85%ige H_3PO_4 , 1,86g CaSO_4 , 36,4g K_2SO_4 , 29,8g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8,26g KOH, 80g Glycerol) zur Zellvermehrung. Nach etwa 18-24h war in der Regel das Glycerol im Medium verbraucht, was durch einen Anstieg der Sauerstoffkonzentration erkennbar wurde. Die anschließende Glycerol-*Fedbatch*-Phase diente wiederum der Zellvermehrung und dauerte etwa 5h. Bei einem Feuchtgewicht von 180g/l folgte die Methanol-*Fedbatch*-Phase mit der Induktion der Zielprotein-Expression. Die Fermentation dauerte insgesamt ca. 73h. Anschließend wurden die Zellen vom Medium durch Zentrifugation bei 8000xg für 20min getrennt und der die isoQC enthaltende Überstand bei -20°C eingefroren

2.11.2. Reinigung der isoQCs

Die Reinigung der verschiedenen h-isoQC-Varianten und der r-isoQC aus den Hefemedien erfolgte säulenchromatographisch innerhalb von drei Schritten. In einem ersten Reinigungsschritt wurde eine affinitätschromatographische Reinigung über den N-terminalen His-tag (Ni^{2+} -IMAC – *Immobilized Metal Ion Chelate Affinity Chromatography*) im *expanded bed*-Modus durchgeführt. Die isoQC-enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und mit einer $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Stammlösung auf eine Ammoniumsulfatkonzentration von 1M eingestellt. Dies ermöglichte den zweiten Reinigungsschritt, die hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC). Abschließend wurden die isoQC-enthaltenden Fraktionen vereinigt und säulenchromatographisch entsalzt (Gelfiltration, GF). Die Lagerung des Proteins erfolgte bei -20°C in 50% Glycerol oder ohne Glycerol bei -80°C.

Die Reinigung wurde durch Bestimmung des Proteingehaltes (Bradford, 1976) und der isoQC-Aktivität dokumentiert. Des Weiteren wurde der Reinheitsgrad der Proteine mittels SDS-PAGE verfolgt. Aus Tabelle 2-13 können der Ablauf und Bedingungen der säulenchromatographischen Reinigungsschritte entnommen werden.

Tabelle 2-13: Reinigung der h-isoQC Varianten und r-isoQC nach Expression in Hefe.
Anlage: ÄKTAprime plus; CV→ Säulenvolumen

Reinigungsschritt	1	2	3
Chromatographische Methode	Ni²⁺-IMAC	HIC	GF (Entsalzung)
Säulenmatrix (Amersham Biosciences AB, Schweden)	Chelating Sepharose Fast Flow	Butyl Sepharose 4Fast Flow	Sephadex G-25 Fine
Gelbettabmessung	d=2,5cm l=42cm CV=206cm ³	d=1,6cm l=15,5cm CV=23cm ³	d=2,6cm l=10cm CV=53cm ³
Equilibrierung			
Puffer	50mM NaH ₂ PO ₄	30mM NaH ₂ PO ₄ 1M (NH ₄) ₂ SO ₄	50mM Bis-Tris 100mM NaCl
pH	7,0	7,0	6,8
Volumen	10CV	10CV	10CV
Waschen			
Puffer	50mM NaH ₂ PO ₄ 0,5mM Histidin	30mM NaH ₂ PO ₄ 1M (NH ₄) ₂ SO ₄	-
pH	7,0	7,0	
Volumen	10CV	6CV	
Elution			
Puffer	50mM NaH ₂ PO ₄ 100mM Histidin	30mM NaH ₂ PO ₄	50mM Bis-Tris 100mM NaCl
pH	7,0	7,0	6,8
Volumen	1,5 CV	5 CV	1CV

Da die m-isoQC ohne einen Affinitätstag synthetisiert wurde, erfolgte die Reinigung mit Hilfe eines veränderten Protokolls. In einem initialen Schritt wurde dem Hefemedium Ammoniumsulfat zugesetzt (0,8M Endkonzentration) und die Suspension einer Zentrifugation bei 16.000rpm für 30 min unterzogen. Der Überstand, der die isoQC enthielt, wurde für die Reinigung verwendet. Der erste Reinigungsschritt bestand aus einer hydrophoben Interaktionschromatographie (*Butyl-Streamline Column*; GE Healthcare) im *expanded-bed* Modus. Das Säulenmedium wurde zuvor mit 50mM NaH₂PO₄, 0,8M (NH₄)₂SO₄ pH 7 equilibriert. Die Auftragung des Überstandes erfolgte mit einer Flussrate von 15ml/min, gefolgt von einem Waschschrift mit Equilibrierungspuffer über etwa 5 Säulenvolumen. Das gebundene Protein wurde, mit Hilfe eines Puffers bestehend aus 50mM NaH₂PO₄ pH 7, eluiert. Die m-isoQC enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und erneut mit (NH₄)₂SO₄ zu einer Endkonzentration von 0,7M versetzt. Diese Lösung wurde mit einer Flussrate von

4ml/min auf eine Butyl-Sepharose FF-Säule (1,6cmx13cm) aufgetragen. Anschließend folgte das Waschen mit 50mM NaH₂PO₄, 0,8M (NH₄)₂SO₄ pH 7 und die Elution des gebundenen Proteins mittels eines Ammoniumsulfatgradienten von 0,7M zu 0M innerhalb von 5 Säulenvolumen. Mit den Fraktionen, die m-isoQC beinhaltenen, wurde nachfolgend eine Dialyse über Nacht gegen 30mM Bis-Tris pH 6,8 durchgeführt und die Lösung auf eine mit 30mM Bis-Tris pH 6,8 equilibrierte UnoQ Säule (BioRAD) aufgetragen. Nach einem Waschschrift unter Verwendung des Equilibrierungspuffers erfolgte die Elution über einen NaCl-Gradienten von 0-450mM NaCl über 10 Säulenvolumen. Als abschließender Reinigungsschrift wurde eine Größenausschlusschromatographie (Superdex 75 Säule, 2,6x85 cm) mittels eines Puffers bestehend aus 30mM NaH₂PO₄, 0,5 M NaCl pH=7 durchgeführt. Wie oben beschrieben wurde nach jedem Reinigungsschrift die isoQC Aktivität bestimmt und die Reinheit durch SDS-PAGE überprüft. Die gereinigte m-isoQC wurde in einem Puffer bestehend aus 50mM Bis-Tris, 100mM NaCl pH 6,8 entweder bei -80°C oder unter Zugabe von 50% Glycerol bei -20°C gelagert.

2.11.3. Expression und Reinigung von GPP34 und VPS74

Die Expression des humanen GPP34 und des VPS74 aus Hefe erfolgte in *E. coli* BL21 (GPP34) oder Rosetta (VPS74) Zellen. Hierfür wurden die Proteine in den pET28a Vektor kloniert, um sie mit einem N-terminalen His-Tag zu versehen. Die Expression erfolgte bei 37°C nachdem die Zellen eine OD₆₀₀ von etwa 0,8 erreicht hatten. Im Fall von GPP34 wurde die Induktion der Expression mit 1mM IPTG gefolgt von einer Inkubation für 4h durchgeführt. Im Gegensatz dazu erfolgte die Induktion der Expression von VPS74 mit 50mM IPTG. Anschließend wurden die Zellen mittels einer Zentrifugation bei 4000xg für 15min vom Medium getrennt und das Zellpellet in 25mM NaH₂PO₄ pH 8, 250mM NaCl und 10% Glycerol resuspendiert. Mit Hilfe eines Frost-Tau-Zyklus gefolgt von einer Hochdruck-Homogenization (*French Press*) erfolgte der Aufschluss der *E. coli* Zellen. Anschließend zentrifugierte man das Zelllysate bei 30.000rpm für 1h und verdünnte den Überstand mittels 50mM NaH₂PO₄ pH 8 und 120mM NaCl auf 1l. Der erste Reinigungsschrift bestand aus einer Ni-Affinitätschromatographie (Ni²⁺-IMAC – *Streamline Column*, GE Healthcare, 2,5x100cm) im *expanded-bed* Modus mit einer Flussrate von 12ml/min. Das Säulenmedium wurde zuvor mit 50mM NaH₂PO₄, 120mM NaCl pH 8 equilibriert. Nach einem ersten Waschschrift mit Equilibrierungspuffer folgte ein zweiter Waschschrift mit Equilibrierungspuffer der 80mM Imidazol enthielt. Das gebundene Protein wurde mit Hilfe eines Puffers bestehend aus 50mM NaH₂PO₄, 120mM NaCl und 200mM Imidazol pH 8 eluiert. Die GPP34 oder VPS74 enthaltenen Fraktionen wurden vereinigt und mit 3M (NH₄)₂SO₄ zu einer Endkonzentration von 0,8M versetzt. Diese Lösung trug man

mit einer Flussrate von 3ml/min auf eine Butyl-Sepharose FF-Säule (1,6cmx13cm) auf. Anschließend folgte das Waschen mit 50mM NaH₂PO₄, 0,8M (NH₄)₂SO₄ pH 8 über 5 Säulenvolumen und die Elution des gebundenen Proteins mittels eines Ammoniumsulfatgradienten von 0,8M zu 0M innerhalb von 10 Säulenvolumen. Die GPP34 oder VPS74 beinhaltenen Fraktionen wurden vereinigt und anschließend über Nacht gegen eine Puffer bestehend aus 30mM Tris pH 8,5, 25mM NaCl und 1mM DTT dialysiert. Danach erfolgte ein weiterer Reinigungsschritt mit Hilfe einer UnoQ Säule (BioRAD). Die Equilibrierung der Säule erfolgte mit Hilfe eines Puffers bestehend aus 30mM Tris-HCl pH 8.5. Die Proteinlösung wurde mit einer Flussrate von 4ml/min aufgetragen und mit Equilibrierungspuffer gewaschen. Die Elution von GPP34 oder VPS74 erfolgte mit Hilfe eines NaCl-Gradienten von 0-450mM in 20 Säulenvolumen. Abschließend wurden die gereinigten Proteine gegen einen Puffer bestehend aus 10mM Tris-HCl pH 8,5, 300mM NaCl und 5mM DTT dialysiert, aufkonzentriert, eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.11.4. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen kam die eindimensionale diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Anwendung (Laemmli, 1970). Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 2-14 dargestellt. Die Auftrennung der Proteine nach der Größe erfolgte bei 80-150V. Als Standard diente je nach Anwendung die *Prestained Protein ladder* (Fermentas) oder die *Unstained Protein Ladder* (Fermentas). Zur Visualisierung der Proteine kamen entweder Brilliant-Blau-G250 (Roth) oder eine *Western-Blot-Analyse* zur Anwendung. Mittels Commassie-Lösung (50% Methanol, 10% Essigsäure und 0,1% Brilliant Blau G250), wurden die Proteine im Gel für 15min gefärbt. Die Entfärbung des Hintergrundes erfolgte durch mehrmaliges Waschen in 10%iger Essigsäure.

Tabelle 2-14: Zusammensetzung der verwendeten Tris-Glycin-Gele

Bestandteil	Sammelgel	Trenngel (8%)	Trenngel (10%)	Trenngel (12%)
Sammelgelpuffer (0,5M Tris, pH 6,8; 1% SDS(w/v))	2,5ml	-	-	-
Trenngelpuffer (1,5M Tris,pH 8,8; 1%SDS (w/v))	-	2,5ml	2,5ml	2,5ml
Acrylamid (30%)	1,33ml	2,4ml	3ml	4ml
TEMED	20µl	15µl	15µl	15µl

APS (20%)	50µl	75µl	75µl	75µl
Bidest H ₂ O	6,1ml	5,1ml	4,5ml	3,4ml
Anwendung	GnT-IX EGFP	isoQC EGFP; ST6Gal I EGFP	Reinigung der isoQCs; Charakterisierung AK; IP	

2.11.5. Western Blot-Analyse

Die aufgetrennten Proteine wurden nach Beenden der SDS-PAGE unter Verwendung einer *semi-dry-Blotapparatur* (BioRAD) auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Es kam ein diskontinuierliches Puffersystem zur Anwendung (Kyhse-Andersen, 1984). Filterpapier und Membran wurden auf die jeweilige Gelgröße zugeschnitten und im Lösungsmittel für fünf Minuten equilibriert.

Anode 1 Puffer	Anode 2 Puffer	Kathoden Puffer	TBS-Puffer
0,3M Tris/HCl	25mM Tris/HCl	25mM Tris/HCl	10mM Tris/HCl
pH=10,4	pH=10,4	pH=9,4	pH=7,5
5% (V/V) Methanol	5% (V/V) Methanol	5% (V/V) Methanol	150mM NaCl
		40mM 6-Aminohexansäure	

Durch Anlegen einer konstanten Stromstärke von 0,8mA/cm² für 90min wurden die Proteine aus dem Acrylamidgel auf die Membran übertragen. Nach Beenden des Transfers erfolgte eine Inkubation der Membran für 2h in TBS, welches 0,05% Tween20 und 5% Trockenmilch (Blockierlösung) enthielt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Der primäre Antikörper wurde in Blockierlösung verdünnt (siehe Tabelle 2-8) und entweder über Nacht im Kühlraum oder für 1h bei Raumtemperatur (GAPDH-Antikörper) unter Schwenken inkubiert. Vor der Zugabe des entsprechenden, in Blockierlösung verdünnten, sekundären Antikörpers wurde die Membran 4-5x für jeweils 5min mit TBS gewaschen. Nach Inkubation des sekundären Antikörpers für ca. 1h erfolgten weitere Waschschrte unter Verwendung des TBS-Puffers. Die sekundär-Antikörper waren mit einer Peroxidase gekoppelt. Die Detektion erfolgte je nach zu erwartender Signalstärke mit dem *SuperSignal West Pico Chemoluminescent Substrate* oder *SuperSignal West Femto Chemoluminescent Substrate* (Thermo Scientific), entsprechend den Herstellerangaben. Die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase katalysiert die Oxidation des Substrates Luminol mittels Peroxid. Dabei entsteht 3-Aminophthalate und Licht (Chemolumineszenzsignal) wird freigesetzt. Diese entstandene Chemolumineszenz wurde entweder durch Exposition eines Röntgen-Films (Thermo Scientific) oder mittels Fusion FX7 (PeqLab) visualisiert.

2.11.6. Bestimmung des Metallgehalts in Proteinen mittels TXRF

Zur Untersuchung des Zink-Gehaltes der m-isoQC kam die Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalyse zur Anwendung. Dabei beruht der Elementnachweis auf dem Prinzip, dass z.B. durch Röntgenstrahlung Kern-nahe Elektronen auf höhere Energieniveaus geschleudert werden. Beim Zurückfallen der Elektronen auf die Ausgangsniveaus wird die freiwerdende Fluoreszenzstrahlung detektiert. Mit dieser Methode ist eine quantitative Bestimmung von Elementen ab Ordnungszahl $Z \geq 14$ möglich (Klockenkämper & von Bohlen, 2001). Für die Messung wurde die gereinigte m-isoQC, unter Verwendung der Größenausschlußchromatographie (Sephadex G-25; 1,0x10cm) entsalzt. Der Laufpuffer beinhaltete 10mM Tris-HCl, pH 7,6. Anschließend erfolgte die Ultrafiltration des Proteins unter Verwendung von Zentricons (Novagen, Größenausschluß von 10kDa) auf 3mg/ml aufkonzentriert. Die Elementanalyse wurde am *Institute for Analytical Sciences* (Dortmund) durch A. von Bohlen durchgeführt (Schilling *et al.*, 2005; Schilling *et al.*, 2007a). Die Messung erfolgte mit drei unabhängig voneinander präparierten Enzymproben. Als Kontrolle des Hintergrundsignals wurde der Elutions -bzw. Equilibrierungspuffer der Entsalzung verwendet.

2.11.7. Inaktivierung und Reaktivierung der m-isoQC

Zur Generierung des m-isoQC und mQC Apoenzyms wurde initial eine Dialyse über Nacht bei 4°C durchgeführt. Der Dialysepuffer beinhaltete 5mM 1,10-Phenanthrolin, 5mM EDTA, 500mM NaCl in 50mM Bis-Tris pH 6,8. Zur Entfernung der Chelatoren erfolgte eine weitere Dialyse des Apoenzyms entweder gegen 50mM Bis-Tris pH 6,8 und 500mM NaCl oder gegen 10mM NaH_2PO_4 pH 6,8 (für CD-Spektroskopische Untersuchungen). Dabei enthielten die Puffer jeweils 50g/L Chelex-100 (BioRad), um eine Reaktivierung der Enzyme zu verhindern. Die Dialysepuffer wurden nach 2h und 4h gewechselt und die abschließende Dialyse erfolgte über 5h. Alle verwendeten Puffer wurden in Metall-freien Polystyrolflaschen (Corning) hergestellt und gelagert. Abschließend erfolgte eine Zentrifugation des Apoenzyms bei 20000xg für 1h bei 4°C sowie eine Proteinkonzentrationsbestimmung bei 280nm (Gill and von Hippel, 1989). Die Restaktivität des Apoenzyms wurde mittels Aktivitätstest bestimmt (siehe 2.12.1). Für die Reaktivierungsanalysen wurden 20µl der in H_2O (Ultrapure, Merck) gelösten Übergangsmetalle (Mn, Co, Ni, Zn und auch Ca) mit 20µl des Apoenzyms gemischt und für 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Konzentration der Übergangsmetalle richtete sich nach der Enzymkonzentration um ein Verhältnis von Metallion zu m-isoQC von 0, 0,1, 0,2, 0,5, 0,75, 1, 2 und 3 herzustellen. Anschließend erfolgte die Bestimmung der enzymatischen Aktivität (siehe 2.12.1). Dem Reaktionspuffer wurde in

diesem Experiment 2mM EDTA zugesetzt, um eine schnelle Reaktivierung durch im Puffer vorhandenes Zink zu vermeiden.

2.11.8. CD-Spektroskopie

Anhand von Fern-UV CD Spektroskopie wurde untersucht, ob es durch die Entfernung des Zink-Ions zu einer Änderung der Sekundärstruktur der isoQC kommt. Hierfür erfolgte eine Dialyse der Proteine gegen 10mM NaH₂PO₄ pH 6,8. Die Spektren wurden am Jasco J-715 Spectropolarimeter unter Benutzung einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 0,1cm zwischen 190 und 260nm aufgenommen. Jede Analyse basierte auf einer Akkumulation von 10 Spektren. Zusätzlich wurde das Spektrum des Dialysepuffers (Hintergrund) ebenfalls bestimmt, um eine Korrektur der Proteinspektren durchzuführen. Die Konzentration der Proteine wurde so gewählt, dass die Photomultiplierspannung 600V nicht überschritt. Nach der Aufnahme der Spektren erfolgte eine Bestimmung der Aktivität mittels eines isoQC Aktivitätstestes vom Apoenzym und dem reaktivierten Enzym.

Zur Auswertung wurde die molare Elliptizität aus den erhaltenen Messwerten wie folgt berechnet:

$$[\Theta]_{MRW} = \frac{\Theta \times 100 \times M_r}{c \times d \times N_A}$$

Zur Berechnung wurde die Elliptizität Θ in Grad, das Molekulargewicht (M_r), sowie die Aminosäurereste pro Protein (N_A) berücksichtigt.

2.11.9. Proteinextraktion und Konzentrationsbestimmung

Im Rahmen dieser Arbeit kamen verschiedene Aufschlusstechniken zur Proteinextraktion zur Anwendung. Die jeweilige Methode war von dem zu analysierenden Zelltyp bzw. Gewebe abhängig. Zur Ermittlung der QC-Aktivität in Säugerzellen mittels HPLC-UV (siehe 2.12.5) wurden zunächst die Zellen von den Kulturplatten gelöst (z.B. Abklopfen, durch Trypsin/EDTA oder Accutase Behandlung). Es folgte eine Zentrifugation bei 500xg für 5 min. Anschließend wurden die Zellpellets je nach Größe mit PBS-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Die GPP34/GPP34R siRNA behandelten Proben wurden in 300 μ l Homogenisierungspuffer (10mM Tris-HCl pH 7,5, 100mM NaCl, 5mM EDTA, 0,5% Triton und 10% Glycerol) resuspendiert. Die Zellen für die Analyse der Verteilung von QC/isoQC in verschiedenen Zelllinien wurden je nach Größe der Pellets in 150-250 μ l Homogenisierungspuffer aufgenommen. Der Aufschluss erfolgte mittels Ultraschall (2x10s), gefolgt von einer Zentrifugation bei 13000rpm für 30min bei 4°C zur Abtrennung der Zelltrümmer. Die Überstände wurden in ein neues Reaktionsgefäß

überführt und eine Konzentrationsbestimmung mit Hilfe eines Bradford-Testes durchgeführt.

Für die Proteinextraktion aus verschiedenen Mausorganen wurde 2% SDS verwendet. Das SDS war gelöst in H₂O mit Complete Mini (Roche) und AEBSF (Roth), als Protease Inhibitoren. Es wurden maximal 100mg eines Organs in ein Reaktionsgefäß (*Precellys-Keramik-Kit 1,4mm*) eingewogen und mit dem 7fachen Volumen (w/v) an SDS-Puffer versetzt. Anschließend erfolgte die Homogenisierung für 2x30s im *Precellys24* (PeqLab). Es folgte eine Zentrifugation bei 13000rpm für 15min und anschließend eine Überführung des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß. Diesen Überstand sonifizierte man für 2x10s und zentrifugierte zur Abtrennung der Zelltrümmer erneut bei 13000rpm für 15min. Abschließend wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Die Verdünnung der Proben betrug mindestens 1:50, um eine Reaktion des SDS mit dem Coomassie-Brilliantblau zu verhindern.

Die Proteinbestimmung nach Bradford beruht auf einer Absorptionsänderung (595nm) von Coomassie-Brilliantblau in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration (Bradford, 1976). Zur Bestimmung wurden 750µl Bradford Reagenz (Sigma, Steinheim) mit 25µl einer wässrigen Probe gemischt und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer Standardkurve ermittelt, die mit Hilfe von Rinderserumalbumin erstellt worden war. Im Konzentrationsbereich von 0 bis 1mg/ml lag eine lineare Abhängigkeit der Absorption bei 595nm von der Proteinkonzentration vor.

2.11.10. Co-Immunpräzipitation

Die Co-Immunpräzipitation der h-isoQC mit GPP34 oder GPP34R Antikörper erfolgte aus nativen HEK293 Zellen. Diese wurden vom Boden der Kulturflasche abgeklopft und in 1xPBS aufgenommen und bei 500xg für 5 min zentrifugiert. Zum Resuspendieren kam 1ml Homogenisierungspuffer (10mM Tris-HCl pH 7,5, 100mM NaCl, 5mM EDTA, 0,5% Triton und 10% Glycerol) zur Anwendung. Dieser enthielt ein Proteaseinhibitorgemisch (Complete Mini (Roche) und AEBSF (Roth)). Der Aufschluss der Zellen mit Hilfe eines *Potter Cell* Homogenisators basiert auf der Erzeugung von Über- und Unterdruck. Nach dem Aufschluss wurde die Lösung bei 13.000rpm für 15min zentrifugiert und die Proteinkonzentration im Überstand mittels Bradford-Reagenz bestimmt. Die Präzipitation erfolgte jeweils mit den gleichen Gesamtproteinmengen des Aufschlusses. Es wurden anschließend 4µg anti-GPP34 Antikörper (abcam) oder 1µg anti-GPP34R Antikörper (Sigma) zur Proteinlösung gegeben und bei 9°C über Nacht unter Schütteln (300rpm) inkubiert. In der Negativkontrolle der Co-Immunpräzipitation ersetzte Wasser den Antikörper. Am

nächsten Tag folgte die Präzipitation der gebundenen Proteine mit Hilfe von jeweils 160µl magnetischen *Beads* (*Dynabeads® M-280 Sheep anti-Mouse IgG* für GPP34 und *Dynabeads® M-280 Sheep anti-Rabbit IgG* für GPP34R, Invitrogen) Hierfür wurden die *beads* initial 3x mit PBS (Invitrogen) gewaschen und über Nacht bei 4°C in einem Überkopfschüttler belassen. Vor der Elution mit 30µl SDS-Gel Ladepuffer wurden die *beads* erneut 3x mit PBS gewaschen. Die Elution wurde in einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt und mittels *Western Blot* auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Zur Detektion der h-isoQC kam der anti-h-isoQC Antikörper 5406 zum Einsatz.

Die Co-Immunpräzipitation von gereinigtem GPP34 und Vps74 erfolgte mittels biotinylierten Peptiden. Hierfür wurden die zytoplasmatischen Sequenzen der h-isoQC, GnT-IX, St6Gal I und der Hefe-Kre2 mit einem Biotinrest am C-Terminus synthetisiert. Der Biotinrest wurde mit Hilfe eines PEG-*spacers* von der eigentlichen Sequenz getrennt. Für die Präzipitation erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 8°C von 250pmol Peptid mit 125pmol der gereinigten Proteine. Der verwendete Puffer bestand aus 10mM Tris-HCl pH 8,5, 300mM NaCl und 5mM DTT. Der Peptid-Protein-Komplex wurde nachfolgend mit Hilfe von 50µl Streptavidin-magnetischen-*Beads* (*Dynabeads® M-280 Streptavidin*, Invitrogen) für eine Stunde bei Raumtemperatur präzipitiert. Anschließend erfolgte ein Waschschriff mit PBS-Puffer der 0,1% BSA enthielt. Die Elution erfolgte mit Hilfe der Zugabe von 30µl SDS-PAGE Probenpuffer. Die eluierten Proteine detektierte man mit Hilfe von SDS-PAGE mit anschließenden Westerblot und mit Hilfe eines penta-His- Antikörpers (Qiagen).

2.12. Enzymologische Methoden

2.12.1. Bestimmung der isoQC Aktivität und der katalytischen Parameter des Umsatzes von Peptidsurrogaten

Die im Rahmen dieser Arbeit angewendete fluorometrische Testmethode beruht auf der Bestimmung der isoQC-Aktivität durch Freisetzung eines Fluoreszenzfarbstoffes. Der Fluoreszenzfarbstoff wird mit Hilfe einer gekoppelten Reaktion freigesetzt. Die Pyroglutamyl-Aminopeptidase (pGAP) dient dabei als Hilfsenzym. Das durch die isoQC-Aktivität entstehende pGlu-Intermediat wird durch die pGAP hydrolysiert und der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt (Schilling *et al.*, 2002b). Da dieser Test unempfindlich gegenüber Ammoniumionen im Messansatz ist, wurde er zur Bestimmung der isoQC-Aktivität während der Proteinexpression, und der Reinigung sowie auch bei den Reaktivierungsmessungen eingesetzt. Der Messansatz und die Reaktionsbedingungen sind Tabelle 2-15 zu entnehmen.

Tabelle 2-15: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur fluorimetrischen Bestimmung der QC-Aktivität.

Präinkubation $t=15\text{min}$; Start der Reaktion durch QC Zugabe; Messung bei 30°C für $\approx 20\text{min}$; Messgerät: PolarStar, BMG Labtechnologies.

Komponenten		
Substrat	H-Gln- β NA, 0,2mM i.A. (in Messpuffer)	197,5 μ l
Hilfsenzym	pGAP ($0,1 \text{ units}/_{250\mu\text{l}}$) (in Messpuffer)	2,5 μ l
Messpuffer	(0,2M Tris, 0,02M EDTA; pH 8)	25 μ l
Probe		25 μ l

Da die Auswahl an möglichen Substraten bei diesem Test sehr eingeschränkt ist, konnten die kinetischen Parameter K_M und k_{cat} nur für die Peptidsurrogate L-Glutaminyl-2-Naphtylamin (β NA: Anregungswellenlänge $\lambda_A=320\text{nm}$, Emissionswellenlänge $\lambda_E=410\text{nm}$) sowie L-Glutaminyl-4-Methylcoumarinylamid (AMC: $\lambda_E=465\text{nm}$, $\lambda_A=380\text{nm}$) bestimmt werden. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass das Hilfsenzym die Untersuchung verschiedener Reaktionsbedingungen ermöglicht. Aus diesem Grund konnten mit Hilfe dieses Tests die Inhibitorkonstanten (siehe 2.12.3) sowie die pH-Abhängigkeit (siehe 2.12.4) der isoQCs untersucht werden.

Grundlage für die Ermittlung der kinetischen Parameter K_M und V_{max} ist die Bestimmung der enzymatischen Aktivität bei verschiedenen Substratkonzentrationen $[S]$ im Bereich von ca. $0,25 \times K_M$ bis $10 \times K_M$. Es wurden 200 μ l Substrat, welches in Messpuffer (50mM Tris-HCl, pH=8) gelöst war, in den verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Zusätzlich wurden 25 μ l pGAP ($0,1 \text{ units}/_{250\mu\text{l}}$), ebenfalls in Messpuffer verdünnt, zugegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation dieses Messansatzes für 15min bei 30°C in einer 96 well Mikrotiterplatte (Greiner bio-one). Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms gestartet und etwa 25min verfolgt. Die Enzymkonzentration wurde so gewählt, dass über einen längeren Zeitraum eine lineare Abhängigkeit der Produktbildung von der Zeit vorlag. Eine Berechnung der kinetischen Parameter erfolgte anhand des Modells nach Michaelis und Menten (Software Grafit, Version 5.0.4 für Windows; Erithacus Software Ltd., Horley, GB). Die Bestimmung der katalytischen Parameter basierte stets auf drei unabhängigen Analysen.

2.12.2. Bestimmung der katalytischen Parameter für Peptide und physiologischen Substrate

Eine weitere Nachweismethode kam für die detailliertere Untersuchung der Substratspezifität zur Anwendung. Die Grundlage dieser Methode ist die Bestimmung der isoQC-Aktivität durch Kopplung mit der Glutamatdehydrogenase (GDH)-katalysierten Umsetzung von NADH. Das Substrat wird durch die QC-Aktivität in ein pGlu-Peptid umgewandelt. Bei dieser Reaktion wird Ammoniak frei. Ammoniak reagiert mit α -Ketoglutarat und NADH zu Glutamat und NAD^+ . Diese Reaktion wird durch das Hilfsenzym GDH katalysiert. Die Umwandlung von NADH zu NAD^+ kann durch

Messung der Absorption bei 340nm verfolgt werden. Dieser Test wurde zur Ermittlung von K_M und V_{max} der Umsetzung verschiedener Glutaminyl-Substrate durch QC genutzt (Schilling *et al.*, 2002b). Die Zusammensetzung der Messansätze ist in Tabelle 2-16 dargestellt. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass eine Vielzahl verschiedener Peptide und auch physiologischer Substrate untersucht werden kann. Die Bestimmung der K_M - und V_{max} -Werte erfolgte wie zuvor beschrieben (siehe 2.12.1).

Tabelle 2-16: Zusammensetzung der Reaktionsansätze zur spektrophotometrischen Bestimmung von K_M und V_{max} .

Präinkubation $t = 15\text{min}$, Start durch QC-Zugabe, $\vartheta_{\text{mess}} = 30^\circ\text{C}$, $t_{\text{mess}} \approx 20\text{min}$, Messgerät: FLUOstar, BMG Labtechnologies; Messpuffer: 50mM Tris, pH 8

Komponente		
Substrat	(in Messpuffer gelöst)	50 μl
Hilfssubstrat	(in Messpuffer gelöst)	
	α -Ketoglutarat	73 μl (50mM)
	NADH ⁺⁺ H	73 μl (1mM)
Hilfsenzym	GDH (in Hilfssubstrat verdünnt)	4 μl (7,5 ^{units} / μl)
Enzymprobe	(in Messpuffer verdünnt)	50 μl

Die Bestimmung der katalytischen Parameter für die Chemokine (CCL7, CCL8 und CCL13) erfolgte mittels des Spektrometers Lambda20 (Perkin Elmer). Die Auswertung der Zeitumsatzkurven erfolgte mit Hilfe der integrierten Form der Michaelis-Menten Gleichung $t = P/V_{max} - K_M/V_{max} \cdot \ln(1-P/S_0)$ wie vorhergehend beschrieben wurde (Cynis *et al.*, 2011). Diese Auswertung ist möglich, da der Verbrauch des NADH der Produktbildung entspricht. Zusätzlich wurden ebenfalls die jeweiligen Anfangsanstiege der Progresskurven zur Bestimmung der k_{cat}/K_M Werte verwendet, da sie alle unterhalb des K_M Wertes lagen.

2.12.3. Bestimmung der Inhibitorkonstante (K_i)

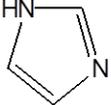
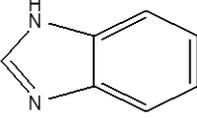
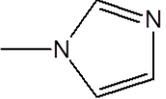
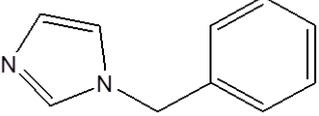
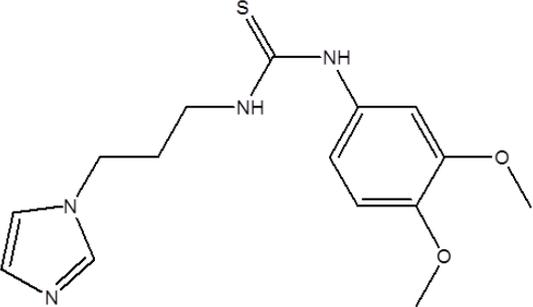
Zur Ermittlung von K_i wurde die Enzymaktivität bei verschiedenen Substratkonzentrationen im Bereich zwischen $0,25xK_M$ und $4xK_M$ in Kombination mit verschiedenen Inhibitorkonzentrationen bestimmt. Als Substrat kam dabei Q-AMC zum Einsatz, welches im Gegensatz zu Q- β NA eine nur schwache Substrathemmung aufweist. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen: 100 μl Substrat (gelöst in Messpuffer: 50mM Tris pH 8), 100 μl Inhibitor (gelöst in Messpuffer), 25 μl pGAP ($0,1^{\text{units}}/_{250\mu\text{l}}$). Nach 15 min Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 25 μl Enzym gestartet. Eine Berechnung der Parameter erfolgte mit Hilfe der Software Grafit,

anhand der Michaelis-Menten-Gleichung, unter Berücksichtigung einer kompetitiven

$$\text{Inhibierung } v = \frac{V_{\max} S}{K_M \left(1 + \frac{I}{K_I} \right) + S} .$$

Die Strukturen der untersuchten Imidazolderivate als kompetitive Inhibitoren sind in Tabelle 2-17 dargestellt.

Tabelle 2-17: Struktur der untersuchten kompetitiven Inhibitoren.

Name	Struktur
1H-Imidazol	
Benzimidazol	
1-Methylimidazol	
1-Benzylimidazol	
1-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-3-(3-imidazol-1-yl-propyl)-thioharnstoff (PQ50/PBD150)	

2.12.4. Untersuchung der pH Abhängigkeit

Zur Untersuchung der pH-Abhängigkeit, der durch die m-isoQC und mQC katalysierten Reaktion, wurde die Enzymaktivität bei verschiedenen pH-Werten (zwischen pH 5,2 und 9) bestimmt. Der verwendete Messpuffer bestand aus 200mM Tris, 100mM Mes, 100mM Acetat. Der pH-Wert wurde mittels NaOH bzw. HCl eingestellt. Dieses Puffersystem wurde verwendet, da die Ionenstärke über einen breiten pH-Bereich konstant bleibt (Ellis & Morrison, 1982). Dadurch sind Unterschiede in der katalytischen Aktivität der m-isoQC und mQC nur auf Unterschiede im pH-Wert zurückzuführen. Der Messansatz setzte sich wie folgt zusammen: 75µl Q-AMC (23µM gelöst in dest. H₂O), 25µl pGAP (0,1^{units}/_{250µl}, verdünnt in physiologischer NaCl) und 125µl Puffer. Die

Reaktion wurde auch in dieser Messung durch Zugabe von 25µl Enzym (verdünnt in physiologischer Kochsalzlösung) nach 15 min Inkubation bei 30°C gestartet.

Zur Messung setzte man eine Substratkonzentration ein, die weit unter dem bereits ermittelten K_M -Wert lag ($S \ll K_M$). Dadurch konnte direkt auf die Abhängigkeit von k_{kat}/K_M geschlossen werden. Eine Berechnung der pK_A -Werte erfolgte anhand der Software Grafit mittels einer Modellgleichung, welche auf der Annahme von drei an der Katalyse beteiligter dissoziierender Gruppen beruht (Schilling *et al.*, 2003b; Schilling *et al.*, 2005).

2.12.5. QC/isoQC Aktivitätsbestimmung mit HPLC-UV

Eine weitere Methode zur Bestimmung der QC/isoQC-Aktivität stellte die Trennung und Quantifizierung von Substrat und Produkt mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC-UV) dar. Im Gegensatz zu den vorher beschriebenen gekoppelten Enzymtests erfolgte hier eine direkte Detektion der pGlu-Bildung. Als Substrat für die Reaktion diente Glutamin- β -Naphthylamin (Q- β NA), welches zu Pyroglutamat- β -Naphthylamin umgesetzt wurde. Das Produkt pGlu- β NA ist aufgrund seiner zyklischen Struktur hydrophober als das Substrat, was eine Trennung ermöglichte.

Diese Methode kam zur Analyse der isoQC-Aktivität der HEK293-Zellen nach siRNA Behandlung und ebenfalls bei der Analyse der QC/isoQC Aktivität in verschiedenen Zelllinien und den entsprechenden konditionierten Medien zur Anwendung. Die Proteinextraktion aus den Zellen ist unter 2.11.9 beschrieben. Da die QC-Aktivität und Proteinkonzentration in den konditionierten Medien gering war, wurden diese vor der Messung mittels Ultrafiltration (Zentrikon, Novagen) ca. 20fach aufkonzentriert und anschließend die Proteinkonzentration mittels Bradford bestimmt. Es wurden 250µl Substrat (100µM Q β NA in 25mM MOPS-Puffer, pH 7) mit 200µl MOPS-Puffer (25mM; pH 7) gemischt und bei 30°C für 15 min inkubiert. Die Reaktion startete durch Zugabe von 50µl Probe. Die Produktbildung wurde innerhalb von 60 Minuten analysiert. Zu den Zeitpunkten 0, 10, 20, 30, 40, 50 und 60 Minuten wurden jeweils 70µl Probe entnommen und die Reaktion durch 4minütiges Abkochen gestoppt. Die Auftrennung von Substrat und Produkt erfolgte mittels einer C18-Säule mit 5cm Durchmesser und einer Länge von 10cm. Das HPLC-Programm ist in Tabelle 2-18 veranschaulicht. Die Auswertung der erhaltenen Signale erfolgte durch eine Standardgerade verschiedener pE- β NA Konzentrationen.

Tabelle 2-18: HPLC Programm zur Trennung von pE-βNA und Q-βNA.

Zeit [min]	Anteil H ₂ O [%]	Anteil Acetonitril [%]
0	77	23
8	55	45
10	5	95
15	5	95
20	77	23
25	77	23

2.13. Kristallisation

2.13.1. Deglykosylierung von h-isoQC

Für die Kristallisation wurde die h-isoQC auf etwa 13mg/ml aufkonzentriert. Anschließend erfolgte eine Deglykosylierung des Enzyms unter Anwesenheit des nicht-ionischen Detergenz MEGA 8. Dafür wurden 280µl h-isoQC mit 1,75µl EndoHf ($4,8 \cdot 10^3$ units/ml) und 70µl MEGA 8 (500mM) über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 13000rpm für 30 min und eine anschließende Proteinkonzentrationsbestimmung bei 280nm im Überstand. Dabei betrug die Proteinkonzentration ca. 10mg/ml nach der Deglykosylierung. Zu dieser Lösung erfolgte die Zugabe von 3,5µl PQ50 (100mM gelöst in H₂O). Dieser Ansatz wurde anschließend für die Kristallisationsversuche verwendet und konnte bei -80°C gelagert werden.

2.13.2. Initiales Pufferscreening

Um Bedingungen zu finden, bei denen die h-isoQC kristallisierte, kam ein initiales Pufferscreening mit Hilfe der *sitting drop*-Dampfdiffusionsmethode zur Anwendung. Die verwendeten *Screening Kits* sind in Tabelle 2-9 aufgeführt. Es wurden jeweils 70µl der verschiedenen Puffer in die Reservoirs von 96 *well*-Mikrotiterplatten pipettiert. Anschließend erfolgte die Mischung von 0,3µl Proteinlösung mit 0,3µl der jeweiligen Reservoir-Lösung auf den zugehörigen Plateaus der Mikrotiterplatten mit Hilfe eines Kristallisationsroboters Cartesian Microsys 4000 (Genomic Solutions). Ein luftdichtes Verschließen der Platten verhinderte das Austrocknen und ermöglichte die Inkubation über mehrere Wochen bei 13°C. In definierten Zeitabständen wurden die Ansätze mit Hilfe des Mikroplatten-*Imaging System* Ministel DT UV (Rigaku) auf eine Kristallbildung hin analysiert. Mit Hilfe dieser Ansätze konnten zwei verschiedene Pufferbedingungen erhalten werden, bei denen die deglykosylierte h-isoQC kristallisierte und zur weiteren Verbesserung der Kristalle verwendet wurden.

Puffer 1: 50mM NaCitrat pH=5

20% (w/v) PEG3350

Puffer 2: 100mM NaCitrat

50mM (NH₄)₂SO₄

15% (w/v) PEG 8000

2.13.3. Validierung und Variation der Pufferbedingungen

Für eine Validierung der erhaltenen Pufferbedingungen wurde die Kristallisation in einem größeren Maßstab mittels *hanging drop*-Dampfdiffusion durchgeführt. Dafür wurden jeweils 500µl Puffer in die Reservoirs von 24 *well*-Mikrotiterplatten pipettiert. Anschließend erfolgte das Mischen von 1µl Reservoir-Lösung mit 1µl Proteinlösung auf der Innenseite der Deckel der *wells*. Die verschiedenen Ansätze wurden entweder bei Raumtemperatur oder bei 13°C inkubiert.

Für eine Verbesserung der Kristallform der h-isoQC in den beiden ermittelten Puffern wurde eine Variation der Pufferbedingungen vorgenommen. Als erstes wurden verschiedene Polyethylenglykole (PEG) (400, 3000, 3350, 4000, 6000, 8000, 10.000, 20.000 und 35.000) getestet, wobei die anderen Bedingungen des Puffers gleich blieben. Das Ansetzen mit diesen Puffern und die Inkubation erfolgten wie zuvor beschrieben. Durch diese Veränderungen ergaben sich etwas verbesserte Kristalle in folgenden Puffern.

Puffer 1: 50mM NaCitrat pH=5

20% (w/v) PEG10.000 bzw. 35.000

Puffer 2: 100mM NaCitrat

50mM (NH₄)₂SO₄

15% (w/v) PEG 35.000

Zusätzlich wurde bei diesen neuen Bedingungen eine Variation der PEG Konzentration vorgenommen (13%-17%). Mit Puffer 1 konnten auch hier Kristalle, jedoch kein Beugungsmuster erhalten werden. Deshalb wurde mit Puffer 2 weiter gearbeitet und zusätzlich zu den verschiedenen PEG Konzentrationen auch die Ammoniumsulfatkonzentration (100mM und 200mM) sowie die pH-Werte (4,5-8,7) verändert. Somit konnte durch die Änderung der Kristallisationsbedingungen ein Puffer erhalten werden (100mM NaCitrat pH=6,5, 100mM (NH₄)₂SO₄ und 13% PEG 35.000) der Kristalle hervorbrachte, welche ein Diffraktionsmuster zeigten. Diese wurden abschließend am *beam line Bessx-MX BL 14.1* Synchrotron Berlin durch D. Ruiz-Carrillo (MLU, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Abteilung physikalische Biotechnologie) vermessen und die erhaltenen Beugungsdaten ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1. Heterologe Expression von isoQC in der Hefe *P. pastoris*

QC und isoQC stellen Zielenzyme der Wirkstoffentwicklung dar, da die Unterdrückung der posttranslationalen Modifikation in verschiedenen Modellsystemen eine therapeutische Wirkung zeigte (siehe Einleitung, Seite 9-12). Die genaue Kenntnis der Enzymeigenschaften z.B. ihrer enzymatischen Aktivität und Lokalisation ist für die Wirkstoffentwicklung eine Voraussetzung. Da die QC in Bezug auf die enzymatischen und strukturellen Eigenschaften bereits gut charakterisiert wurde, sollten vergleichende Analysen ebenfalls mit der isoQC durchgeführt werden. Dabei war neben der Untersuchung der humanen isoQC (h-isoQC) auch die Charakterisierung der isoQC aus Maus (m-isoQC) und Ratte (r-isoQC) notwendig. Dies ist insbesondere für tierexperimentelle Studien bedeutsam, da die Wirkstoffkandidaten vor allem an Nagermodellen getestet werden. Ein Vergleich der drei isoQCs zeigt eine Sequenzidentität von 83% auf. Neben der Transmembransequenz sind ebenfalls die Disulfidbrücke und das Zinkbindungsmotiv konserviert. Generell weisen die C-terminal lokalisierten katalytischen Domänen eine sehr hohe Homologie auf (Abbildung 3-1). Für eine Charakterisierung der Proteine war es notwendig, eine Strategie zur Expression der isoQC-cDNA und die Reinigung des Enzyms zu entwickeln. Die Expression sollte in der Hefe *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) erfolgen, da vorhergehende Untersuchungen zeigten, dass das Protein in *Escherichia coli* (*E. coli*) fast ausschließlich in inaktiven Aggregaten abgelagert wurde (Koch, 2006). Für eine effiziente Expression bzw. Sekretion der isoQCs in *P. pastoris* erfolgte die Integration in einen Vektor, welcher die alpha-Faktor Sequenz enthielt. Dadurch konnte eine sekretorische Expression gewährleistet werden. Zusätzlich erfolgte noch eine weitere Modifikation der isoQC Sequenzen zur Expressionsoptimierung, welche in den nachfolgenden Kapiteln erläutert werden.

```

h-isoQC  MRSGGRGRPRRLRLGERGLMEPLLPKRRLLPRVHLLP-LLLALAVGSAFYTIWSGMHRRT
m-isoQC  MSPGSRGRPRQRLEDRGLMKPPSLSKRRLPRVQFLPLLLLALAMGLAFYIVWNSMHPGV
r-isoQC  MSPASGRSRQRLEDGRGLMKPPSLSKRRLPRVQLLPLLLLALALGLAFYIVWNSMHPGV
*  ...**.* ** :****:*  *****: ** *****: * ** :*..** .

h-isoQC  EELPLGRELRVPLIGSLPEARLRRVVGQLDPQRLMSTYLRPLLVVRTPGSPGNLQVRKFL
m-isoQC  EEMSRSDLRVPLIGSLSEAKLRLVVGQLDPQRLWGTFLRPLLIVRPPGSPGNLQVRKFL
r-isoQC  EEVSRSDLRVPLIGSLSEAKLRLVVGQLDPQRLWGTFLRPLLIVRPPGSPGNLQVRKFL
**:.  .*:*****.**:** *****. *:*****:*.**.******

h-isoQC  EATLRSLTAGWHVELDPFTASTPLGVPDFGNVVATLDPGAARHLTLACCHYDSKLFPPGST
m-isoQC  EATLQSLTAGWHVELDPFTASTPLGVPDFGNVVATLDPGAARHLTLACCHYDSKFFPPGLP
r-isoQC  EATLQSLTAGWHVELDPFTASTPLGVPDFGNVVATLDPGAARHLTLACCHYDSKFFPPGLP
*****: ** :*****.*****:*****.*****:*****.*****

h-isoQC  PFVGATD[BAVE]CALLELAQALDLELSRAKKQAAPVTLQLLFLDGE[EA]LKEWGPKDSLYG
m-isoQC  PFVGATD[BAVE]CALLELVQALDAML SRIKQQAAPVTLQLLFLG-[EA]LKEWGPKDSLYG
r-isoQC  PFVGATD[BAVE]CALLELVQALDVML SRIKQQAAPVTLQLLFLDGE[EA]LKEWGPKDSLYG
*****.***** ** *:*****.*****.*****

h-isoQC  SRHLAQLMESIPHS PGPTRIQAIELFVLLDGLGAPNPTFYSHF PRTVRWFHRLRS IEKRL
m-isoQC  SRHLAQIMESIPHS PGPTRIQAIELFVLLDGLGASSPIFFSHF PR TARWFQRLRS IEKRL
r-isoQC  SRHLAQIMESIPHS PGPTRIQAIELFVLLDGLGAPSPIFFSHF PR TARWFQRLRS IEKRL
*****:*****.*****.* *:*****.* ** :*****

h-isoQC  HRLNLLQSHPQEVMYFQPGEP SGSVEDDHIPFLRRGVPVHLHISTPFPVAV[HT]PADTEVN
m-isoQC  HRLNLLQSHPQEVMYFQPGEP PGPVEDDHIPFLRRGVPVHLHIATPFPVAV[HT]PADTEAN
r-isoQC  HRLNLLQSHPQEVMYFQPGEP PGPVEDDHIPFLRRGVPVHLHIAMPFPVAV[HT]PADTEAN
*****.*****.* *****:*****.* *****.*

h-isoQC  LHPPTVHNL CRILAVFLAEYLGL
m-isoQC  LHPPTVHNL SRILAVFLAEYLGL
r-isoQC  LHPPTVHNL SRILAVFLAEYLGL

*****.*****

```

Abbildung 3-1: Aminosäuresequenzvergleich der h-, m- und r-isoQC.

Das Protein humanen Ursprungs weist eine Sequenzidentität von 83% zu der Nager-isoQC auf. In **Blau** ist die Transmembransequenz, in **Grün** das Zink-Bindungsmotiv und in **Rot** die Cysteine der konservierten Disulfidbrücke markiert.

3.1.1. Isolierung der h-isoQC nach heterologer Expression

Die h-isoQC ist ein membranständiges, offenbar ausschließlich im Golgi-Apparat lokalisiertes Protein. Die Funktion des N-terminalen Bereiches ist vermutlich anderen Proteinen des Golgi-Apparates, z.B. Glykosyltransferasen, analog. Diese Enzyme bestehen aus einer kurzen zytoplasmatischen Sequenz, an welche sich eine Transmembransequenz und eine kurze Stammregion anschließt. Die globuläre, katalytische Domäne befindet sich C-terminal der Stammregion. In einer vorangegangenen Diplomarbeit wurde gezeigt, dass eine Sekretion nur erfolgt, wenn man 47 Aminosäuren vom N-Terminus deletiert. Des Weiteren wurde festgestellt, dass der Austausch eines Cys im Bereich des C-Terminus (Cys369) in Ala die Ausbeute an sezernierter isoQC erhöhte. Die Einführung einer artifiziellen Glykosylierungsstelle durch den Austausch von Ile73 zu Asn führte ebenfalls zu einer erhöhten Aktivität im Medium der transformierten Hefezellen (isoQC_(F48;I73N;C369A)) (Stephan, 2007). Die verschiedenen Varianten sind schematisch in Abbildung 3-2 dargestellt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine effiziente Methode zur Isolation von h-isoQC zu etablieren, was u.a. Untersuchungen der Proteinstruktur ermöglichen sollte. Aufgrund der Struktur von h-isoQC als Typ II Membranprotein war zu vermuten, dass die Transmembran- und Stammregion teilweise unstrukturiert vorliegt und die Aktivität

des Proteins nicht beeinflusst. Verschiedene Methoden der Prädiktion ergaben unterschiedliche Längen dieser Region, die je nach Vorhersageprogramm die Aminosäuren 35-52 (HMMTOP), 34-55 (SUSOI) oder 40-60 (TMPred) umfasst (Hirokawa *et al.*, 1998; Tusnady & Simon, 2001; Tusnady & Simon, 1998). Dem entsprechend erfolgte für die weitere Optimierung der Sekretion eine Verkürzung des Proteins um weitere 12 Aminosäuren (Glu60), wodurch vermutlich der gesamte unstrukturierte N-terminale Bereich deletiert wurde (siehe Abbildung 3-2). Die resultierenden h-isoQC Varianten beinhalteten zudem die artifizielle Glykosylierungsstelle und die Cys/Ala Mutation (isoQC_(E60;I73N;C369A) N-His), oder nur eine der beiden Modifikationen (isoQC_(E60;I73N) N-His, isoQC_(E60;C369A) N-His; siehe Abbildung 3-2).

Die Proteinvarianten enthielten eine N-terminale polyHis-Fusion, um eine effiziente Reinigung und eine Detektion mittels Western Blot-Analyse zu ermöglichen. In der vorangegangenen Arbeit wurde ein möglicher Einfluss der Position des His-tags (C- oder N-terminal) auf die Aktivität des Proteins ausgeschlossen (Stephan, 2007).

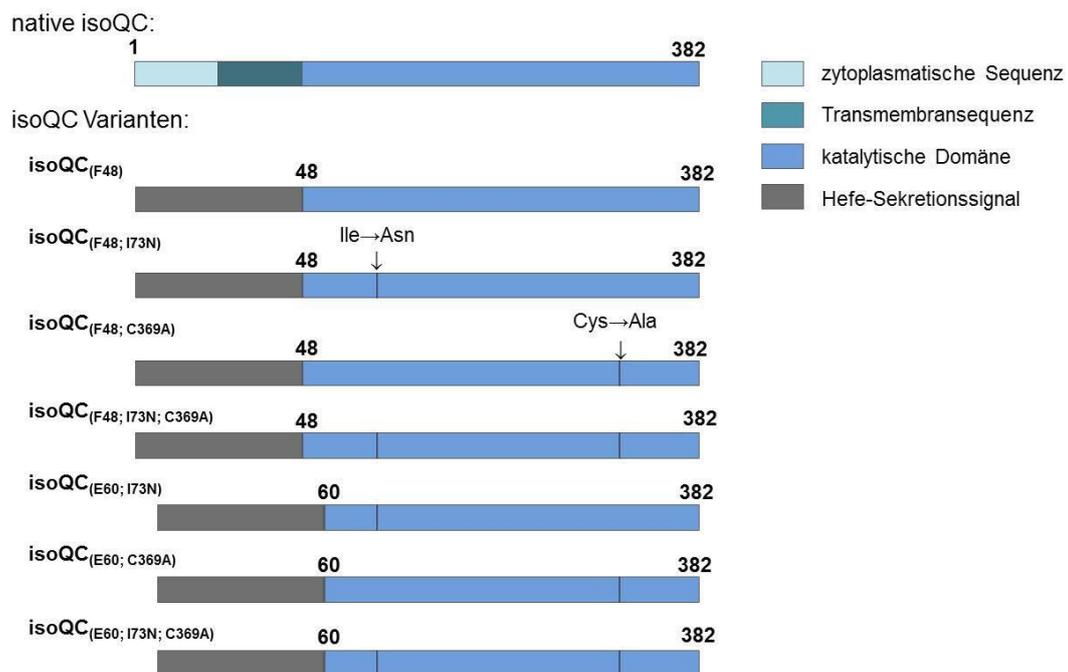


Abbildung 3-2: Schematische Darstellung von h-isoQC-Varianten, welche nach heterologer Expression der cDNA isoliert wurden.

Alle Proteine wurden in das Medium von *Pichia pastoris* sezerniert.

Die Expression bzw. die Sekretion des Proteins in das Medium wurde für die verschiedenen Proteinvarianten mit Hilfe eines gekoppelten enzymatischen Testes untersucht (siehe 2.12.1). Wie in Kapitel 3.1 erläutert, unterschieden sich die Zelllinien nach der Integration des Expressionsplasmides hinsichtlich der Bildung des Zielproteins. Aufgrund dessen wurden von den Transformanten jeweils 50 Kolonien angezogen und zur Untersuchung der QC-Aktivität im Kulturmedium eingesetzt (Abbildung 3-3).

Zur Validierung der Aktivitätsbestimmung erfolgte eine h-isoQC-Detektion mit Hilfe einer *Western Blot*-Analyse. Hierfür wurde das Medium eingengt, die Proteinkonzentration bestimmt und nach einer Deglykosylierung durch Endo Hf mittels SDS-PAGE Gel untersucht (Abbildung 3-3).

Die Glykosylierung von isoQC führte zu einer Erhöhung der Aktivität im Medium (Vergleich isoQC_(F48) und isoQC_(F48;I73N)), was auf eine verbesserte Löslichkeit bzw. geringere Aggregationsneigung des Proteins zurückzuführen sein könnte (Tams *et al.*, 1999; Hoiberg-Nielsen *et al.*, 2006). Zusätzlich zeigte sich, dass der Austausch des Cys zu Ala in einer Steigerung der Aktivität im Medium resultiert (Vergleich isoQC_(F48), isoQC_(F48;C369A) und isoQC_(F48;I73N;C369A)). Im Vergleich der Varianten beginnend mit Phe48 und Glu60 führte die weitere Verkürzung der h-isoQC zu einer etwa zehnfachen Erhöhung der Aktivität im Medium (z.B. Vergleich isoQC_(F48;I73N;C369A) und isoQC_(E60;I73N;C369A)). Mit Hilfe der *Western Blot*-Analyse konnte ein isoQC Signal nur nach Expression der Konstrukte, welche für das N-terminal um 60 Aminosäuren verkürzte Protein codierten, detektiert werden. Die Untersuchungen bestätigten die Ergebnisse der Enzymaktivitätsmessung, das stärkste Signal wurde nach Expression von isoQC_(E60;I73N;C369A) N-His erhalten.

Die Unterschiede in der Enzymaktivität im Medium der Hefekolonien waren wahrscheinlich auf die Integration des Vektors in das Genom zurückzuführen. Mehrfachinsertionen bzw. Integrationen an unterschiedlichen Positionen im Genom verursachen eine verschieden starke Expression nach Transformation (Cereghino & Cregg, 2000).

Somit lässt sich schlussfolgern, dass zur effizienten Sekretion der h-isoQC in das Medium eine N-terminale Verkürzung um 60 Aminosäuren, die Einführung einer Glykosylierungsstelle und der Aminosäureaustausch von C369 notwendig sind.

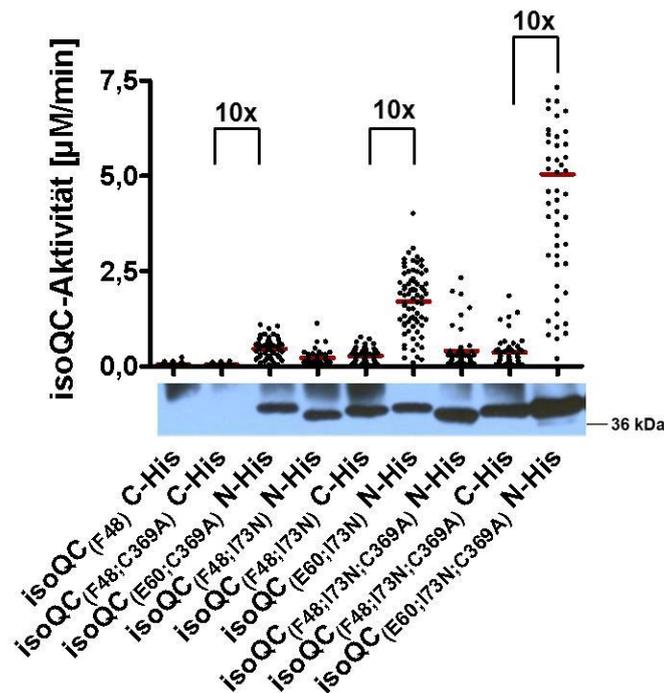


Abbildung 3-3: Untersuchung der heterologen Expression von h-isoQC mittels Aktivitätstest und Western-Blot -Analyse.

Kompetente *Pichia pastoris* wurde mit verschiedenen Expressionsvektoren transformiert und je Konstrukt ca. 50 Kolonien auf die Bildung von isoQC untersucht. Die Bedingungen der Hefekultivierung und des Aktivitätstests sind im Methodenteil beschrieben (siehe 2.12.1). Zur Western-Blot Analyse wurden die Proteine (4 μg) zuvor mittels EndoHf deglykosyliert. Die Detektion von isoQC bei ca. 37kDa erfolgte mittels eines h-isoQC spezifischen, polyklonalen Antikörpers aus Kaninchen (Stephan *et al.*, 2009).

Für weitere Analysen, wie beispielsweise der Untersuchung des Aminosäureaustausches (C369A) auf die Substratspezifität, wurden die isoQC-Varianten beginnend mit Glu60 (isoQC_(E60;I73N;C369A) N-His und isoQC_(E60;I73N) N-His) im präparativen Maßstab (6L Schüttelkolbenkulturen) synthetisiert und mittels Ni-Affinitätschromatographie, hydrophober Interaktionschromatographie (HIC) und einer abschließenden Entsalzung (SEC) gereinigt (Abbildung 3-4). Die Nickel-Affinitätschromatographie führte zu einer initialen Anreicherung eines Proteins mit einer Größe von ca. 50 kDa. Durch die Verwendung der hydrophoben Interaktionschromatographie kam es zu einer Abtrennung von Verunreinigungen, sodass nur die h-isoQC Bande bei ca. 50 kDa mit Hilfe der SDS-PAGE zu detektieren war. Die Breite der Bande ist vermutlich auf eine inhomogene Glykosylierung zurückzuführen (Cereghino & Cregg, 2000). Nach der Deglykosylierung durch Endoglykosidase HF war eine Migration des Proteins bei ca. 37kDa zu beobachten, was dem Molekulargewicht der h-isoQC entspricht. Das deglykosylierte Enzym war ebenfalls aktiv.

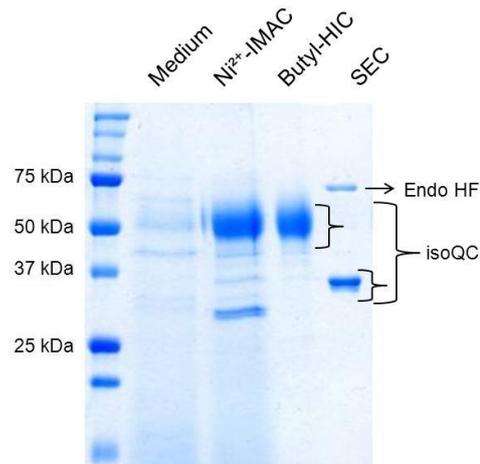


Abbildung 3-4: Charakterisierung der Reinigung von isoQC_(E60,173N,C369A) N-His mittels SDS-PAGE. Analysiert wurden das Hefemedium vor der Reinigung, die vereinigten Fraktionen nach Nickel-Affinitätschromatographie (Ni²⁺-IMAC), hydrophober Interaktions-chromatographie (Butyl-HIC) und der abschließenden Entsalzung (SEC) und Deglykosylierung (siehe Kapitel 2.11.2). Die glykosylierte h-isoQC migrierte aufgrund eines inhomogenen Glykosylierungsmusters zwischen 50-75 kDa. Nach der Deglykosylierung erfolgt eine Änderung der molekularen Masse auf 37kDa. Dabei ist die Bande bei 75kDa dem Deglykosylierungsenzym (EndoHF) zuzuordnen.

3.1.2. Heterologe Expression und Reinigung von m-isoQC und r-isoQC

In Analogie zur Expression der humanen isoQC sollten auch die isoQC aus Maus und Ratte in *P. pastoris* synthetisiert werden. Da es sich bei der m-isoQC und r-isoQC ebenfalls um Typ II Membranproteine handelt, wurden hierbei die verkürzten Varianten beginnend mit Phe49 oder Glu61 und einer Glykosylierungsstelle an Position 74 im Vergleich zur jeweils unglykosylierten Variante untersucht (Abbildung 3-5). Wie zuvor für h-isoQC beobachtet, war auch für die m-isoQC und r-isoQC eine starke Verkürzung der Sequenz bis Glu61 notwendig, um eine Sekretion ins Medium zu erhalten. Die Einführung der artifiziellen Glykosylierungsstelle zeigte keinen Einfluss auf die Aktivität im Medium, was sich von den vorangegangenen Untersuchungen zur h-isoQC unterschied. Im Fall der m-isoQC wurde zusätzlich ein Konstrukt ohne einen His-tag synthetisiert, wobei deutlich wurde, dass die Einführung eines tags keinen Einfluss auf die Sekretion bzw. die Aktivität des Proteins besitzt.

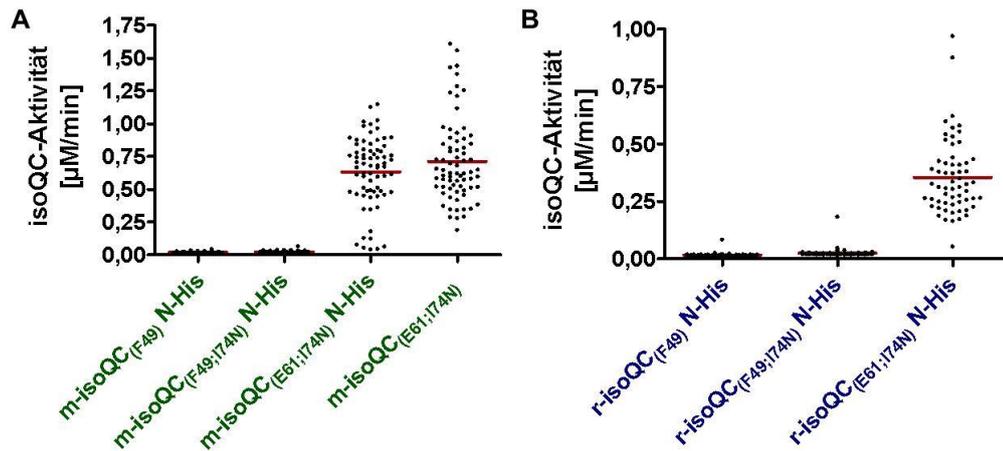


Abbildung 3-5: Darstellung der m-isoQC- (A) und r-isoQC Aktivität (B) im Medium verschiedener *P. pastoris*-Zelllinien, welche zuvor transformiert wurden.

Die Reaktionsbedingungen im Enzymtest sind Kapitel 2.12.1 zu entnehmen. Nach Transformation wurden etwa 50 Kolonien je Konstrukt im analytischen Maßstab (2ml) angezogen und in Bezug auf QC-Aktivität im Kulturmedium analysiert.

Für nachfolgende Analysen wurden sowohl m- als auch r-isoQC mittels Hochzelllichtfermentation synthetisiert. Die Reinigung der r-isoQC erfolgte analog der menschlichen isoQC (Durchführung ist Kapitel 2.11.2 zu entnehmen). Das Enzym der Maus wurde ohne N-terminalen His-tag (m-isoQC_(E61;174N)) nach Fermentation isoliert. Dies war eine Voraussetzung für folgende Analysen, wie z.B. die Ermittlung des Metallgehalts im Enzym, da der His-tag derartige Analysen aufgrund der Affinität zu Metallionen in Lösung beeinträchtigt hätte. Nach einer Reinigung mittels zwei verschiedener hydrophober Interaktionschromatographien (EBA-HIC und Butyl-HIC), gefolgt von einer Anionenaustauschchromatographie (UnoQ) und einer abschließenden Gelfiltration (Superdex 75) erwies sich die Präparation als homogen (siehe Kapitel 2.11.2). Die Reinheit der m-isoQC und r-isoQC wurde mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 3-6).

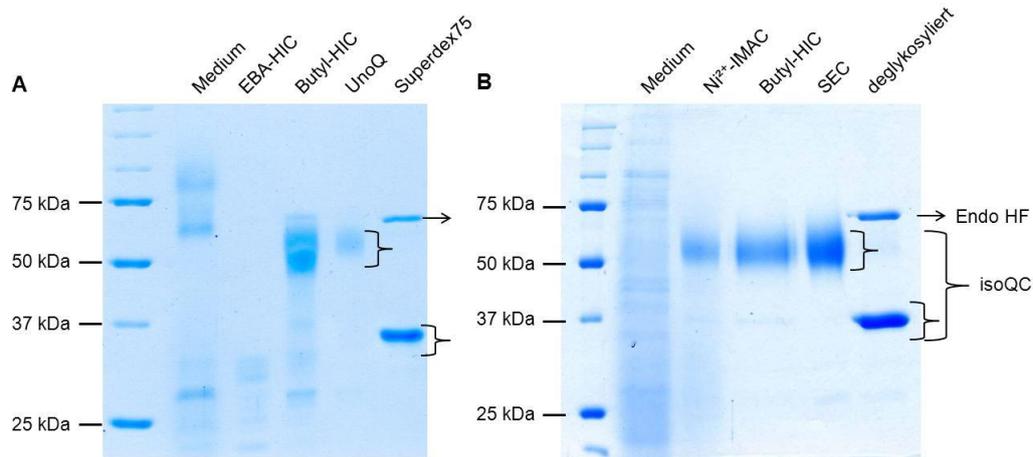


Abbildung 3-6: Analyse der Reinigungsschritte von m-isoQC_(E61;174N) (A) und r-isoQC_(E61;173N) N-His (B) mittels SDS-PAGE.

Die Durchführung der Reinigung ist Kapitel 2.11.2 zu entnehmen. Die glykosylierten isoQC-Proteine migrieren aufgrund von inhomogener Glykosylierung zwischen 50 und 70 kDa. Nach der Deglykosylierung erfolgt eine Verschiebung des Molekulargewichtes zu 37kDa. Dabei ist die Bande bei 75kDa dem Deglykosylierungsenzym (EndoHF) zuzuordnen.

3.2. Untersuchungen zur Substrat – und Inhibitorspezifität von isoQC

3.2.1. Vergleich der kinetischen Parameter des Substratumsatzes durch h-isoQC

Ziel der Untersuchungen war ein Vergleich der verschiedenen Proteinvarianten in Bezug auf die Umsetzung von Glutaminyl-Substraten. Insbesondere sollte auch geklärt werden, ob die N-terminale Verkürzung und Glykosylierung einen Einfluss auf die Hemmung durch Inhibitoren ausübt. Hierfür erfolgte die Bestimmung der kinetischen Parameter des Umsatzes zweier Glutaminyl-Dipeptide (QQ und QE) sowie eines Glutamin-Peptidsurrogates (Q-βNA). Die Ergebnisse sind Tabelle 3-1 zu entnehmen. Diese Untersuchungen wurden mittels isoQC_(F48;173N;C369) C-His sowie einer in *E. coli* exprimierten h-isoQC Variante_(F48) (Cynis *et al.*, 2008a; Stephan *et al.*, 2009) durchgeführt. Dabei erfolgte die Bestimmung der Bindungskonstante (K_M) sowie der katalytischen Konstante (k_{cat}), da eine hyperbole Enzymkinetik vorlag (nicht gezeigt). Anhand dieser Untersuchung wird deutlich, dass bei Q-βNA die Substratbindung am effizientesten ist. Das Peptid QQ weist eine ca. 4fach geringere Affinität auf. Für QE wurde ein K_M -Wert von 1mM ermittelt¹.

Im Gegensatz zu den Michaelis-Menten-Konstanten wurden ähnliche Wechselzahlen (k_{cat}) des Umsatzes der Substrate beobachtet.

Die Spezifitätskonstanten des Umsatzes durch die verschiedenen h-isoQC-Varianten liegen in einer Dimension. Dies lässt darauf schließen, dass die eingefügten

¹ Die im Rahmen dieser Arbeit bestimmten kinetischen Parameter beziehen sich auf die Einstellung eines schnellen Gleichgewichts.

Modifikationen keinen Einfluss auf die Substratumsetzung ausüben. Die geringen Abweichungen innerhalb der K_M -Wertbestimmung sind auf Messungenauigkeiten zurückzuführen.

Tabelle 3-1: Bestimmung der kinetischen Parameter des Substratumsatzes durch verschiedene h-isoQC Varianten.

Die Substrate sind im Einbuchstabencode der Aminosäuren dargestellt. Die Reaktionstemperatur betrug 30°C (Kapitel 2.12.1 und 2.12.2). Es sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Bestimmungen \pm Standardabweichung angegeben.

Substrat	isoQC _(F48;I73N;C369) C-His glykosyliert (a)		isoQC _(E60;I73N;C369A) N-His glykosyliert		isoQC _(E60;I73N;C369A) N-His deglykosyliert		isoQC _(E60;I73N) N-His glykosyliert	
	K_M [μ M]	k_{cat} [s^{-1}]	K_M [μ M]	k_{cat} [s^{-1}]	K_M [μ M]	k_{cat} [s^{-1}]	K_M [μ M]	k_{cat} [s^{-1}]
Q- β NA	35 \pm 1	8,2 \pm 0,9	34 \pm 3	9 \pm 2	39 \pm 2	7 \pm 1	58 \pm 3	12 \pm 1
QQ	110 \pm 10	6,1 \pm 0,1	190 \pm 10	5,7 \pm 0,2	160 \pm 20	4,6 \pm 0,3	190 \pm 3	6,2 \pm 0,1
QE	610 \pm 60	5,3 \pm 0,4	1100 \pm 40	4,9 \pm 0,2	890 \pm 30	4,3 \pm 0,2	790 \pm 20	4,9 \pm 0,1

(a) Stephan *et al.*, 2009

Zur weiteren Validierung dieser Beobachtung wurden die Hemmkonstanten von ausgewählten kompetitiven Inhibitoren anhand der verschiedenen h-isoQC-Varianten bestimmt (Tabelle 3-2). Benzimidazol übte auf die Aktivität aller h-isoQC-Varianten die geringste Hemmung aus. Im Vergleich dazu war Benzylimidazol ca. 40-fach effizienter. Mit dem spezifischen QC-Inhibitor (PQ50), welcher ein Imidazolderivat darstellt (Buchholz *et al.*, 2006), konnte ein K_i -Wert im nanomolaren Bereich detektiert werden. Der Vergleich der verschiedenen h-isoQC-Varianten erbrachte für die getesteten Inhibitoren ähnliche inhibitorische Konstanten.

Tabelle 3-2: Inhibitorkonstanten K_i der Hemmung von h-isoQC durch Imidazolderivate.

Die Bestimmung der K_i -Werte erfolgte mit Q-AMC als Substrat und wurde bei 30°C durchgeführt (siehe Kapitel 2.12.3). Es sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Bestimmungen \pm Standardabweichung angegeben.

Inhibitoren	isoQC _(F48;I73N;C369) C-His glykosyliert (a)	isoQC _(E60;I73N;C369A) N-His glykosyliert	isoQC _(E60;I73N;C369A) N-His deglykosyliert	isoQC _(E60;I73N) N-His glykosyliert
	K_i [μ M]	K_i [μ M]	K_i [μ M]	K_i [μ M]
Benzimidazol	250 \pm 5	240 \pm 20	220 \pm 30	270 \pm 20
Benzylimidazol	6,2 \pm 0,2	8 \pm 0,2	9 \pm 0,1	10 \pm 1
PQ50	0,52 \pm 0,001	0,57 \pm 0,08	0,7 \pm 0,1	0,85 \pm 0,05

(a) Stephan *et al.*, 2009

Anhand dieser Untersuchungen wird deutlich, dass die Verkürzung des N-Terminus bis Glu 60, die Glykosylierung des Proteins und der Austausch von Cys369 zu Ala keinen wesentlichen Einfluss auf die katalytische Aktivität hatten.

Aufgrund dessen wurde für nachfolgende Untersuchungen isoQC_(E60;I73N;C369A) N-His verwendet, da dieses Protein in hohen Mengen hergestellt und isoliert werden konnte.

3.2.2. Vergleich der Substratspezifität von h-isoQC und h-QC

In vorangegangenen Untersuchungen wurde die Substratspezifität von h-QC und h-isoQC mit artifiziellen Peptiden (Di- bis Tetrapeptide) bzw. Peptidsurrogaten (Q-AMC und Q- β NA) analysiert. Dabei wurde festgestellt, dass Substrate mit großen oder hydrophoben Resten an Position zwei oder drei nach dem Glutamin bevorzugt umgesetzt werden. Zusätzlich ließ sich feststellen, dass die Länge der Substrate ebenfalls einen Einfluss auf die Substratspezifität ausübt. Es konnte gezeigt werden, dass Tetrapeptide mit einer höheren katalytischen Effizienz im Vergleich zu Dipeptiden umgesetzt werden (Cynis *et al.*, 2008a; Stephan *et al.*, 2009). Mit Hilfe dieser Substrate konnten keine Unterschiede in der katalytischen Effizienz zwischen den beiden Enzymen detektiert werden.

Die physiologischen Substrate von QC und isoQC sind Peptide unterschiedlicher Länge, wie z.B. die Hormone TRH und GnRH (TRH 3 Aminosäuren, GnRH 10 Aminosäuren). In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass längere Peptide effizienter durch hQC umgesetzt werden (Schilling *et al.*, 2003). Es sollte nun analysiert werden, ob dies auch für den Umsatz durch isoQC zutrifft. Für die Analyse wurden die N-terminalen 10 Aminosäuren der pGlu-Proteine Fraktalkin, α -Amylase, Fibronectin, C-reaktives Protein (CRP) sowie der Chemokine CCL7, 8 und 13 als Substrate verwendet. Zusätzlich wurden Neurotensin und GnRH analysiert (Abbildung 3-7, Sequenzen siehe Anhang Abbildung 7-1). Zur Untersuchung kam ein gekoppelter enzymatischer Aktivitätstest (siehe 2.12.1) zur Anwendung.

GnRH wird durch die h-isoQC und hQC am effizientesten umgesetzt. Dies ist vor allem durch eine potente Bindung des Substrates (K_M 30 μ M) bedingt. Die pGlu-Bildung am Neurotensin erfolgt mit der zweithöchsten Effizienz durch die h-isoQC und h-QC. Die N-Termini von Fraktalkin, α -Amylase und Fibronectin werden durch h-isoQC und h-QC schlechter zyklisiert. Bei diesen Substraten ist auch ein deutlich höherer K_M -Wert zwischen 70-120 μ M zu detektieren (Abbildung 3-7 B). Die schlechtesten Substrate sowohl für die h-isoQC als auch die h-QC stellen die hier getesteten N-Termini der Chemokine dar, die mit einer katalytischen Spezifität von etwa 15 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ für die h-isoQC und etwa 5 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ für die h-QC umgesetzt werden (Abbildung 3-7 A). Dabei war die niedrige Spezifitätskonstante der Umsetzung der Chemokine bei der h-isoQC auf eine niedrige Umsatzrate zurückzuführen. Im Vergleich dazu weist die h-QC eine geringere Substrataffinität zu diesen getesteten Chemokinen auf (Abbildung 3-7 B).

Beim Vergleich der Spezifitätskonstanten (k_{cat}/K_M) der beiden Enzyme für die getesteten Substrate wird deutlich, dass die h-QC die überwiegende Mehrzahl der Peptide etwas besser umsetzte. Allerdings zeigte sich, dass für sechs von neun getesteten Substraten die K_M -Werte für die h-isoQC niedriger, d.h. die Bindung der

verschiedenen Substrate effizienter, als für die h-QC sind. Die höheren k_{cat}/K_M Werte des Substratumsatzes durch h-QC sind auf die Wechselzahl (k_{cat}) zurückzuführen. In vorhergehenden Analysen konnte mit Oligopeptid-Substraten (max. vier Aminosäuren) ein Unterschied in der Substratspezifität zwischen QC und isoQC festgestellt werden (Cynis *et al.*, 2008a). Die hier untersuchten physiologischen Substrate, die eine Länge von mind. zehn Aminosäuren besitzen, werden durch beide Isoenzyme ähnlich effizient umgesetzt (z.B. bei Fibronectin, Neurotensin, GnRH und Fraktalkin). Offensichtlich tragen Sekundärinteraktionen mit längeren Peptiden zum Substratumsatz bei. Eine Ausnahme unter den hier getesteten Substraten stellt die Gruppe der Chemokine (CCL7, CCL8 und CCL13) dar. Die analysierten Chemokine werden von QC schlechter als von der isoQC umgesetzt. Dies lag hauptsächlich in den deutlich höheren K_M -Werten begründet, welche mit der hQC bestimmt wurden. Die getesteten Chemokine haben an der zweiten Position ein Prolin, wodurch beide Enzyme die pGlu-Bildung im Vergleich zu den anderen Substraten sehr ineffizient katalysieren. Dies konnte ebenfalls für ein weiteres Chemokin (CCL2) gezeigt werden (Cynis *et al.*, 2011). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit Hilfe dieser *in vitro*-Analysen keine unterschiedliche Präferenz der beiden Enzyme für physiologische Substrate detektiert werden konnte. Vermutlich führt die unterschiedliche Lokalisation beider Enzyme in der Zelle zur Umsetzung verschiedener Substrate (Cynis *et al.*, 2011; Schilling *et al.*, 2011).

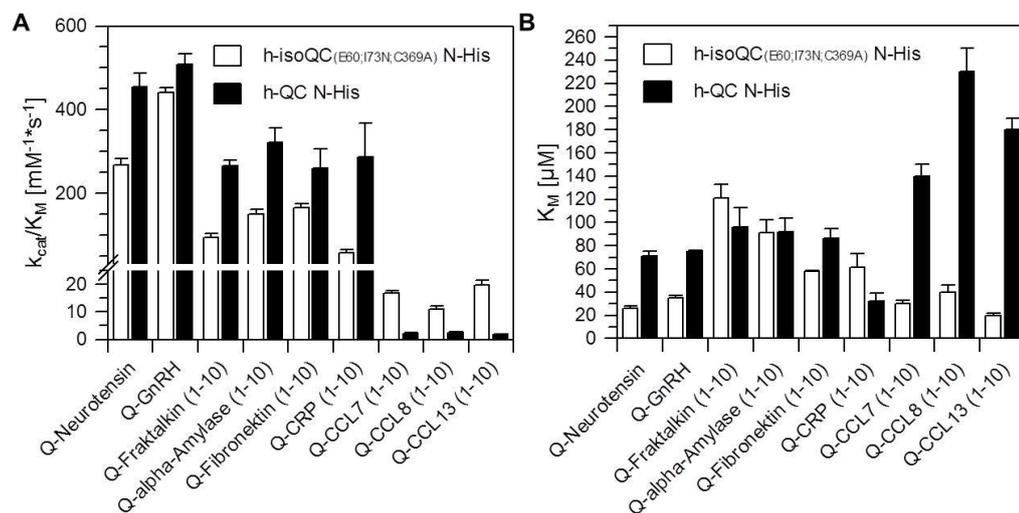


Abbildung 3-7: Vergleich der kinetischen Parameter k_{cat}/K_M (A) und K_M (B) des Umsatzes verschiedener physiologischer Substrate durch h-isoQC und h-QC.

Die Untersuchungen wurden mittels kontinuierlichen Aktivitätstests bei 30°C durchgeführt (Kapitel 2.12.2). Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Bestimmungen. Innerhalb der Klammern sind die Längen der eingesetzten Peptide bei Verwendung verkürzter Sequenzen angegeben.

3.2.3. Untersuchung der Substrat- und Inhibitorspezifität von m- und r-isoQC im Vergleich zur h-isoQC

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zusätzlich eine Charakterisierung der Substrat- und Inhibitorspezifität von m- und r-isoQC durchgeführt werden, um eine vergleichende Analyse zur h-isoQC zu ermöglichen. In Analogie zur Untersuchung der Substratspezifität der h-isoQC_(F48;I73N;C369A) N-His wurden die bereits verwendeten Substrate auf einen Umsatz durch isoQC aus Maus und Ratte untersucht. Es wurde ein Vergleich mit der h-isoQC Variante beginnend mit Phe48 vorgenommen, da mit dieser Variante vorhergehend eine detaillierte Untersuchung mit verschiedenen Glutamin-Substraten durchgeführt wurde. Dies war möglich, da bei den Untersuchungen der verkürzten isoQC beginnend mit Glu60 keine Unterschiede für die drei getesteten Substrate festgestellt wurden (siehe Kapitel 3.2.1). Die Auswahl der Substrate erfolgte anhand von Untersuchungen zur h-isoQC sowie der Säuger-QCs, die zeigten, dass die Substratspezifität zum einen von den auf das Glutamin folgenden Aminosäuren und auch von der Länge des eingesetzten Peptides abhängt (Cynis *et al.*, 2008a; Schilling *et al.*, 2005; Schilling *et al.*, 2003a). Zusätzlich wurden noch die kinetischen Parameter der Peptidsurrogate Q-βNA und Q-AMC bestimmt, da sie in den verschiedenen Aktivitätsbestimmungen und K_i -Messungen zum Einsatz kamen. Anhand dieser Untersuchungen lassen sich erste Rückschlüsse auf den Aufbau der aktiven Zentren der Nager isoQCs im Vergleich zur h-isoQC ziehen.

In Abbildung 3-8 ist ein Vergleich der Substratspezifität (k_{cat}/K_M) der drei isoQCs dargestellt. Die Dipeptide QQ, QE und QG wurden mit der geringsten katalytischen Effizienz umgesetzt. Im Vergleich von QE mit dem Tetratpetid QEDL zeigte sich für QEDL ein deutlich höherer k_{cat}/K_M -Wert. Somit ist davon auszugehen, dass r- und m-isoQC längere Substrate ebenfalls besser umsetzen. Generell wurde deutlich, dass die pGlu-Bildung bei Substraten mit großen bzw. hydrophoben Resten an zweiter oder dritter Stelle nach dem Glutamin mit der höchsten katalytischen Effizienz erfolgte (z.B. QFA, QEYF oder die Peptidsurrogate). Dies konnte zuvor auch für die Säuger QCs beobachtet werden (Schilling *et al.*, 2003a; Schilling *et al.*, 2005).

Beim Vergleich der Substratspezifitäten der isoQCs wird zudem deutlich, dass die k_{cat}/K_M -Werte für m- und r-isoQC im Vergleich zur h-isoQC höher waren. Dies lag in den meisten Fällen (bei neun von zehn Substraten) an einer effizienteren Substratumsetzung (höhere k_{cat} -Werte). Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass dieser Unterschied auf eine unterschiedliche Reinheit der Proteine zurückzuführen ist. Eine detaillierte Aufstellung der K_M und k_{cat} Werte sind der Tabelle 7-2 im Anhang zu entnehmen.

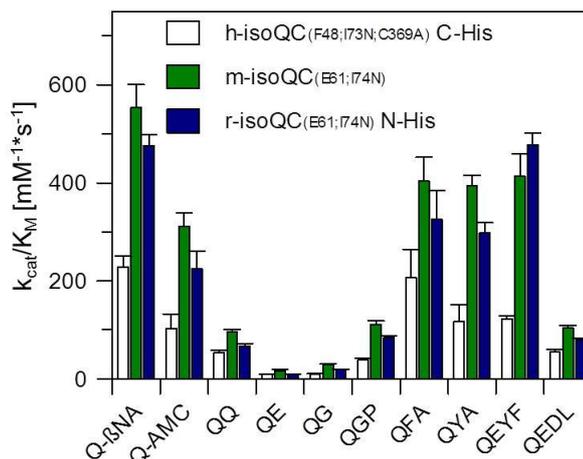


Abbildung 3-8: Vergleich der Spezifitätskonstanten (k_{cat}/K_M) des Umsatzes verschiedener Substrate durch isoQCs aus Mensch, Maus und Ratte.

Die Peptidsubstrate sind im Einbuchstabencode der Aminosäuren dargestellt. Die Untersuchungen wurden mittels kontinuierlicher Aktivitätstests bei 30°C durchgeführt (Kapitel 2.12.1 und 2.12.2). Die Fehlerbalken stellt die Standardabweichung der erhaltenen Ergebnisse aus drei unabhängigen Messungen dar.

Weiterführend erfolgte eine Untersuchung verschiedener kompetitiver Inhibitoren der isoQCs. Für die h-isoQC konnte bereits eine Hemmung der Aktivität durch Imidazol bzw. ungeladene Imidazolderivate detektiert werden. In Analogie zu diesen Untersuchungen wurden ebenfalls verschiedene Imidazolderivate (z.B. Benzimidazol, Benzylimidazol, Methylimidazol, PQ50) getestet (Tabelle 3-3).

Es zeigte sich, dass die isoQCs der Säuger am schwächsten von Imidazol und Benzimidazol gehemmt werden. Durch die Einführung eines Benzylrestes am Imidazol kam es zu einer ca. 40-fachen Steigerung der inhibitorischen Potenz. Ähnliches ließ sich ebenfalls für 1-Methylimidazol feststellen, wobei hier die Substitution mit einem Methylrest nur zu einer Steigerung der Potenz um den Faktor 3 im Vergleich zum Imidazol führte. Der QC-Inhibitor PQ50 hemmt die Aktivität der isoQCs am effizientesten. Der Vergleich der K_i -Werte, welche mit den verschiedenen isoQCs ermittelt wurden, lässt auf gleiche bzw. sehr ähnliche Mechanismen der Inhibitorbindung schließen.

Tabelle 3-3: Inhibitorkonstanten einiger Inhibitoren der humanen, Maus und Ratten isoQC.

Die Messungen wurden in 0,05M Tris-HCl, pH 8 bei 30°C mit Q-AMC als Substrat durchgeführt (Kapitel 2.12.3). ^a Daten publiziert in Stephan *et al.*, 2009; ^b K_i -Bestimmung wurde durch Mitarbeiter der Probiobdrug AG durchgeführt.

Inhibitor	h-isoQC _(F48;I73N;C368A) C-His	m-isoQC _(E61;I74)	r-isoQC _(E61;I74N) N-His
	K_i (μM) ^a	K_i (μM) ^a	K_i (μM)
Imidazol	235 ± 13	103 ± 35	159 ± 35
Benzimidazol	250 ± 5	124 ± 4	151 ± 15
Benzylimidazol	6,2 ± 0,2	3,9 ± 0,3	6,48 ± 0,8
Methylimidazol	82 ± 3	52 ± 5	58 ± 11
PQ50	0,80 ± 0,02	0,20 ± 0,01 ^b	0,29 ± 0,06

Die Ergebnisse weisen auf einen sehr ähnlichen Reaktionsmechanismus und Aufbau des aktiven Zentrums hin und lassen sich mit der hohen Sequenzidentität besonders im Bereich des katalytischen Zentrums begründen (siehe Abbildung 3-1).

3.2.4. Vergleich der pH-Abhängigkeit der katalysierten Reaktion von m-isoQC und mQC

Die Aktivität von Enzymen weist häufig eine Abhängigkeit vom pH-Wert der Reaktionslösung auf. Dem liegen zwei verschiedene Effekte zu Grunde: zum einen die Beteiligung von ionischen Gruppen am Katalysemechanismus und zum anderen die Möglichkeit der Stabilisierung der Proteinstruktur durch geladene Gruppen. Mit Hilfe vorangegangener Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit der Zyklisierungsreaktion von Glutamin katalysiert durch h-isoQC und h-QC wurde gezeigt, dass beide Enzyme ein pH-Optimum zwischen 7 und 8 besitzen. Zusätzlich ließ sich anhand dieser Bestimmung erkennen, dass das Optimum der Reaktion bei der h-isoQC leicht in den sauren pH-Bereich verschoben ist (Stephan, 2007). Innerhalb dieses Versuches sollte die Übertragbarkeit der gesammelten Daten auf die entsprechenden Maus-Enzyme überprüft werden.

Als Substrat wurde das Peptidsurrogat Q-AMC für die Untersuchung verwendet. Da die Michaelis-Menten-Konstante von beiden Enzymen für dieses Substrat bekannt war, konnten die Messungen unter Bedingungen quasi erster Ordnung ($[S] \ll K_M$) durchgeführt werden. Dadurch lassen sich aus den Aktivitäten bei den verschiedenen pH-Werten die k_{cat}/K_M -Werte berechnen und es ist ein direkter Rückschluss auf die pH-Abhängigkeit der Spezifitätskonstante möglich.

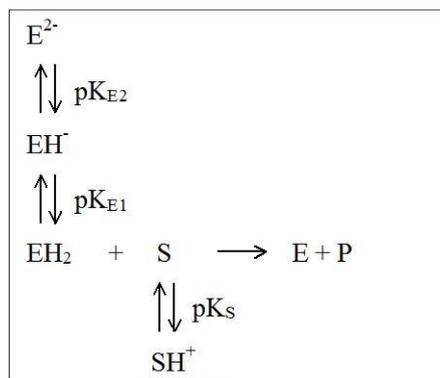


Abbildung 3-9: Modell der Protonierungszustände von m-isoQC und des Substrates als Grundlage für die Auswertung der beobachteten pH-Abhängigkeit der katalytischen Effizienz des Enzyms.

Für diese Untersuchung erfolgte die Inkubation des Enzyms im Puffer mit verschiedenen pH-Werten im Bereich zwischen pH 5 bis pH 9. Dabei wurde der Puffer für diese Bestimmung so gewählt, dass er in diesem Bereich eine konstante Ionenstärke aufwies. Es zeigte sich, dass beide Enzyme ein pH-Optimum der Katalyse zwischen 7,5 und 8 besitzen. Zusätzlich kam es bei pH-Werten über 8,2 zu einem

drastischen Verlust der enzymatischen Aktivität (Abbildung 3-10). Die Analyse der Umsatzgeschwindigkeiten erfolgte mittels eines Modellsystems, das zwei protonierbare Gruppen des Enzyms sowie die protonierbare α -Aminogruppe des Substrates berücksichtigt (Abbildung 3-9). Somit lag der Berechnung der pK_a Werte eine Modellgleichung zu Grunde, welche auf der Annahme von drei an der Katalyse beteiligter dissoziierender Gruppen beruht (Schilling et al., 2003b; Schilling et al., 2005). Anhand des Modellsystems ließen sich die erhaltenen k_{cat}/K_M -Werte für die einzelnen pH-Werte durch eine nicht symmetrische Glockenkurve beschreiben. Es konnten aus der Untersuchung drei verschiedene pK_a Werte bestimmt werden. Der erste pK_a Wert ist bei beiden Enzymen 6,76. Dieser ist der α -Aminogruppe des Q-AMC zuzuordnen, wie vorhergehende Untersuchungen bereits zeigen konnten (Schilling et al., 2005). Da dieser pK_a Wert im neutralen bis schwach saurem pH Bereich liegt, ist vermutlich auf einen unprotonierten Zustand der α -Aminogruppe des Substrates während der Reaktion zurückzuführen, da sonst der nukleophile Angriff der Aminogruppe auf das γ -Carbonyl des Glutamins nicht mehr stattfindet. Die beiden weiteren pK_a -Werte sind zwei dissoziierenden Gruppen im Enzym zuzuordnen und haben pK_a -Werte für die m-isoQC_(E61;I74N) von $9,5 \pm 0,3$ und $8,2 \pm 0,4$, sowie für die mQC $9,0 \pm 0,2$ und $8,3 \pm 0,3$. In dieser Bestimmung zeigte sich ein leichter Unterschied in einem pK_a -Wert zwischen m-isoQC und mQC. Dies könnte zum einen auf eine andere an der Katalyse beteiligte Aminosäure hindeuten, aber kann auch durch Messungenauigkeiten bedingt sein. Generell lässt sich sagen, dass beide Enzyme ein sehr ähnliches pH-Optimum haben und vermutlich sehr ähnliche Gruppen im Enzym an der Katalyse beteiligt sind.

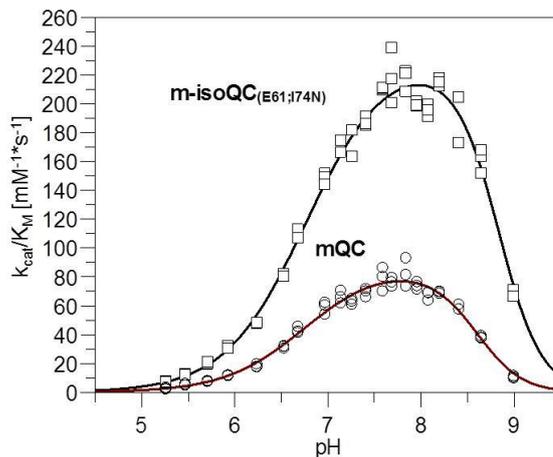


Abbildung 3-10: Abhängigkeit des katalytischen Parameters k_{cat}/K_M der Umsetzung von H-Gln-AMC durch mQC und m-isoQC_(E61,I74N) vom pH-Wert des Reaktionsansatzes unter Geschwindigkeitsbedingungen 2. Ordnung mit $[S] \ll K_M$.

Die Analyse der Geschwindigkeitskonstanten erfolgte unter Berücksichtigung von 3 protonierbaren Gruppen (eine vom Substrat und zwei vom Enzym) und ergab für die m-isoQC $pK_{a1} = 9,5 \pm 0,3$, $pK_{a2} = 8,2 \pm 0,4$ sowie für die mQC $pK_{a1} = 9,0 \pm 0,2$, $pK_{a2} = 8,3 \pm 0,3$ und für das Substrat einen pK_a Wert von 6,76. Die Bestimmung erfolgte in 200mM Tris, 100mM Mes und 100mM Acetat. Der Puffer wies eine konstante Ionenstärke nach der Einstellung der verschiedenen pH-Werte mit NaOH oder HCl auf (Ellis & Morrison, 1982).

3.3. Identifizierung der m-isoQC als Metalloenzym

Die tierischen QCs sowie die isoQCs besitzen eine strukturelle Verwandtschaft zu bakteriellen Aminopeptidasen, welche zwei Zink-Ionen im aktiven Zentrum gebunden haben (Booth *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2005a). Obwohl alle Zink-koordinierenden Aminosäuren im aktiven Zentrum in der QC konserviert sind, konnte gezeigt werden, dass von Säuger-QCs nur ein Zink-Ion gebunden wird. Dieses Zink-Ion ist essentiell für die katalytische Aktivität der Säuger QCs (Schilling *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2005b). Auf diesen Informationen aufbauend sollte ebenfalls für die isoQCs Metallgehalt und die Zinkabhängigkeit der Katalyse untersucht werden.

Zur Bestimmung des Metallgehaltes wurde, in Kooperation mit dem *Institut for analytical sciences (ISAS)* in Dortmund, eine Totalreflexions-Röntgen-Fluoreszenzspektroskopie (TXRF) durchgeführt. Der Elementnachweis anhand dieser Methode beruhte auf der Messung von Fluoreszenzstrahlung, welche nach Anregung kernnaher Elektronen mit Röntgenstrahlen emittiert wird. Die Energie der emittierten Röntgenfluoreszenz ist spezifisch für verschiedene Elemente. Anhand der Quantifizierung der Strahlung kann auf die Konzentration eines Elements zurückgeschlossen werden. Als Enzym wurde hierfür die m-isoQC_(E61,I74N) verwendet, da es ohne Affinitäts-tag exprimiert und gereinigt wurde und sich ein His-tag durch mögliche Bindung von Zink störend auf die Metallionenbestimmungen mittels TXRF ausgewirkt hätte.

Ein typisches TXRF-Spektrum ist in Abbildung 3-11 A dargestellt. Die Signale bei etwa 8,5 keV und 9,5 keV sind Zink zuzuordnen. Ein deutliches Signal bei ca. 2,6 keV wurde durch Chlor verursacht, welches im Puffer (Tris-HCl) enthalten war. Drei unabhängige Untersuchungen von isoQC ergaben einen Gehalt von $0,99 \pm 0,38$ mol Zink pro mol Enzym, was dem stöchiometrischen Verhältnis von Zink zu Enzym der QCs gleicht (Schilling *et al.*, 2005; Schilling *et al.*, 2007a).

Um dieses Ergebnis zu validieren, wurden zusätzlich Reaktivierungsuntersuchungen des m-isoQC Apoenzyms durchgeführt (Abbildung 3-11 B). Für die Herstellung des Apoenzyms wurde die m-isoQC gegen Puffer dialysiert, welcher 1,10-Phenanthrolin enthielt. Zur Entfernung des Chelators erfolgte eine weitere Dialyse, wobei der Dialysepuffer zuvor mit Chelex behandelt war, um Zink aus dem Puffer zu binden und die Reaktivierung des Enzyms zu verhindern. Die Herstellung des Holoenzym erfolgte mit verschiedenen zweiwertigen Metallionen wie Zink, Kobalt, Mangan und Nickel sowie als Kontrolle Kalzium. In diesem Versuch zeigte sich, dass eine vollständige Reaktivierung durch eine äquimolare Zugabe von Zink erreicht werden kann. Dies war mit keinem anderen der getesteten Metallionen zu detektieren.

Um zu untersuchen, ob die Zinkbindung einen Einfluss auf die Sekundärstruktur der m-isoQC ausübt, wurde Fern-UV CD-Spektroskopie angewendet (Abbildung 3-11 C). Hierzu erfolgte ein Vergleich der Spektren des Apoenzyms und des katalytisch aktiven Enzyms. Es zeigen sich in allen Messungen bei 208nm und 222nm die für Proteine mit hohem α -helikalen Anteil charakteristischen Minima. Aufgrund nahezu identischer Spektren kann geschlussfolgert werden, dass der Verlust des Metallions nicht zu einem Sekundärstrukturverlust führt und somit dem Zinkion eher eine katalytische als eine strukturstabilisierende Funktion zukommt.

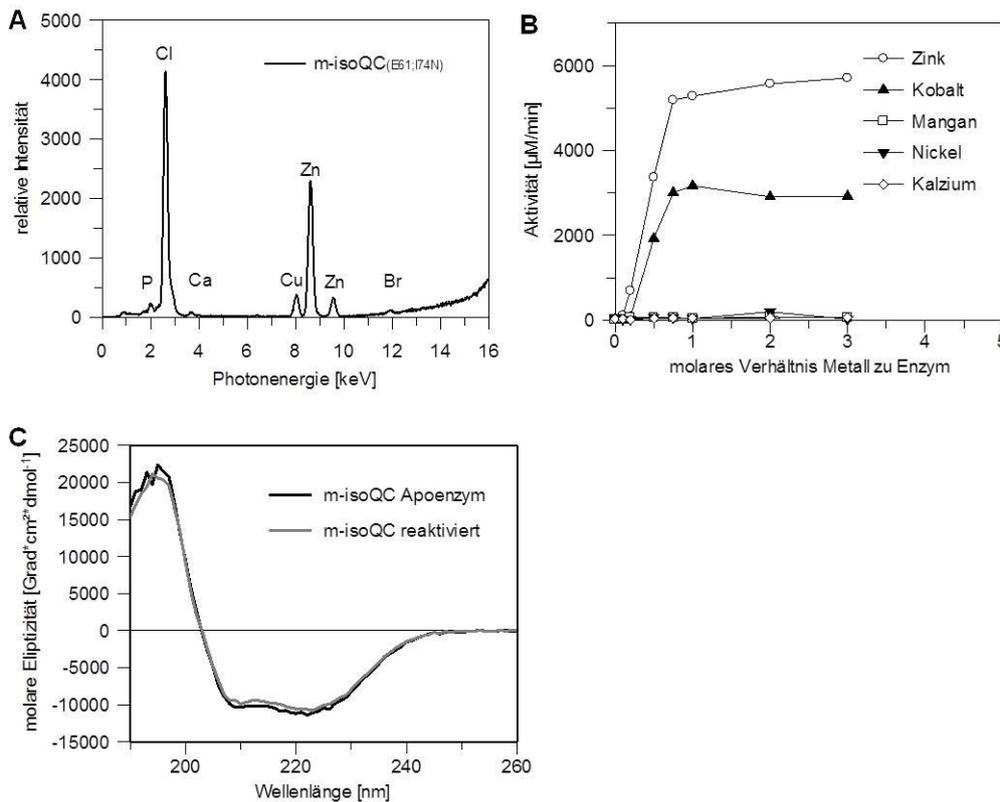


Abbildung 3-11: Untersuchung der Zinkbindung in der humanen isoQC.

(A) TXRF-Spektrum einer m-isoQC Präparation. Die Messung wurde in 10mM Tris/HCl, pH 7,6 durchgeführt. Die Bestimmung lässt auf ein äquimolares Verhältnis von Zink und Protein schließen.

(B) Reaktivierung des m-isoQC-Apoenzym mit verschiedenen zweiwertigen Metallionen. Die Messung der Reaktivierung erfolgte anhand des Aktivitätstestes mit Q- β NA als Substrat, nach 15minütiger Inkubation des Enzyms mit dem Metallion. Mit einem äquimolaren Verhältnis von Zink zu Enzym konnte eine vollständige Reaktivierung erzielt werden.

(C) Fern-UV-CD Spektrum der m-isoQC und des m-isoQC Apoenzym. Die Messungen wurden in 10mM NaH_2PO_4 pH 6,8 durchgeführt. Apo- und Holoenzym zeigen die gleichen charakteristischen Minima.

3.4. Kristallstruktur der humanen isoQC

Sowohl QC als auch isoQC stellen Zielenzyme der Wirkstoffentwicklung dar. Das Ziel ist die Unterdrückung der Zyklisierungsreaktion des Glutamins bzw. Glutamats durch die Verwendung von kompetitiven Inhibitoren. Vorangegangene Untersuchungen zeigten, dass QC und isoQC sehr effizient durch Imidazol und Imidazolderivate gehemmt werden (Schilling *et al.*, 2003b; Buchholz *et al.*, 2006). Für eine weitere Profilierung der Inhibitoren, z.B. zur Steigerung der inhibitorischen Aktivität bzw. zur Entwicklung spezifischer Inhibitoren, die nur eines der beiden Enzyme hemmen, sollte die h-isoQC mit einem Inhibitor Co-kristallisiert werden. Da der Inhibitor PQ50 die isoQC etwa zehnfach schlechter hemmt als die QC (Stephan, 2007), wurde dieser für die Co-Kristallisation verwendet, um mögliche Unterschiede im Bindungsmodus zu detektieren. Für diese Versuche erfolgte die Verwendung der h-isoQC Variante

isoQC_(E60;I73N;C369A) N-His, da sie in großen Mengen in *P. pastoris* produziert werden kann (siehe Kapitel 3.1.1).

3.4.1. Kristallisation der deglykosylierten humanen isoQC

Wie im vorangegangenen Abschnitt dargelegt, wurde zur Expression der isoQC in Hefe eine artifizielle Glykosylierungsstelle eingefügt. Dadurch und durch die Expression eines N-terminal verkürzten Proteins wurde die Ausbeute stark erhöht. Zudem war anzunehmen, dass sich die Verkürzung des N-Terminus auch günstig auf die Bildung von Kristallen auswirken könnte, da der flexible N-Terminus der Entstehung von Kristallisationskeimen entgegenwirkt. Initial wurde versucht, die h-isoQC in der glykosylierten Form zu kristallisieren. Die erhaltenen Kristalle zeigten jedoch keine Diffraktion. Es wurde vermutet, dass dies auf eine Störung der Ordnung im Kristall aufgrund inhomogener Glykosylierung zurückzuführen sein könnte (vgl. Abbildung 3-4). Deshalb wurde nachfolgend die isoQC in deglykosylierter Form zur Kristallisation eingesetzt. Die Deglykosylierung des Enzyms erfolgte durch die Inkubation mit EndoHf. Dem Ansatz wurde das nicht-ionische Detergenz MEGA-8 in einer Konzentration von 100mM zugesetzt, um ein Aggregieren des Proteins zu vermeiden.

Mit der deglykosylierten isoQC wurde anschließend, unter Zugabe von 1mM PQ50, ein Test verschiedener Puffer durchgeführt. Mittels dieser initialen Pufferselektion wurden Bedingungen erhalten, bei denen das Protein zur Kristallisation gebracht werden konnte. Diese Bedingungen wurden nachfolgend weiter optimiert, z.B durch Änderung des Polyethylenglykols (PEG) bzw. der PEG-Konzentrationen und durch Änderung des pH-Wertes und der Ammoniumsulfatkonzentration (siehe auch Kapitel 2.13.3). Die optimalen Kristallisationsbedingungen wurden als Puffergemisch bestehend aus 0,1M Natriumcitrat, 0,1M Ammoniumsulfat pH 6,5 und 13% (w/v) PEG 35000 identifiziert (Abbildung 3-12). Die Kristalle entstanden durch „*hanging drop*“ Dampfdiffusion und Inkubation bei 21°C. Nach ca. 10-15 Tagen wuchsen Kristalle in Stäbchenform.

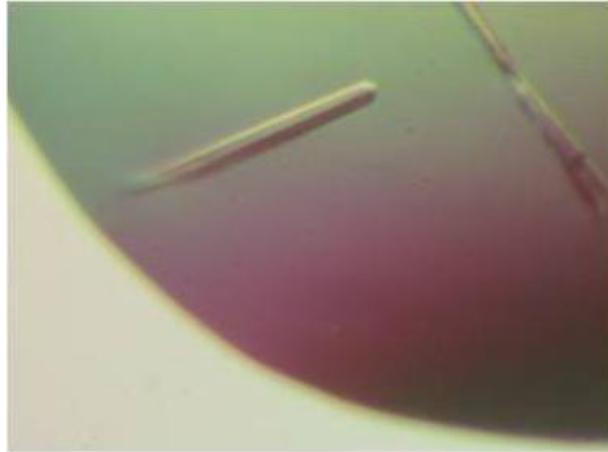


Abbildung 3-12: Foto von h-isoQC-Kristallen, erhalten aus einem Kristallisationsansatz von deglykosylierter h-isoQC in 0,1M NaCitrat, 0,1M Ammoniumsulfat pH 6,5 und 13% (w/v) PEG 35000. Die Kristalle entstanden mittels *hanging drop*-Dampfdiffusion in 24 *well*-Platten nach etwa 10 Tagen.

Die Auswertung des Beugungsmusters ließ auf eine Auflösung von max. 3,42Å schließen (siehe auch Tabelle 3-4). Es wurde nachfolgend versucht, die Auflösung durch Veränderung der Kristallisationsbedingungen zu verbessern. Allerdings konnte keine Bedingung gefunden werden, die Kristalle hervorbrachte, die zu einem Streumuster mit höherer Auflösung führten. Deswegen wurde aus Daten der Streuung des oben beschriebenen Kristalls die Struktur bestimmt.

3.4.2. Kristallstruktur der deglykosylierten h-isoQC

Die Aufnahme des Röntgenbeugungsmusters erfolgte am „beam lineBessx-MX BL 14.1“ des Synchrotron. Die anschließende Auswertung bzw. Modellanpassung wurde von D. Ruiz-Carrillo (MLU, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Abteilung physikalische Biotechnologie) vorgenommen. Die erhaltenen Daten aus der Messung sowie aus der anschließenden Verfeinerung sind in Tabelle 3-4 dargestellt.

Tabelle 3-4: Zusammenfassung der Datenerhebung aus der Messung eines h-isoQC Kristalls am Synchrotron (BESSY) sowie die dazugehörigen Statistiken der Datenbearbeitung und der Modellierung (Durchführung von D. Ruiz-Carillo).

Zur Datenbearbeitung wurden XDS und SCALA, für das *molecular replacement* PHASER, für die Verfeinerung REFMAC5 und für die Modellierung Coot verwendet.

Datenerfassung	
Daten erfasst am	BESSY
Raumgruppe	P1 21 1
Zelldimensionen	
<i>a, b, c</i> (Å)	126,51 109,68 159,53
α, β, γ (°)	90,0 104,9 90,0
Auflösung (Å)	34,72 – 3,42
<i>R</i> _{merge}	13,7 (46,3)
I/Signal	6,7 (1,9)
Vollständigkeit (%)	83,7 (86,2)
Redundanz	1,8 (1,7)
Verfeinerung	
Auflösung (Å)	3,42
Anzahl Reflektionen (<i>work/test</i>)	53920 / 2838
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	26,8 / 31,31
Anzahl Atome:	
Proteine	26523
Wasser	203
<i>B</i> -Faktor	42.37
R.m.s Abweichungen:	
Bindungslänge (Å)	0,011
Bindungswinkel (°)	1,748

Die aus der Elektronendichte ermittelte Struktur ist in Abbildung 3-13 dargestellt. Es sind innerhalb der asymmetrischen Einheit 11 h-isoQC-Moleküle zu finden, die nachfolgend mit Kette A bis K bezeichnet werden. Diese konnten aus der Elektronendichte der Aminosäuren 75-383 definiert werden. Trotz der Komplexität des Modells und der geringen Auflösung sind die Elektronendichten innerhalb des aktiven Zentrums gut definiert, was eine erste Interpretation zulässt. In diesen 11 Molekülen sind 11 Zink-Ionen im aktiven Zentrum sowie 9 PQ50-Moleküle gebunden.

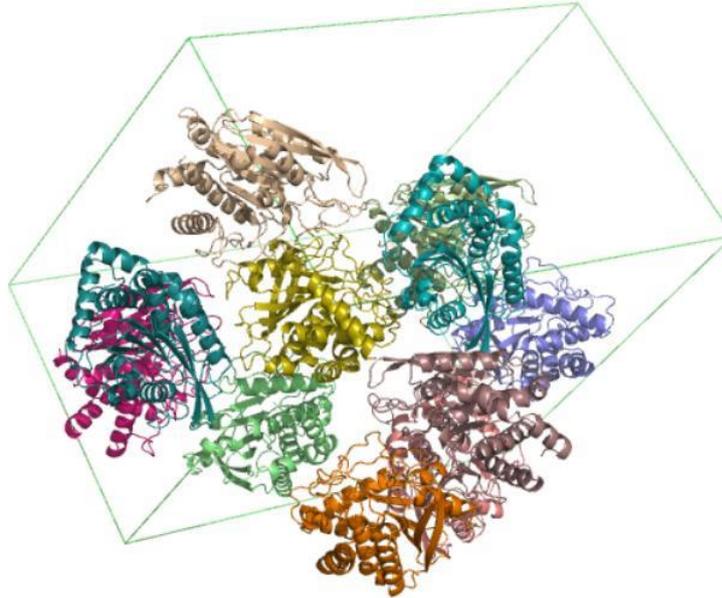


Abbildung 3-13: Anordnung der 11 Moleküle der h-isoQC innerhalb der asymmetrischen Einheit.
Im Hintergrund ist die Einheitszelle durch die grünen Achsen gekennzeichnet. (D. Ruiz-Carrillo)

Die h-isoQC besitzt die für QCs bekannte α/β Hydrolase-Struktur (Huang *et al.*, 2005a; Ruiz-Carrillo *et al.*, 2011). Dabei wird die zentrale β -Faltblattstruktur aus 6 parallelen β -Strängen gebildet. Diese β -Faltblattstruktur ist umgeben von 8 α -Helices, wobei 2 auf der einen Seite zu finden sind und 6 auf der gegenüberliegenden Seite. Komplettiert wird die Struktur durch *random coiled loops*, welche das aktive Zentrum ausbilden (Abbildung 3-14 A). Durch die Aminosäuren in diesen *loops* entsteht eine hydrophobe Tasche.

Innerhalb des aktiven Zentrums wird das Zink-Ion durch die drei Aminosäuren Asp186, Glu207 und His333 koordiniert (Abbildung 3-14 B). Dieses Zinkbindungsmotiv ist in allen isoQC- und QC-Spezies der Säuger konserviert. Außerdem bilden Cys167 und Cys191 eine, ebenfalls konservierte, Disulfidbrücke aus. Für die hQC konnte gezeigt werden, dass diese Disulfidbrücke für die Stabilität des Enzyms aber nicht für die Katalyse wichtig ist (Ruiz-Carrillo *et al.*, 2011).

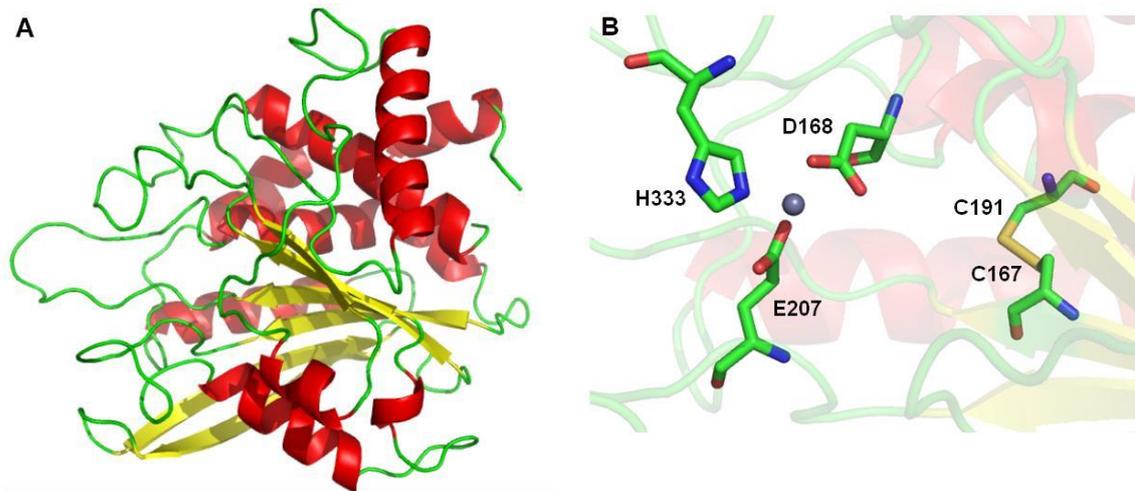


Abbildung 3-14: Schema der Struktur eines h-isoQC Moleküls (Kette C). (A) Die h-isoQC weist eine α/β -Hydrolase-Faltung auf.

In Gelb sind die β -Faltblätter, in Rot die α -Helices und in Grün die *random coiled loops* dargestellt. (B) Detaillierte Darstellung des aktiven Zentrums. Das katalytische Zink-Ion ist in Grau dargestellt, die Zinkkoordinierenden Aminosäuren (D168, E207 und H333) und die Cysteine (C167 und C191), die eine Disulfidbrücke bilden, sind als *sticks* hervorgehoben.

Beim Vergleich der Struktur aller Moleküle in der asymmetrischen Einheit wurde deutlich, dass sich die erhaltenen Strukturen der 11 Moleküle sehr ähnlich sind. Es werden jedoch geringe Abweichungen in der Anordnung zweier *loops* deutlich. Zusätzlich wird ebenfalls sichtbar, dass innerhalb mancher Moleküle einige β -Faltblätter und α -Helices nicht als solche definiert sind. Dies ist vermutlich auf die geringe Auflösung zurückzuführen (siehe Abbildung 3-15 A). Bei einer detaillierteren Betrachtung der Disulfidbrücke zeigt sich eine hohe Übereinstimmung der Lage der Cysteinreste in den Kristallen (siehe Abbildung 3-15 B). Im Unterschied dazu weist die Lage von PQ50 im aktiven Zentrum Unterschiede auf (Abbildung 3-15 C). Zwar ist bei den meisten Molekülen die Orientierung vergleichbar, jedoch nimmt der Phenylring des PQ50 in Kette I eine andere Orientierung im aktiven Zentrum ein. Dieser Unterschied ist bedingt durch die ungenügende Auflösung bzw. nicht vorhandene Elektronendichte (siehe Anhang Abbildung 7-4 C). Im Vergleich dazu ist PQ50 in Kette B und C gut aufgelöst (siehe Anhang Abbildung 7-4 A und B).

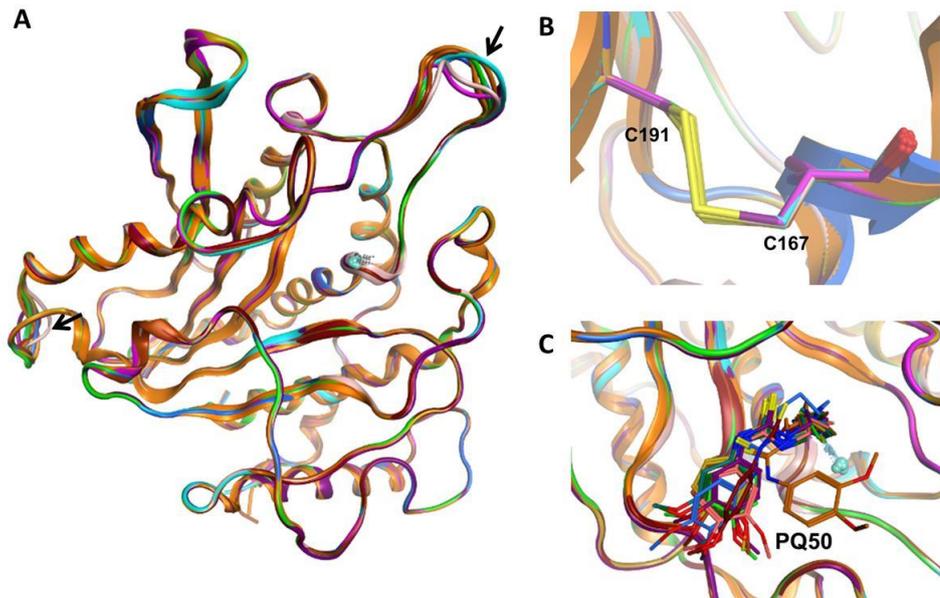


Abbildung 3-15: Vergleich der Struktur von der asymmetrischen Einheit enthaltenen h-isoQC Moleküle.

A) Übereinanderlagerung der Struktur aller h-isoQC Moleküle. Es konnte für alle Ketten eine α/β -Hydrolase-Faltung detektiert werden. Geringe Abweichungen sind in zwei *random coiled loops* zu erkennen (Pfeile). Zusätzlich zeigte sich innerhalb einiger Ketten eine fehlende Definition von α -Helices und β -Faltblättern, was vermutlich durch die ungenügende Auflösung bedingt ist.

B) Darstellung der Disulfidbrücke, welche von Cys167 und Cys191 ausgebildet wird. Diese konnte für alle Moleküle innerhalb der asymmetrischen Einheit festgestellt werden.

C) Übereinanderlagerung aller PQ50-Moleküle, die innerhalb der 11 h-isoQC-Moleküle zu finden waren. Die Anordnung des Inhibitors weicht in Kette I von denjenigen in den anderen Ketten ab. Dies wird durch die Orientierung des Phenylrestes verdeutlicht.

Durch die in einigen Molekülen gute Auflösung der Elektronendichte von PQ50 lassen sich erste Aussagen über potentiell interagierende Aminosäuren mit dem Inhibitor treffen. Der Ringstickstoff des Imidazolrestes interagiert mit dem Zink-Ion im aktiven Zentrum und besetzt somit die 4. Koordinationsstelle des Zink-Ions. Diese Interaktion konnte schon für die QC gezeigt werden (Schilling *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2005a; Ruiz-Carrillo *et al.*, 2011). Desweiteren scheint das Tryptophan 231 mit der Propylkette und das Glutamat mit der Thioharnstoffgruppe des PQ50 zu interagieren. Dies zeigte sich sowohl in Kette B und in Kette C (siehe Abbildung 3-16). Für eine detailliertere Untersuchung des Bindungsmodus des Inhibitors im aktiven Zentrum ist eine bessere Auflösung notwendig.

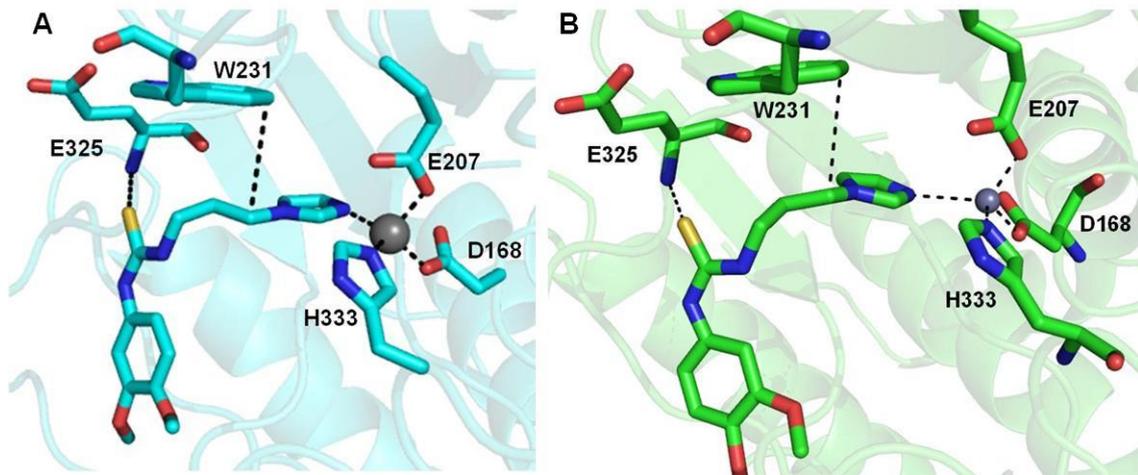


Abbildung 3-16: Detaillierte Darstellung der Lage von PQ50 im aktiven Zentrum sowie der potentiell interagierenden Aminosäuren (Darstellung als sticks).

A) Darstellung der Lage von PQ50 in Kette B. Das Zink-Ion (graue Kugel) im aktiven Zentrum der h-isoQC scheint mit dem Ringstickstoff, das Trp231 mit der Propylkette und das Glu325 mit dem Thioharnstoff zu interagieren.

B) Darstellung der Lage von PQ50 in Kette C. Innerhalb dieses h-isoQC-Moleküls sind vergleichbare potentiell interagierende Aminosäuren sowie die Interaktion des Zink-Ions (graue Kugel), wie zuvor in Kette B beschrieben, zu detektieren.

3.5. Untersuchung der Expression von QC und isoQC in verschiedenen Zelllinien und „knockout“ Mauslinien

Im Rahmen der Entwicklung von Inhibitoren von QC/isoQC wurden verschiedene Tiermodelle etabliert. Dabei erfolgte auch die Generierung von QC und isoQC *knockout* Mäusen zur Untersuchung des Einflusses der Enzymdepletion auf den Organismus. Ziel der vorliegenden Analysen war, den Verlust von QC und isoQC auf Proteinebene nachzuweisen und eine mögliche kompensatorische Regulation der Enzyme zu untersuchen.

Des Weiteren war es für vergleichende Studien von QC und isoQC (z.B. histologische Untersuchungen, Expressionsanalysen, Gewebeverteilung oder Untersuchungen zur Lokalisation) notwendig spezifische Antikörper zu generieren, die zwischen den beiden Enzymen unterscheiden. Diese Unterscheidung war mit Hilfe des QC-Aktivitätstestes nicht möglich, was die Bedeutung von spezifischen Antikörpern deutlicher unterstreicht. Für die Antikörpergenerierung wurden Kaninchen bzw. Ziegen mit Peptiden immunisiert, welche aus der humanen isoQC abgeleitet wurden. Zudem wurden auch Immunisierungen mit den rekombinanten Proteinen vorgenommen. Die Immunisierungen wurde durch die Firma Biogenes vorgenommen. Anschließend erfolgte die Reinigung und Charakterisierung der Antikörper Spezifität und Sensitivität mittels Western Blot.

3.5.1. Generierung und Charakterisierung spezifischer QC/isoQC-Antikörper

Für die ersten Antikörper wurden Peptide der h- und m-isoQC verwendet, die dem N-Terminus (zytoplasmatische Sequenzen) entsprechen (h-isoQC Antikörper 5406 und m-isoQC Antikörper 5407). Bei diesen Peptiden handelte es sich um Sequenzbereiche die innerhalb der QC nicht vorkommen, da die QC am N-Terminus eine Signalsequenz für den Transport in den sekretorischen Weg besitzt, welche im Verlauf der Translation abgespalten wird (Vergleich mQC und m-isoQC siehe Abbildung 3-17).

```

m-isoQC  MSPGSRGPRQRLEDRGLMKPESLSKRRLPRVQFLPFLLLLALAMGLAFYIVWNSWHPGV
mQC      -----MAGSEDKLVVGTLHLLLLQATVLSLTAGNLSL
          :   : * : * * : * : . : . : . :

m-isoQC  EEMSRSDLRVPLIGSLSEAKLRLVVGQLDPQLRWGTFLEPLLIIVRPPGSSGNLQVRKFL
mQC      VSAAWTQEKNNHQPAPHLNSSLQQVAEGTSESEMWNQDLREPLLIERYPGSPGYSARQHI
          . : . : . : . * . . . : * . . . : * . * * * * * * * * * * * * . . : . :

m-isoQC  EATLQSLSAGWHVELDPFTASTPLGPLDFGNVVATLDPGAARHLTLACHYDSKFFPPGLP
mQC      MQRIQRLQAEWVVEVDTFLSRTPYGYRSFSNIISTLNPEAKRHLVLAACHYDSKYFPRWDS
          : * * . * * * * * : * * * * * . * . : . : * * * * * * * * * * * * * * .

m-isoQC  -PFVGGATDSAVPCALLELVQALDAMLSRIKQQAAP---VTLQLFLFDGEEALKEWGPKD
mQC      RVFVGGATDSAVPCAMMLELARALDKKLHSLKDVSGSKPDLRLRIFFDGEEAFHHWSPQD
          * * * * * * * * * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

m-isoQC  SLYGSRHLAQIMESIPHSPGF---TRIQAIELFVLLDLIGASSPIFFSHFPRTARWFQRL
mQC      TLYGSRHLAQKMASSPHPPGSRGTNQLDGMDDLVLVLLDLIGAANPTFPNFFPKTRWFNRL
          : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

m-isoQC  RSIEKRLHRLNLLQSHPCQEVMYFQPGEEFPGFVEDDHIPFLRKGVPVLHLLIATEFFPAVWHT
mQC      QAIEKELYELGLLKDHSLEKRFYQNFQYGNLIQDDHIPFLRKGVPVLHLLIASESPEVWHT
          : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

m-isoQC  PADTEANLHPPTVHNL SRLAVFLAEYLGL-
mQC      MDDNEENLHASTIDNLNKIIQVVFVLEYLHL-
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Abbildung 3-17: Aminosäuresequenzvergleich von mQC und m-isoQC.

In Grün ist das Peptid markiert, was zur Herstellung des N-terminalen m-isoQC Antikörpers 5407 verwendet wurde. In Rot ist der Sequenzbereich von isoQC und QC markiert, der als Peptid zur Herstellung des m-isoQC Antikörpers 6004 verwendet wurde.

Mit Hilfe des m-isoQC Antikörpers 5407 konnte die m-isoQC nach Expression in humanen HEK293 Zellen detektiert werden, ohne dass eine Kreuzreaktivität mit anderen Proteinen erkennbar war (Abbildung 3-18 A). Die basale Expression von m-isoQC in der Mauszelllinie N2a ließ sich jedoch nicht nachweisen. Des Weiteren zeigte der Antikörper keine Kreuzreaktivität mit der h-isoQC. Neben den Antikörpern, die gegen den N-Terminus von isoQC gerichtet waren, sollte ein weiteres Antiserum generiert werden, welches den Sequenzbereich von Aminosäure 309-325 der m-isoQC erkennt (m-isoQC Antikörper 6004). Dieser Bereich war ebenfalls nicht in der mQC Sequenz konserviert. (Vergleich Sequenzbereich mQC und m-isoQC in Abbildung 3-17). Die Spezifität und Sensitivität wurde mittels humaner HEK293 und Maus-N2a-Zellextrakten, die entweder h-isoQC, m-isoQC oder mQC exprimierten, mittels *Western Blot* getestet. Allerdings war die Sensitivität im Vergleich zu dem m-isoQC Antikörper

5407 geringer bzw. die Kreuzreaktivität des Antikörpers höher (siehe Abbildung 7-2). Das liegt möglicherweise in der Verwendung eines kürzeren Peptides für die Immunisierung begründet (Vergleich siehe Abbildung 3-17) bzw. eventuell an der schlechteren Zugänglichkeit innerhalb des Proteins im C-terminalen Bereich.

Für die Etablierung eines neuen QC Antikörpers wurde eine andere Strategie angewendet. Initial wurde versucht, einen C-terminalen Peptidantikörper herzustellen der in Analogie zum Antikörper m-isoQC AK 6004 in der mQC im Aminosäurebereich 289-305 bindet (Abbildung 3-17, rote Markierung). Allerdings war die Sensitivität des erhaltenen Antikörpers sehr gering, sodass dieser für weiterfolgende Analysen nicht in Frage kam (Anhang Abbildung 7-3). Die QC ist ein Protein, das von den Zellen sezerniert wird (Bockers *et al.*, 1995). Daher wurde zur Immunisierung die Wildtyp mQC verwendet, welche in Hefe exprimiert und anschließend gereinigt worden war (Schilling *et al.*, 2005). Der resultierende Antikörper mQC AK 10269 detektiert spezifisch QC aber nicht die isoQC (Abbildung 3-18 B).

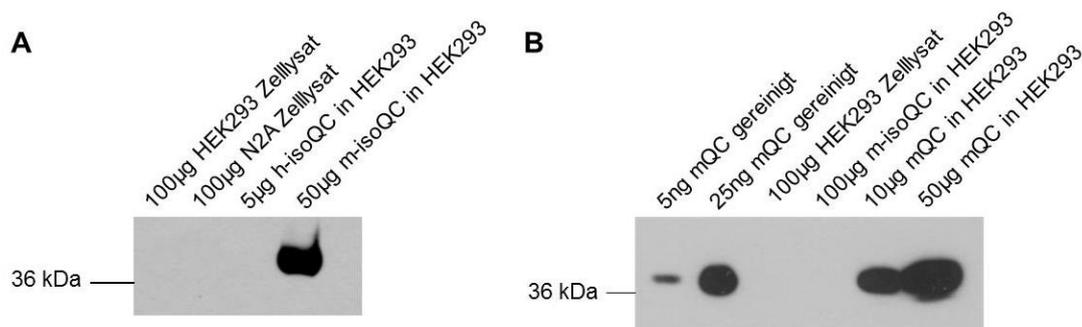


Abbildung 3-18: Darstellung der Untersuchung von Spezifität und Sensitivität der Antikörper 5407 und 10269, welche gegen isoQC bzw. QC gerichtet sind.

(A) Untersuchung des m-isoQC Antikörpers 5407 mittels Western Blot-Analyse von HEK293 und N2a Zelllysaten unter Verwendung von untransfizierten Zellen sowie nach Transfektion mit h-isoQC oder m-isoQC. Eine Kreuzreaktivität zu QC ist nicht zu erwarten, da der zur Immunisierung verwendete Peptidbereich nicht in der QC zu finden ist (Verdünnung des Antikörpers: 1:10.000).

(B) Untersuchung der Sensitivität und Spezifität des Antikörpers 10269 mittels *Western Blot* von gereinigter mQC sowie m-isoQC und mQC, die in HEK293 Zellen überexprimiert wurden. Der Antikörper wurde 1:5000 verdünnt. Die Methode ist auf Seite 30 beschrieben.

3.5.2. Analyse der Expression von QC und isoQC in verschiedenen Zelllinien

Die isolierten QC- und isoQC-spezifischen Antikörper wurden zur Charakterisierung der Expression der Isoenzyme in verschiedenen Zelllinien verwendet, um Rückschlüsse auf die Verteilung der Isoenzyme in verschiedenen Zelltypen zu ziehen. Die Analyse war auch von der Bestimmung der isoQC-Aktivität im Zelllysate und der QC-Aktivität im konditionierten Medium begleitet. Zur Untersuchung standen Zelllinien peripheren Ursprungs wie Lunge (human: A549; murin: LEWIS), Niere (human: HEK293), Pankreas (human: PaTuS), Epithelzellen (human: HUVEC) oder Fibroblasten-ähnliche Zellen aus dem Fettgewebe (murin: L929) und verschiedene neuronale Zellen, wie Gliazellen (human: U343), Astrozyten (human: LN405, murin: primäre Astrozyten) und

Neuronen (human: SY5Y, murin: N2a), sowie die Monozyten (human: THP-1) und Makrophagen (murin: RAW264.7) zur Verfügung. Durch die Wahl von ähnlichen murinen und humanen Zelllinien lassen sich auch mögliche Unterschiede zwischen den Spezies feststellen.

Durch die Unterschiede in der Lokalisation zwischen QC (sekretiertes Protein) und isoQC (im Golgi lokalisiert) war die im Zelllysate detektierte Aktivität der isoQC und im Medium der QC zu zuordnen (Schilling *et al.*, 2011). Für eine Korrelation zwischen Aktivität und Proteinmenge wurde mit ausgewählten Proben eine *Western Blot*-Analyse durchgeführt (Abbildung 3-19 A). Dabei detektierte man die isoQC mit dem spezifischen m-isoQC Antikörper 5407 und die QC mit dem Antikörper 10269 (siehe 3.5.1). Es wurde deutlich, dass die isoQC ausschließlich in den Zelllysaten vorhanden ist. Dementsprechend ist die bestimmte Aktivität in den Zellen der isoQC zuzuordnen und nicht durch die sekretierte QC bedingt. IsoQC wurde in allen Zelllinien bis auf Zellen des LEWIS-Karzinoms nachgewiesen. Im Gegensatz dazu ist die mQC nur in dieser Zelllinie zu detektieren. Offenbar ist die isoQC hinsichtlich der Expression weiter verbreitet und QC wird von spezifischen Zelllinien exprimiert. Die Beobachtung, dass Zellen mit starker QC-Expression eine schwache Expression von isoQC aufweisen könnte auf eine gegenseitige Regulation der Isoenzyme hindeuten. Dieser Aspekt sollte auch in *knockout* Mäusen untersucht werden (siehe folgendes Kapitel). Zur isoQC/QC Aktivitätsbestimmung wurden die Zelllinien für 24h in serumfreiem Medium kultiviert (Durchführung siehe 2.9.1). Dies war notwendig, da sich im Kälberserum QC befindet und diese bei der Analyse detektiert werden würde. Das Ergebnis der Aktivitätsuntersuchung ist in Abbildung 3-19 B dargestellt. Die höchste spezifische QC-Aktivität ist im Medium der Pankreaskarzinomzelllinie PaTu S zu finden. Ein Unterschied zwischen humanen und Mauszelllinien war für die Monozyten (THP-1) und Makrophagen (RAW267.4) und im Vergleich zu beiden Astrozytenzelllinien zu beobachten. So haben THP Zellen eine der höchsten detektierbaren QC-Aktivität, aber im Medium der RAW264.7 ist kaum QC-Aktivität zu finden.

In der spezifischen isoQC-Aktivität gab es keine deutlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelllinien. Dies korreliert mit der Bestimmung der mRNA Menge der isoQC in verschiedenen Mausorganen (Cynis *et al.*, 2008a), sowie der Proteinmenge mittels *Western Blot* (siehe 3.5.1). Es ließen sich auch keine deutlichen Unterschiede zwischen der menschlichen isoQC und der isoQC aus Maus feststellen. Durch die ubiquitäre Verteilung der isoQC und der Funktion in der Proteinreifung lässt sich vermuten, dass der isoQC in beiden Spezies eine Funktion als ein *house keeping*-Enzym zukommt.

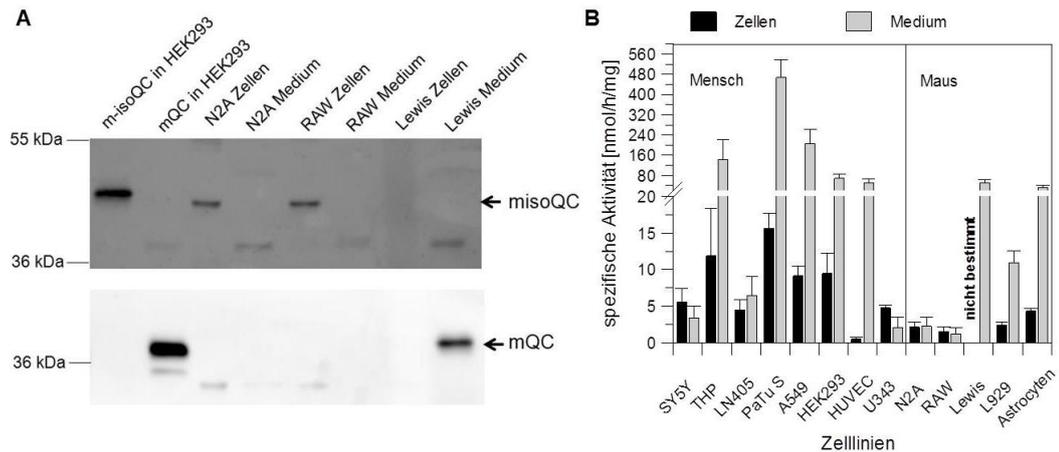


Abbildung 3-19: Analyse der QC/isoQC-Expression in verschiedenen Zelllinien.

(A) Western Blot Analyse ausgewählter Mauszelllinien nach QC/isoQC Aktivitätsbestimmung. Es wurden jeweils 35µg Gesamtprotein von Zelllysate und Kulturmedium auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen. Die Detektion der isoQC erfolgte mit Antikörper 5407 in 1:500 Verdünnung und der QC Expression mittels spezifischem QC Antikörper 10269 in 1:5000 Verdünnung. 2µg Gesamtprotein von HEK293 Zelllysate nach m-isoQC und mQC Expression dienten als Kontrolle für die Antikörperspezifität.

(B) Bestimmung der spezifischen Aktivität (in nmol/h/mg) in Zelllysaten und Zellkulturmedium verschiedener humaner und muriner Zelllinien durch Messung der Umsetzung Glu-βNA in pGlu-βNA. Die Untersuchungen wurden in 25mM MOPS, pH 7,0 mit 0,1mM N-Ethylmaleinimide bei 30°C durchgeführt. Die Detektion des entstandenen Produktes erfolgte mit HPLC (siehe Kapitel 2.12.5).

3.5.3. Detektion der QC/isoQC in verschiedenen Mausorganen

Für eine Untersuchung des QC und isoQC *knockouts* auf Proteinebene wurden, mit Hilfe des anti-m-isoQC AK 5407 und des anti-mQC AK 10269, verschiedene Mausorgane auf die Bildung von m-isoQC und mQC untersucht. Zudem konnten durch diese Untersuchung die Spezifität und Sensitivität der eingesetzten Antikörper weiter evaluiert werden. Für die Untersuchungen wurden Organe von Wildtyp- (wt) und *knockout*- (ko)-Mäusen verwendet (Abbildung 3-20).

Im Fall der m-isoQC wurden sowohl periphere Organe als auch verschiedene Gehirnareale auf die Bildung von m-isoQC untersucht (Abbildung 3-20 A). Die m-isoQC wurde innerhalb der verschiedenen getesteten Wildtyp (wt) Organe detektiert. Ein Vergleich der verschiedenen Organe zeigte sehr ähnliche Signalintensitäten. Das lässt auf eine ähnlich starke Expression der m-isoQC in den Organen schließen. In den Organen von isoQC-ko-Mäusen war das Protein nicht mehr zu detektieren. Anhand der Untersuchungen konnte somit der konstitutive *knockout* der isoQC nachgewiesen werden. Die Spezifität des Antikörpers eröffnet die Möglichkeit, diesen Antikörper auch für histologische Untersuchungen einzusetzen. In Analogie zu den Untersuchungen mit anti-m-isoQC AK 5407, wurden diese Analysen ebenfalls mit anti-mQC AK 10269 durchgeführt. Dafür wurden verschiedene Gehirnareale von wt mit QC-ko Mäusen verglichen (Abbildung 3-20 B). Dies erfolgte deshalb, weil die Expression der QC in peripheren Organen (wie z.B. Leber, Milz und Lunge) sehr gering ist (Pohl *et al.*, 1991; Cynis *et al.*, 2008a). In den Gehirnarealen der QC-ko-Mäuse lässt sich kein Signal der QC erkennen. Das verdeutlichte die Spezifität des Antikörpers. Zusätzlich wurden

mittels *Western Blot-Analyse* Unterschiede in der QC-Menge zwischen den getesteten Gehirnarealen detektiert. So war im Thalamus das stärkste Signal und im Vergleich dazu ein geringeres Signal im Cortex und Cerebellum zu beobachten. Dieses Ergebnis stimmte mit Daten aus Aktivitätsmessungen und Bestimmungen der RNA-Mengen in diesen Organen überein (Schilling *et al.*, 2011). Zusammenfassend kann man sagen, dass der QC-Antikörper sensitiv genug war, um die QC in den verschiedenen Gehirnarealen zu detektieren und durch die geringen Kreuzreaktivitäten in histologischen Analysen eingesetzt werden könnte.

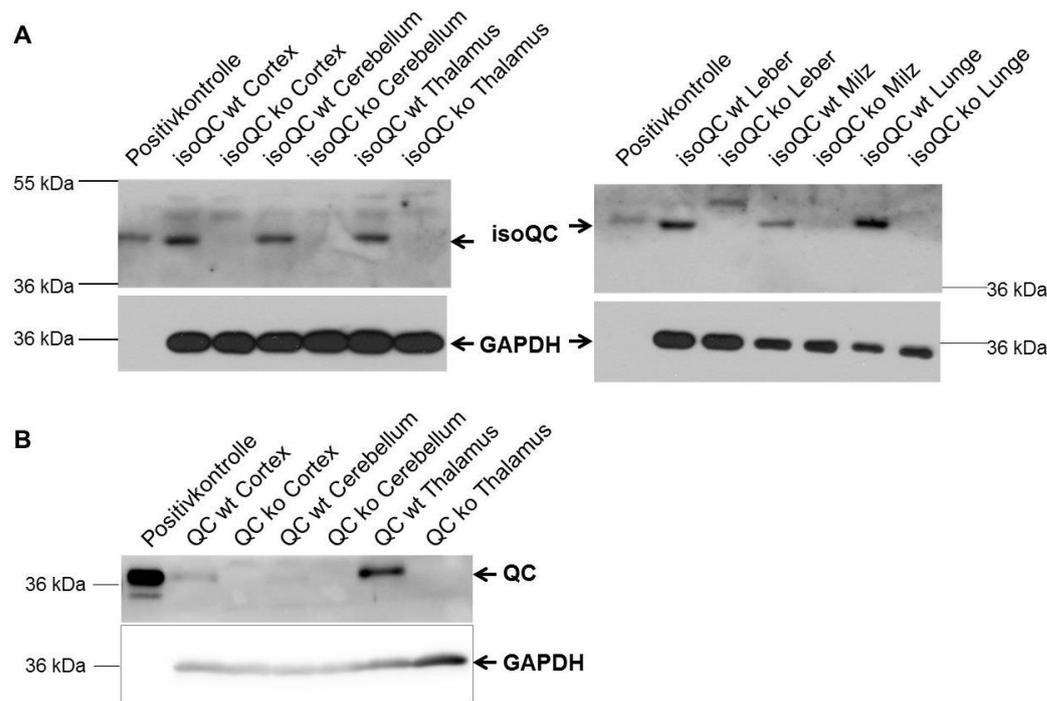


Abbildung 3-20: Untersuchung der mQC und m-isoQC Expression in verschiedenen Mausorganen. Die Auftrennung der Proben erfolgte in 12%igen SDS-Gelen und als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet.

(A) Zur Analyse der Gehirnareale wurden 15µg (Gehirn) bzw. 10µg (periphere Organe) verwendet. Die Detektion von isoQC erfolgte mit dem Antikörper 5407 bei einer Verdünnung von 1:500. Als Positivkontrolle wurden 200ng Gesamtprotein von HEK293 Zellen nach Überexpression von m-isoQC verwendet.

(B) Detektion der mQC in verschiedenen Gehirnarealen von wt und QC-ko-Mäusen. Zur Analyse wurden 50µg Gesamtprotein nach Aufschluss in 2% SDS auf ein SDS-Gel aufgetragen. Als Positivkontrolle wurde 1µg Gesamtprotein von HEK293-Zellysats nach Überexpression von mQC verwendet.

3.5.4. Analyse des Einflusses der *knockouts* auf die Proteinexpression des entsprechenden Isoenzym

Um zu analysieren, ob eine Depletion der QC bzw. isoQC zu einer Veränderung der Expression des entsprechend anderen Enzyms führt, wurden QC und isoQC in Homogenaten verschiedener Gewebe mit Hilfe der etablierten Antikörper untersucht.

Der Einfluss des QC-*knockouts* auf die isoQC-Bildung wurde sowohl in den Gehirnarealen als auch in den peripheren Organen untersucht (Abbildung 3-21 A und C). Innerhalb der untersuchten Gehirnareale werden eine Vielzahl der potentiellen QC-

Substrate exprimiert (Awade *et al.*, 1994; Bockers *et al.*, 1995), weshalb ein *knockout* der QC hier am wahrscheinlichsten zu einer Regulation der isoQC führen könnte. Für eine genauere Aussage wurden daher die relativen isoQC-Mengen in den Gehirnanlagen von drei unabhängigen Proben bestimmt (Abbildung 3-21 B). Es waren zwar bei den männlichen Tieren im Cortex und Thalamus leicht erhöhte isoQC-Mengen nach QC-ko zu detektieren, die Unterschiede waren aber nicht signifikant und könnten auch auf die Anwendung der Methode zurückzuführen sein. Zudem wurde der Unterschied in weiblichen QC-ko Tieren nicht beobachtet, was nicht auf einen generellen Mechanismus in den Mäusen schließen ließ. Parallel durchgeführte Untersuchungen der mRNA-Menge von isoQC wiesen auch auf keine Unterschiede zwischen wt- und QC-ko-Tieren in der Expression hin (Becker *et al.*, 2015).

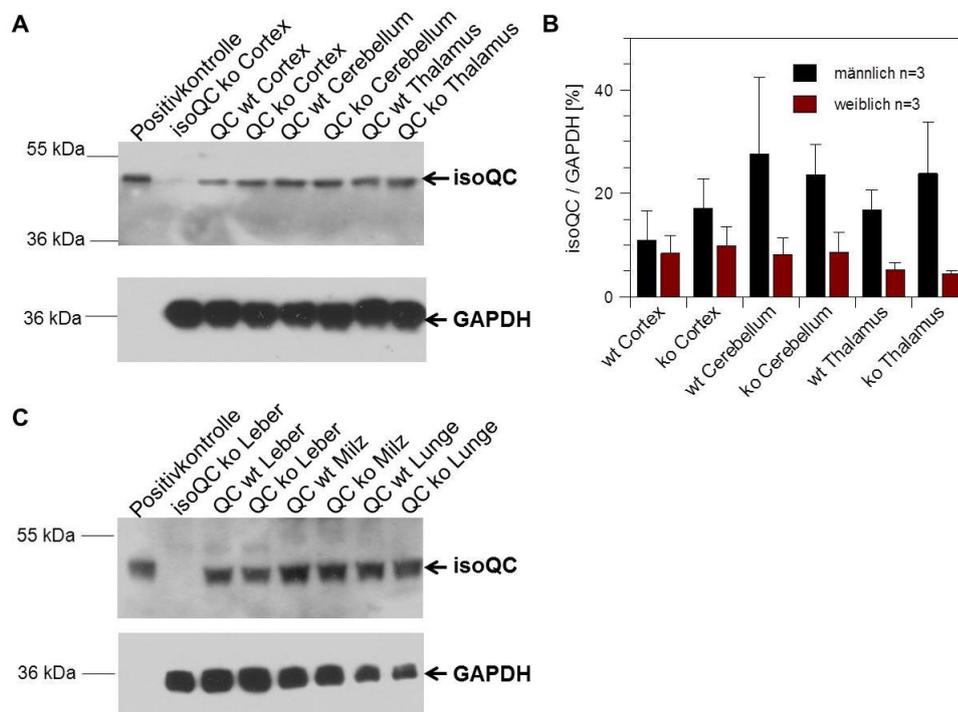


Abbildung 3-21: Untersuchung der Expression von isoQC in QC-ko-Mäusen mittels Western-Blot-Analyse.

Die isoQC wurde mittels des Antikörpers 5407 in einer Verdünnung von 1:500 detektiert. Die Organe wurden in 2% SDS aufgeschlossen und die Auftrennung erfolgte in 12%igen SDS-Gelen. Als Kontrolle dienten 200ng Protein aus HEK293 Zellen nach Überexpression von m-isoQC. Die Untersuchung der GAPDH diente als Kontrolle und Bezugssignal für die Quantifizierung.

(A) Analyse der Gehirnhomogenate nach Auftragung von 15µg Gesamtprotein.

(B) Quantifizierung der Signale der *Western Blot*-Untersuchung aus A (Verhältnis aus GAPDH-Signal zu isoQC Signale). Die Quantifizierung der Proteinbanden erfolgte mittels FUSION FX7 und die Auswertung der Signalintensitäten mit dem Programm BioDoc1D. Die Standardabweichung ergab sich aus der Untersuchung von Organen aus drei Tieren.

(C) Analyse von isoQC in ausgewählten peripheren Organen nach Auftragung von 10µg Gesamtprotein.

Neben den Untersuchungen der isoQC-Menge in QC-ko-Mäusen wurden auch die isoQC-ko-Mäuse auf eine Regulation der QC untersucht. Dabei war im *Western Blot* der Gehirnanlagen (Abbildung 3-22 A) kein Unterschied der QC-Expression zu

detektieren. Dies wurde ebenfalls durch die Quantifizierung mit GAPDH als Ladekontrolle bestätigt (Abbildung 3-22 B).

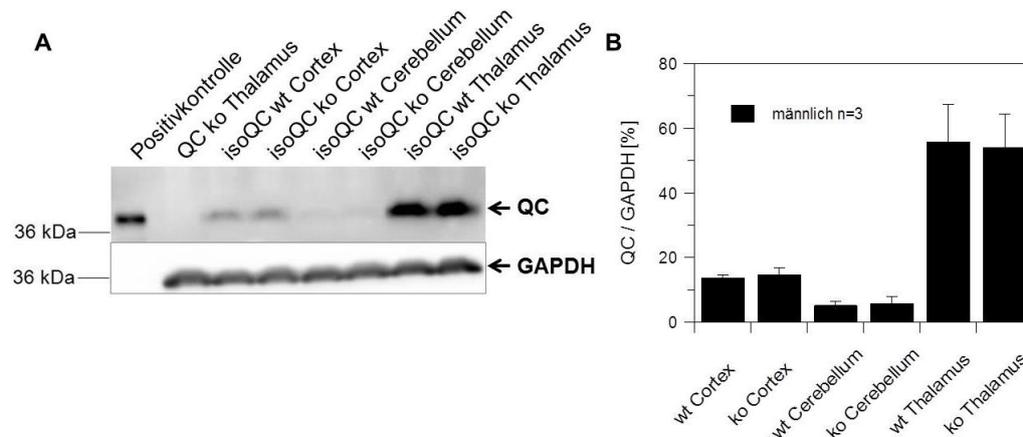


Abbildung 3-22: Charakterisierung der Expression von QC im Hirn von isoQC-ko-Mäusen.

Die Untersuchung erfolgte mittels des QC-spezifischen Antikörpers 10269 (Verdünnung 1:5000). Die Organe wurden in 2% SDS aufgeschlossen und die Auftrennung erfolgte in 12%igen SDS-Gelen. Als Kontrolle diente 1 µg Protein aus HEK293 Zellen nach Überexpression von mQC.

(A) Analyse der Homogenate verschiedener Gehirnaareale nach Auftragung von 50 µg Gesamtprotein.

(B) Quantifizierung der Signale aus der *Western Blot*-Untersuchung (Verhältnis aus GAPDH-Signal zu QC Signal). Die Detektion erfolgte mittels FUSION FX7 und die Auswertung der Signalintensitäten mit dem Programm BioDoc1D. Die Standardabweichung ergab sich aus den Bestimmungen der Proteinmengen von 3 Tieren.

Es wurde somit nachgewiesen, dass der Verlust eines der beiden QC-Isoenzyme der Maus nicht zu einer signifikanten Veränderung der Bildung bzw. des Abbaus des jeweils anderen Isoenzyms führte.

3.6. Untersuchung der subzellulären Lokalisation von isoQC

3.6.1. Analyse der subzellulären Lokalisation der isoQC aus Maus und Ratte

Die QCs der Säuger werden nach der Expression im sekretorischen Weg von der Zelle zusammen mit den pGlu-Produkten sezerniert (Bocker *et al.*, 1995). Durch Untersuchungen zur Lokalisation von isoQC konnte gezeigt werden, dass diese im Golgi zurückgehalten wird. Der N-terminale Bereich spielt dabei offenbar eine entscheidende Rolle (Cynis *et al.*, 2008a). Durch die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation und die nur geringen detektierbaren Unterschiede in den strukturellen und enzymatischen Untersuchungen, liegt die Vermutung nahe, dass die unterschiedliche Substratspezifität durch die unterschiedliche Lokalisation bedingt ist (Cynis *et al.*, 2008; 2011; Schilling *et al.*, 2011). Deshalb sollte ebenfalls die subzelluläre Lokalisation der m- und r-isoQC untersucht werden. In der Sequenz beider Enzyme sind die Transmembransequenz sowie zwei potentielle Startmethionine konserviert, dabei ist nicht geklärt, welches der beiden den N-Terminus bildet. Zur Untersuchung des Einflusses des N-Terminus und der Startmethionine auf die Lokalisation im Golgi

wurden verschiedene Varianten der m- und r-isoQC, welche am C-Terminus mit EGFP-tag („*enhanced green fluorescence protein*“) versehen waren (Abbildung 3-23 A), in LN405 Zellen exprimiert.

Die Analyse der subzellulären Lokalisation der verschiedenen m-isoQC Konstrukte wurde mittels konfokaler *Laser-Scanning*-Mikroskopie durchgeführt (Abbildung 3-23 B). Die transiente Expression von m-isoQC (MetI) EGFP (vgl. Abbildung 3-23 A) ergab eine deutliche distinkte grüne Fluoreszenz in der Nähe des blaufluoreszierenden Zellkerns. Durch Co-Färbung von Mannosidase II (rote Fluoreszenz), eine Glykosyltransferase des Golgi-Apparates, und Überlagerung der verschiedenen Fluoreszenzen (Abbildung 3-23 B, merge) konnte eine Lokalisation von m-isoQC im Golgi-Apparat nachgewiesen werden. Das gleiche Fluoreszenzmuster resultierte nach Expression von m-isoQC, welche mit dem zweiten potentiellen Startmethionin beginnt (m-isoQC (MetII) EGFP). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass das Startmethionin bzw. die ersten 19 Aminosäuren keinen Einfluss auf die Lokalisation der m-isoQC in der Zelle besitzen. Dies konnte zuvor bereits für die h-isoQC gezeigt werden (Cynis *et al.*, 2008a). Auch das Fluoreszenzmuster nach Expression von r-isoQC-EGFP entsprach dem der m- bzw. h-isoQC (Abbildung 7-5, Anhang).

Weiterführend sollte untersucht werden, ob die Retention der m-isoQC und r-isoQC durch den N-Terminus vermittelt wird. Hierfür wurde die Sequenz der m-isoQC zum einen von Aminosäure 1-55 (m-isoQC (MetI) SS EGFP) oder von Aminosäure 19-55 (m-isoQC (Met II) SS EGFP) an EGFP fusioniert und in die Zellen transfiziert. Das Fluoreszenzmuster belegte wiederum, dass beide Varianten im Golgi-Apparat lokalisiert sind (Abbildung 3-23 B). In Analogie zu den N-terminalen Varianten der m-isoQC konnte das gleiche Ergebnis für die N-terminalen r-isoQC Varianten erhalten werden, diese sind dem Anhang (Abbildung 7-5) zu entnehmen. Demzufolge ist das Retentionssignal der Säuger-isoQCs entweder innerhalb der zytoplasmatischen Sequenz im Bereich von Aminosäure 19-34 oder im Transmembrananker codiert.

Anhand der Immunfluoreszenzfärbungen konnte nachgewiesen werden, dass der generelle Retentionsmechanismus der Säuger-isoQCs innerhalb der verschiedenen Spezies konserviert ist. Dies stellt einen Unterschied zu dem Isoenzym aus *Drosophila melanogaster* dar, welches im Mitochondrium lokalisiert ist (Schilling *et al.*, 2007a).

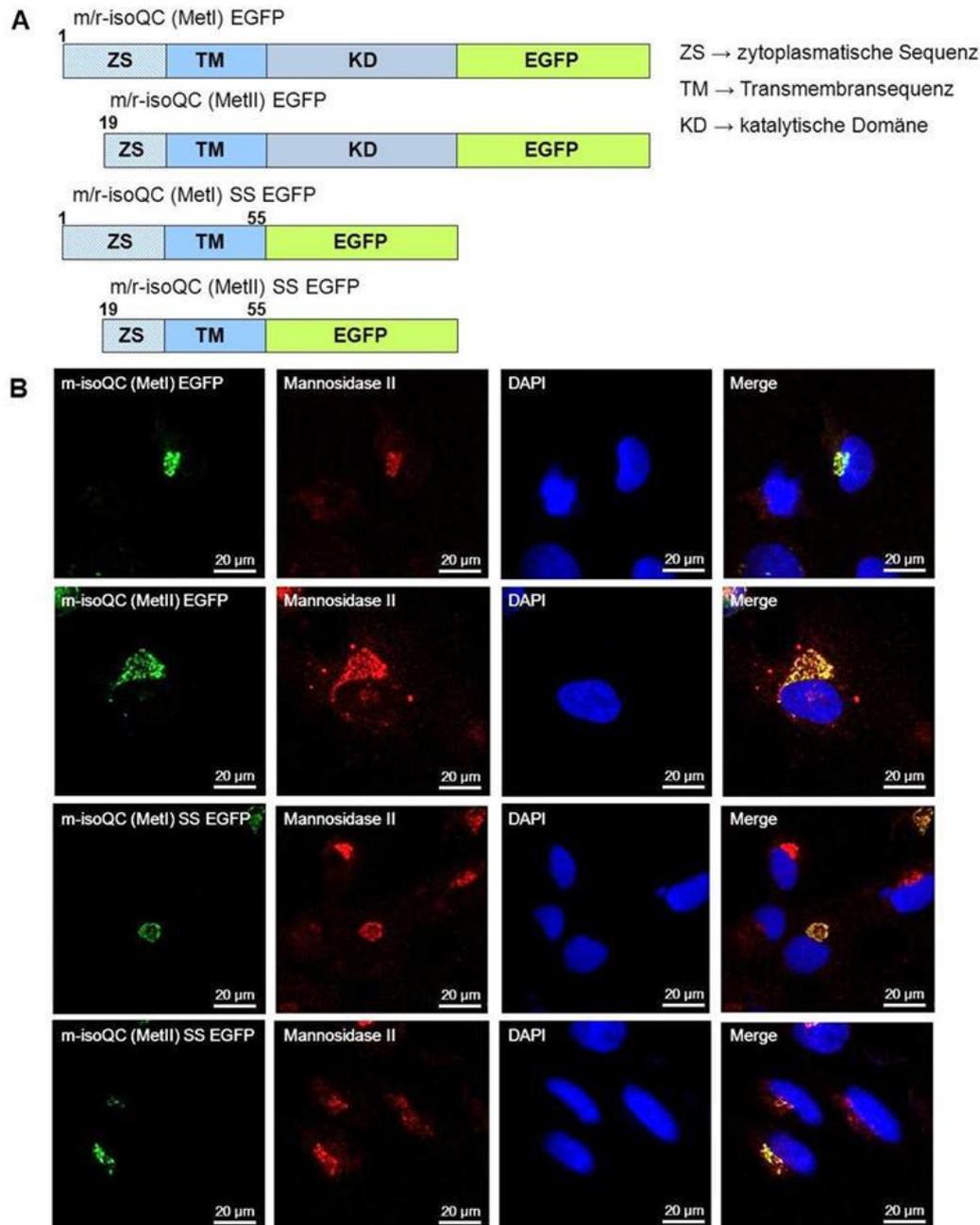


Abbildung 3-23: Untersuchung der subzellulären Lokalisation von m/r-isoQC.

A) Schematische Darstellung der m-isoQC und r-isoQC Konstrukte, welche zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation der Proteine eingesetzt wurden.

B) Untersuchung der Lokalisation der m-isoQC. Die in A) dargestellten Konstrukte wurden transient in LN405 Zellen exprimiert. Der Golgi-Apparat wurde mittels Mannosidase II Antikörper und anschließend Cy³-markierten sekundärem Antikörper sichtbar gemacht (rot). Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). Die vierte Spalte zeigt eine Überlagerung des EGFP-, Cy³- und DAPI -vermittelten Fluoreszenzmusters (Merge). Die Färbung der LN405-Zellen erfolgte etwa 24h nach Transfektion. Die Präparation der Zellen ist dem Methodenteil zu entnehmen (Seite 21).

3.6.2. Bedeutung des N-Terminus von Typ II-Membranproteinen für die Lokalisation im Golgi-Apparat

Wie im vorangegangenen Abschnitt dargelegt, konnten die isoQCs der Säuger als Typ II-Membranproteine des Golgi-Apparates identifiziert werden, wobei der N-Terminus für die Lokalisation innerhalb der Zelle verantwortlich ist (Cynis *et al.*, 2008a). In

weiterführenden Untersuchungen sollte festgestellt werden, wodurch die Retention der isoQC vermittelt wird. Eine weitere Gruppe von Typ II-Membranproteinen des Golgi-Apparates sind die Glykosyltransferasen. Bei Untersuchungen zu deren Retentionsmechanismus konnte kein einheitliches Retentionssignal gefunden werden. So wird in der Literatur eine Retention über die Transmembrandomäne sowie über die luminale katalytische Domäne diskutiert (Bretscher & Munro, 1993; Munro, 1995; Nilsson *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2000).

Um zu überprüfen, ob der N-Terminus nicht nur für die isoQC sondern auch für die Lokalisation anderer Golgi-Enzyme ausreicht, wurde auch die Glykosyltransferase β -Galaktosid- α -2,6-Sialyltransferase 1 (ST6Gal I) getestet (Berger & Hesford, 1985; Colley *et al.*, 1992; Fenteany & Colley, 2005). Es fand zusätzlich eine vergleichende Färbung des Fibroblasten-aktivierenden Proteins (FAP) statt. Bei diesem Protein handelt es sich um ein Typ II-Membranprotein, welches sich nach einem Transport durch den sekretorischen Weg an der Plasmamembran befindet (Ghersa *et al.*, 2006). Es wurden die zytoplasmatischen - und die Transmembransequenzen mit einem EGFP-*tag* fusioniert (Konstruktnamen: isoQC Cyt-isoQC TM EGFP, ST6Gal I Cyt-ST6Gal I TM EGFP und FAP Cyt-FAP TM EGFP) und in humane LN405-Zellen transfiziert. Die Färbung des Golgi-Apparates erfolgte mit einem Antikörper gegen das *trans-Golgi network integral membrane protein 2* (TGN46), ein Protein welches hauptsächlich im trans-Golgi zu finden ist (Kain *et al.*, 1998). Die Expression der Konstrukte isoQC Cyt-isoQC TM EGFP und ST6Gal I Cyt-ST6Gal I TM EGFP verdeutlicht, dass isoQC und ST6Gal I sehr ähnlich lokalisiert sind, was bereits in vorhergehenden Untersuchungen beschrieben worden ist (Colley *et al.*, 1992; Cynis *et al.*, 2008a). Das Konstrukt FAP Cyt-FAP TM EGFP hingegen war in verschiedenen Zellkompartimenten zu detektieren und stimmte mit der beschriebenen Verteilung von FAP im sekretorischen Weg und der Plasmamembran überein (Abbildung 3-24). Die erhaltenen Ergebnisse konnten durch Expression der drei Konstrukte in COS-7 Zellen bestätigt werden (Abbildung 3-24; Anhang Abbildung 7-6). Somit ließ sich schlussfolgern, dass die N-terminalen Bereiche von isoQC-, ST6Gal I- und FAP-Fragmente für die Lokalisation der Fusionsproteine in der Zelle verantwortlich sind.

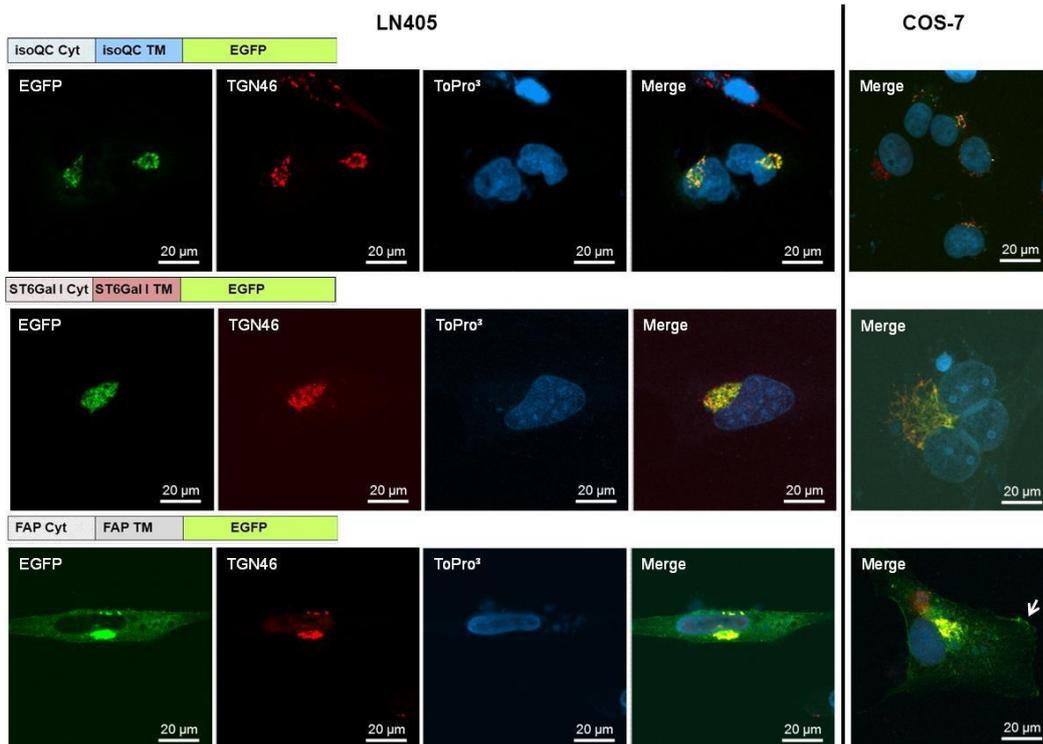


Abbildung 3-24: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Lokalisation von Fusionsproteinen. Diese bestehen aus einem N-terminalen Bereich von isoQC, ST6Gal I oder FAP und wurden an das EGFP-Protein gekoppelt. Die Konstrukte wurden in LN405 und COS-7 Zellen exprimiert. Der Golgi-Komplex wurde mit TGN46 Antikörper und anschließendem Cy³-markierten sekundärem Antikörper (rot) und der Zellkern mit ToPro³ (blau) angefärbt. Die vierte und fünfte Spalte zeigt die Überlagerung (Merge) der EGFP-, Cy³- und ToPro³-vermittelten Fluoreszenz für beide Zelllinien. Die Färbung der Zellen erfolgte etwa 24h nach Transfektion. Die transfizierten Konstrukte sind schematisch über den Fluoreszenzbildern dargestellt.

3.6.3. Retentionsmotiv der h-isoQC in zytoplasmatischen Sequenz

Um ein potentielles Retentionssignal innerhalb der N-terminalen Sequenz der h-isoQC zu identifizieren wurden die zytoplasmatischen Sequenzen von ST6Gal I und isoQC jeweils mit der Transmembransequenz von FAP und C-terminalen EGFP fusioniert (ST6Gal I Cyt-FAP TM EGFP und isoQC Cyt-FAP TM EGFP). Der Austausch der Transmembransequenz von ST6Gal I durch die von FAP führte zum Verlust der Retention im Golgi-Apparat (Abbildung 3-25). Daraus ließ sich schlussfolgern, dass sich das Retentionssignal der ST6Gal I nicht innerhalb der zytoplasmatischen Sequenz befindet. Dies ist in Analogie zu den Daten aus der Literatur zu sehen (Colley *et al.*, 1992; Fenteany & Colley, 2005). Das Derivat aus isoQC und FAP war im Gegensatz dazu immer noch im Golgi-Komplex vorzufinden (Abbildung 3-25). Damit konnte gezeigt werden, dass sich das Retentionssignal innerhalb der zytoplasmatischen Sequenz der isoQC befindet. Diese Ergebnisse konnten ebenfalls bei der Expression der Konstrukte in COS-7 Zellen reproduziert werden (siehe Abbildung 3-25; Anhang Abbildung 7-7).

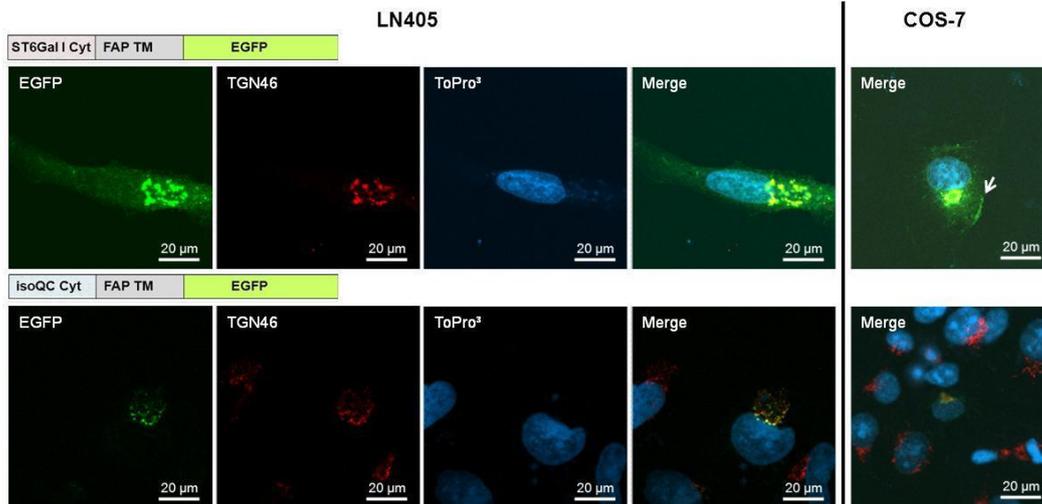


Abbildung 3-25: Subzelluläre Lokalisation von Fusionsproteinen, welche die cytoplasmatische Sequenz von ST6Gal I- oder isoQC aufwiesen.

Die Transmembransequenz entspricht der des Proteins FAP, den C-terminalen Bereich bildete das Protein EGFP (schematisch über den Fluoreszenzbildern dargestellt). Die Konstrukte wurden in LN405- und COS-7-Zellen exprimiert. Der Golgi-Komplex wurde mit TGN46-Antikörper und anschließend Cy³-markierten Sekundäranantikörper (rot) angefärbt und der Zellkern mittels ToPro³ (blau). Die Färbung erfolgte etwa 24h nach Transfektion der Zellen. Die vierte und fünfte Spalte zeigt die Überlagerung (Merge) der EGFP-, Cy³- und ToPro³-Fluoreszenz.

3.6.4. Retentionsmotiv der h-isoQC gleicht Vps74-Bindesequenz von Glykosyltransferasen aus Hefe

Im Unterschied zu den Glykosyltransferasen aus Säugern konnte bei früheren Untersuchungen zu Glykosyltransferasen aus Hefe ein zytoplasmatisches Retentionsmotiv bestehend aus den Aminosäuren (F/L)-(L/I/V)-X-X-(R/K) identifiziert werden. Dieses Sequenzmotiv wird vom zytoplasmatischen Protein *Vacuolar protein sorting-associated protein 74* (Vps74) erkannt und gebunden, wodurch die Retention vermittelt wird (Schmitz *et al.*, 2008; Tu *et al.*, 2008). Im Menschen gibt es zwei orthologe Proteine: das *Golgi Phosphoprotein 3* (GPP34) und die Isoform *Golgi Phosphoprotein 3 like* (GPP34R). Eine Beteiligung an der Retention von Proteinen im Golgi konnte allerdings bis heute nicht nachgewiesen werden (Dippold *et al.*, 2009). Interessanterweise ist in der zytoplasmatischen Sequenz der isoQC dieses Bindemotiv zu finden, welches aus den Aminosäuren L-L-P-P-K besteht. Die ST6Gal I und zahlreiche andere Glykosyltransferasen weisen dieses Motiv nicht auf.

Um zu untersuchen, ob dieses Motiv für die Retention der isoQC verantwortlich ist, wurden die drei als essentiell beschriebenen Aminosäuren durch Alanin ausgetauscht (A-A-P-P-A) und die Lokalisation des resultierenden Konstruktes untersucht. Die Expression dieses Konstruktes in LN405 Zellen resultierte in einer veränderten Fluoreszenzfärbung im Vergleich zur unmutierten Variante (Abbildung 3-26), die der Lokalisation des FAP gleicht (Vergleich zu Abbildung 3-24). Somit ließ sich schlussfolgern, dass das Sequenzmotiv A-A-P-P-A für die Retention des N-terminalen Bereiches der isoQC verantwortlich ist. Dieses Ergebnis konnte auch in COS-7 Zellen

reproduziert werden (Abbildung 3-26; Anhang Abbildung 7-8), was eine Konservierung des grundsätzlichen Mechanismus zwischen verschiedenen Spezies vermuten lässt. Weiterführende Untersuchungen, welche auf der Expression der nativen isoQC und der entsprechenden Bindungsmotiv-Mutante beruhten, wiesen ebenfalls auf eine Veränderung der Lokalisation hin. Dabei konnte anhand von Aktivitätsmessungen eine Anreicherung der Bindungsmotiv-Mutante im Medium der Zellen festgestellt werden (Anhang Abbildung 7-9, Abbildung 7-8, Reimann, 2011).

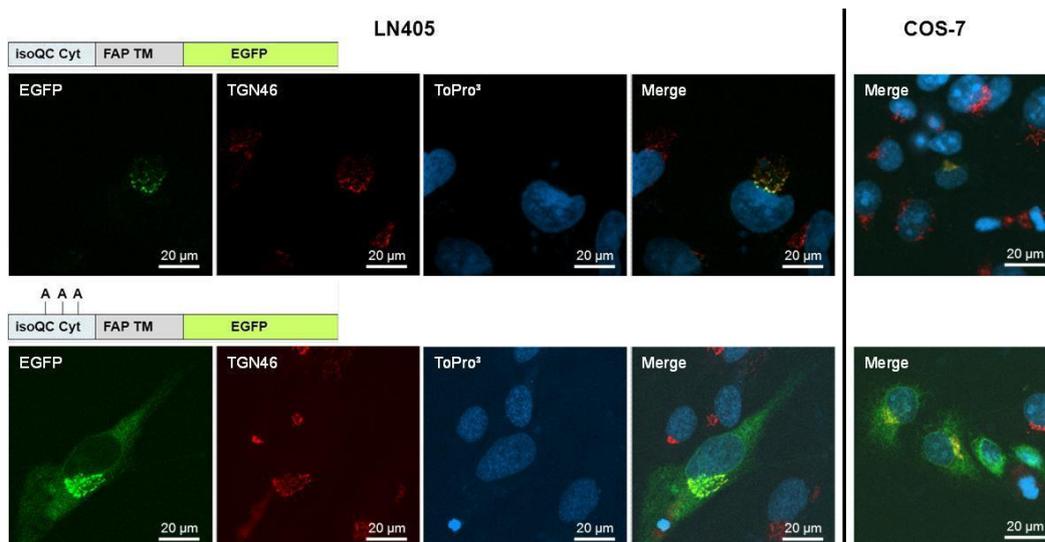


Abbildung 3-26: Subzelluläre Lokalisation von isoQC-FAP-Fusionsproteinen in LN405- und COS-7-Zellen im Vergleich zur Bindungsmotiv-Mutante.

Der Golgi-Komplex wurde mittels TGN46-Antikörper und Cy³-markiertem Sekundärantikörper (rot) angefärbt, der Zellkern mittels ToPro³ markiert (blau). Die Färbung erfolgte etwa 24h nach Transfektion der Zellen. Eine Co-Lokalisation zeigte sich aus der Überlagerung (Merge) der EGFP-, Cy³- und ToPro³-Fluoreszenz (vierte Spalte). Die transfizierten Konstrukte sind schematisch über den Fluoreszenzbildern dargestellt.

3.6.5. Konservierung des Vps74 Bindemotivs in humanen Proteinen des Golgi-Apparates

Aufbauend auf den Ergebnissen zur Lokalisation von isoQC sollte untersucht werden, ob auch andere Typ II-Membranproteine des Golgi-Apparates das Vps74-Bindemotiv aufweisen. Anschließend sollte die Bedeutung dieses Motivs für die Lokalisation dieser Proteine untersucht werden. Anhand einer Datenbankrecherche (UniProtKB) konnten fünf verschiedene Enzyme identifiziert werden, die auch das Sequenzmotiv besitzen. Für die weiterführenden Untersuchungen wurde das Enzym α -1,6-Mannosylglykoprotein-6- β -N-acetylglucosaminyltransferase B (GnT-IX) mit dem putativen GPP34-Bindungsmotiv L-V-T-L-R (Aminosäure 16-20) ausgewählt.

In Analogie zu den Untersuchungen mit der isoQC wurde sowohl die N-terminale Sequenz bestehend aus der zytoplasmatischen- und Transmembransequenz mit einem EGFP fusioniert als auch die Bindemotiv-Variante generiert. Für die Variante wurden die essentiellen Reste im Bindemotiv durch Alanin ausgetauscht (A-A-T-L-A). Die beiden Konstrukte wurden transient in LN405 und COS-7 Zellen exprimiert. Die

Ergebnisse sind in Abbildung 3-27 sowie im Anhang (Abbildung 7-10) dargestellt. Durch Co-Färbung mit dem Golgi-Marker konnte eine Lokalisation der unmutierten Variante in diesem Zellkompartiment festgestellt werden. Weiterhin führte auch hier die Mutation des potentiellen GPP34-Bindemotivs zu einem Verlust der Golgi-Lokalisation, wie es für die isoQC beobachtet wurde. Diese Ergebnisse verdeutlichten, dass eine mögliche GPP34-Interaktion für die Retention zahlreicher Proteine im Golgi-Apparat verantwortlich ist.

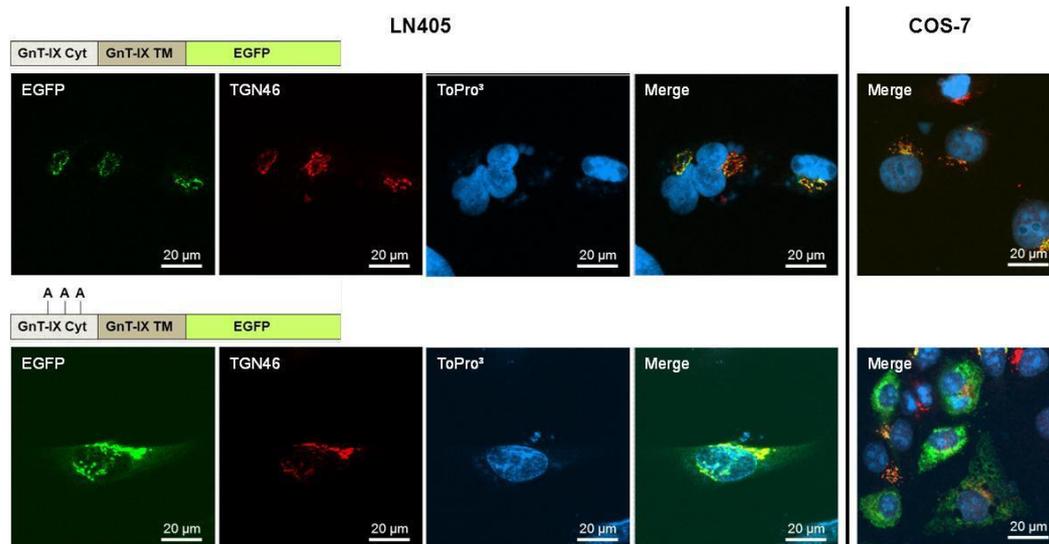


Abbildung 3-27: Subzelluläre Lokalisation von GnT-IX-Fusionsproteinen in LN405- und COS-7-Zellen im Vergleich zur Bindungsmotiv-Mutante.

Der Golgi-Komplex wurde mittels TGN46-Antikörper und Cy³-markiertem Sekundäntikörper (rot) angefärbt, der Zellkern mittels ToPro³ markiert (blau). Die Färbung erfolgte etwa 24h nach Transfektion der Zellen. Eine Co-Lokalisation zeigte sich aus der Überlagerung (Merge) der EGFP-, Cy³- und ToPro³-Fluoreszenz (vierte Spalte). Die transfizierten Konstrukte sind schematisch über den Fluoreszenzbildern dargestellt.

3.6.6. Einfluß des *knockdown* von GPP34 und GPP34R auf die Lokalisation von isoQC und GnT-IX

Anhand des Austausches der mutmaßlich essentiellen Aminosäuren des GPP34-Bindungsmotivs konnte gezeigt werden, dass die Sequenz für die Lokalisation von isoQC und GnT-IX im Golgi-Apparat notwendig ist. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, sollte mittels *knockdown* von GPP34 und GPP34R in HEK293 Zellen untersucht werden, ob sich die Lokalisation von isoQC verändert. Für den *knockdown* von GPP34 und GPP34R wurde ein Gemisch aus verschiedenen siRNAs verwendet. Die Überprüfung der Effizienz der Depletion erfolgte auf mRNA-Ebene (Abbildung 3-28 A). Die Bestimmung der *knockdown*-Effizienz war nur auf mRNA-Ebene möglich, da die Sensitivität des zur Verfügung stehenden Antikörpers gegenüber GPP34 und GPP34R zu gering war.

Die Transfektion von HEK293-Zellen mit siRNA gegen GPP34 und GPP34R führte zu einer Reduktion der jeweiligen mRNA-Konzentration auf 20-30% der

Ausgangskonzentration. Trotz einer Sequenzidentität von GPP34 und GPP34R von 63% war der Einfluss der siRNA spezifisch für das jeweilige Zielprotein. Somit war davon auszugehen, dass eine Veränderung in der Lokalisation von isoQC nur auf die Reduktion des entsprechenden Proteins zurückzuführen ist.

Die Bestimmung der isoQC-Aktivität im Medium der Zellen zeigte einen signifikanten Anstieg der Aktivität nach der Depletion von GPP34 im Vergleich zur Kontrolle (mock-Transfektion, Abbildung 3-28 B). Dieser Effekt war nach der Transfektion der Zellen mit siRNA gegen GPP34R nicht zu beobachten.

Um auszuschließen, dass die erhöhte isoQC-Aktivität im Medium auf eine Lyse von Zellen nach Transfektion mit GPP34-siRNA zurückzuführen war, wurde die Aktivität von Laktatdehydrogenase (LDH) im Medium bestimmt. Die LDH ist ein zytoplasmatisches Protein, welches bei Zellyse in das Medium abgegeben wird. Aus Abbildung 3-28 C wird deutlich, dass die Behandlung mit siRNA keine gesteigerte Lyse der Zellen bewirkte. Somit konnte nachgewiesen werden, dass GPP34 an der Retention von h-isoQC im Golgi-Apparat beteiligt ist.

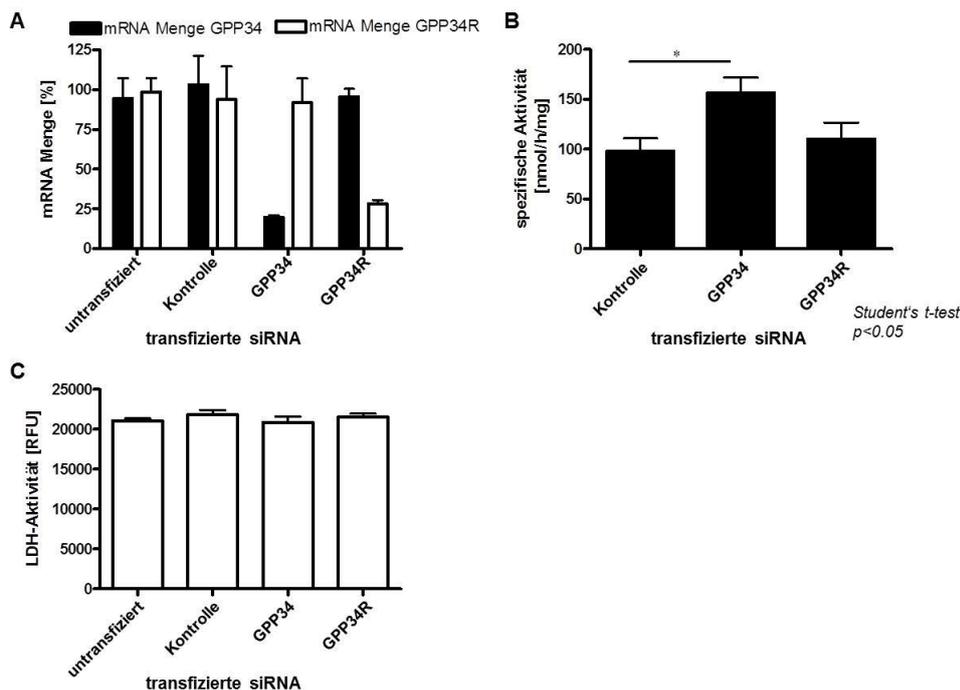


Abbildung 3-28: Untersuchung des Einflusses von GPP34 und GPP34R auf die Lokalisation von isoQC.

Die Expression von GPP34 oder GPP34R wurde mittels siRNA reduziert. Zusätzlich wurden die Zellen mit einem h-isoQC-Konstrukt transfiziert (siehe 2.9.3). Die Abbildungen stellen den Mittelwert und den Standardfehler aus vier Bestimmungen dar.

(A) Untersuchung der *knockdown*-Effizienz mittels quantitativer PCR (mRNA-Konzentration von GPP34 und GPP34R). Es wurde eine Kreuznormalisierung auf die drei Referenzgene YWHAZ, GAPDH und HPRT durchgeführt.

(B) Spezifische isoQC-Aktivität im Medium nach Behandlung mit siRNA. Die Aktivitätsmessung erfolgte mit Q- β NA als Substrat (siehe Kapitel 2.12.5; * p < 0,05, mock vs. GPP34, *Student's t-test*, n=4).

(C) Analyse der Zytotoxizität nach siRNA-Transfektion im Vergleich zu untransfizierten Zellen. Die Zytotoxizität wurde durch die Messung der löslichen Laktat Dehydrogenase (LDH) im Zellmedium bestimmt (siehe Kapitel 2.9.4).

Der Effekt des GPP34-*knockdowns* auf die Lokalisation von isoQC, GnT-IX und ST6Gal I wurde mittels *Western Blot* analysiert (Abbildung 3-29). Die Behandlung der Zellen mit GPP34-siRNA führte zu einem reduzierten Signal von isoQC im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 3-29, Bahn 1 und 2). Im Gegensatz dazu hatte die Behandlung mit GPP34R-siRNA keinen Einfluss auf die isoQC (Abbildung 3-29, Bahn 3). Der Signalverlust ließ auf eine Änderung der subzellulären Lokalisation bzw. Sekretion der isoQC in das Medium schließen.

Das gleiche Ergebnis konnte für GnT-IX beobachtet werden, wobei hier der *knockdown* von GPP34 einen noch deutlicheren Effekt zeigte. Nach *knockdown* von GPP34 war kein GnT-IX-Signal bei ca. 130 kDa zu detektieren (Abbildung 3-29, Bahn 2). Dafür trat eine Bande bei ca. 72 kDa auf, dies könnte auf einen partiellen Abbau des Proteins im späten sekretorischen Weg hindeuten. Nach Behandlung mit GPP34R-siRNA wurde diese Veränderung nicht beobachtet. Neben den Golgi-Enzymen isoQC und GnT-IX mit dem GPP34-Bindemotiv wurde auch die Lokalisation von ST6Gal I, eine Glykosyltransferase, die nicht über die GPP34-Erkennungssequenz verfügt, untersucht. Anhand der *Western Blot*-Analysen wird deutlich, dass ST6Gal I noch im Zelllysate zu detektieren war. Dies legte die Schlussfolgerung nahe, dass ST6Gal I durch einen GPP34-unabhängigen Mechanismus im Golgi zurückgehalten wird, wie vorhergehend beschrieben wurde (Peanne *et al.*, 2011; Pokrovskaya *et al.*, 2011).

Zusammenfassend zeigten die durchgeführten siRNA Experimente, dass GPP34 eine entscheidende Rolle bei der Retention von isoQC und GnT-IX im Golgi-Apparat spielt.

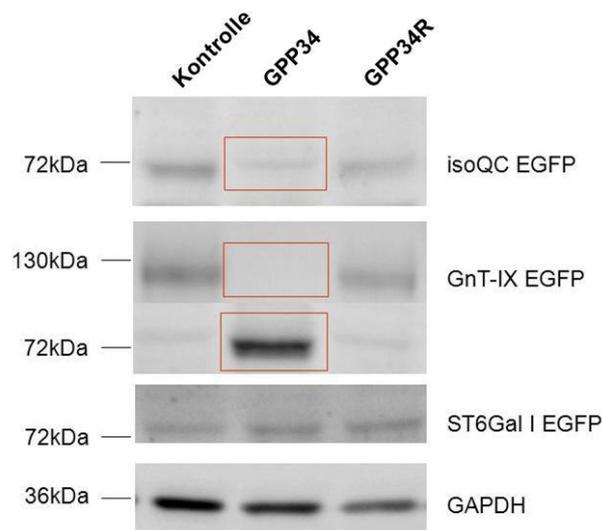


Abbildung 3-29: Western Blot-Analyse von Zelllysaten nach GPP34- und GPP34R knockdown. Detektion der Expression von isoQC, GnT-IX und ST6Gal I mit einem EGFP-tag nach Behandlung der Zellen mit GPP34- und GPP34R-siRNA. Jeweils 15µg Gesamtprotein des Zelllysats wurde im 8%- (GnT-IX) bzw. 10%igen SDS-Gel (isoQC und ST6Gal I) aufgetrennt. Die Proteine wurden mit EGFP-spezifischem Antikörper in 1:2500 Verdünnung detektiert und GAPDH-Antikörper als Ladekontrolle verwendet.

3.6.7. Interaktionsuntersuchungen von GPP34 mit Proteinen des Golgi-Apparates durch Co-Immunpräzipitation

Um die Interaktion von GPP34 und GPP34R auf die Lokalisation der h-isoQC zu bestätigen, wurde eine Interaktionsanalyse mit Hilfe einer Co-Immunopräzipitation durchgeführt (Abbildung 3-30). Die Präzipitation der h-isoQC erfolgte aus untransfizierten HEK293-Zellen, um die Interaktion von GPP34 mit der endogenen h-isoQC zu untersuchen. Hierfür wurde das HEK293-Zelllysate als erstes entweder mit GPP34 oder GPP34R Antikörper inkubiert. Anschließend erfolgte die Immobilisierung des Antikörpers an die magnetischen *beads*. An diesen *beads* war der entsprechende Spezies-spezifische Antikörper zur Detektion der GPP34- und GPP34R-Antikörper gekoppelt (Durchführung siehe Material und Methoden 2.11.10). Die isoQC wurde im *Western Blot* mit Hilfe eines für den N-Terminus spezifischen Antikörpers (AK 5406) nachgewiesen (vgl. Abschnitt 3.5.1). Als Positivkontrolle für die *Western Blot*-Analyse diente isoQC aus transfizierten HEK-Zellen (Abbildung 3-30, TE) und als Negativkontrolle wurde eine Präzipitation der isoQC verwendet ohne GPP34 oder GPP34R Antikörper (Abbildung 3-30, Eluat - AK). Nach der Co-Immunpräzipitation mit GPP34-Antikörper ist eine Bande detektierbar, die der isoQC anhand des Größenstandards und Laufverhalten der Positivkontrolle zugeordnet werden kann. Dies ist nicht der Fall bei der Präzipitation mit GPP34R-Antikörper (Abbildung 3-30; Eluat + AK). Im *Western Blot* nach GPP34R-Präzipitation waren Banden zu detektieren, welche nicht der isoQC zugeordnet werden konnten. Da für die Elution der Proteine SDS-Probenpuffer verwendet wurde, erfolgte die Elution der gekoppelten Antikörper von den *beads*. Da bei der GPP34R-Co-Immunpräzipitation sowohl der Antikörper der an die *beads* gekoppelt war, als auch der isoQC-Antikörper aus Kaninchen stammen, sind sowohl die unspezifischen Banden als auch die stärkeren Signale durch die Elution mit dem SDS-Probenpuffer zu erklären. Zusätzlich dazu sind die Banden ebenfalls sehr schwach in der Negativ-Kontrolle zu erkennen. Somit konnte mittels dieser Methode nur eine Interaktion zwischen GPP34 und isoQC nachgewiesen werden.

Für eine weiterführende Untersuchung der GPP34-Bindung wurden die cytoplasmatische Sequenzen der h-isoQC, GnT-IX und ST6Gal I mit einem Biotinrest am C-Terminus verwendet. Es erfolgte eine Inkubation der Peptide mit gereinigtem GPP34 und einer Immunpräzipitation mit magnetischen *beads* (Durchführung siehe 2.11.10). Als Positivkontrolle wurde eine Inkubation der zytoplasmatischen Sequenz der Hefe-Kre2 mit gereinigtem Vps74 durchgeführt. Diese Interaktion konnte schon in vorangegangenen Studien gezeigt werden (Tu *et al.*, 2008). Die gebundenen Komplexe wurden mit Hilfe eines penta-His-Antikörpers, der den His-Tag von GPP34

und Vps74 erkennt, detektiert. Es konnte ein Signal von Kre2 (Abbildung 3-30 B, Reihe 3) sowie für GPP34 gebunden an h-isoQC und GnT-IX (Abbildung 3-30 B, Reihe 5 und 6) erhalten werden. Im Gegensatz dazu konnte kein GPP34-Signal im Fall der ST6Gal I Präzipitation detektiert werden (Abbildung 3-30 B, Reihe 4).

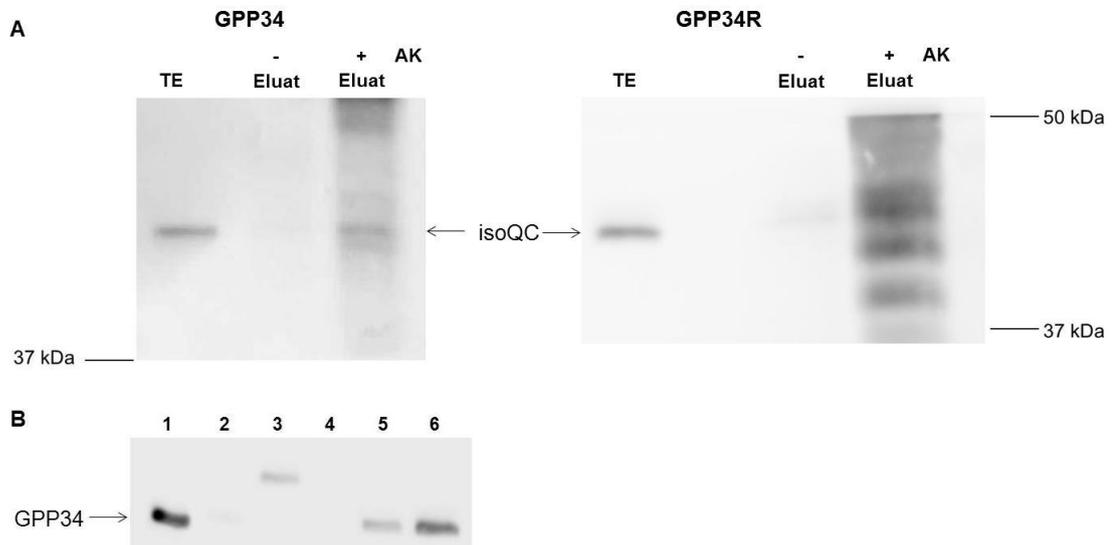


Abbildung 3-30: Interaktionsanalysen von GPP34 und Golgi-Proteinen mittels Co-Immunpräzipitation.

A) Co-Immunpräzipitation von isoQC mittels GPP34- bzw. GPP34R-spezifischen Antikörpern, gefolgt von einer *Western Blot*-Analyse mittels spezifischem isoQC-Antikörper 5406. Als Kontrollen dienten 400ng HEK293-Zellysat nach Expression der isoQC (TE) bzw. Ansätze ohne Primäantikörper. Die Präzipitation erfolgte aus 1,2mg HEK293-Zellysat. Elution wurde mit 30µl SDS-Probenpuffer durchgeführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in 12%igem SDS-Gel.

B) Detektion der spezifischen Bindung von GPP34 an zytoplasmatische Sequenzen mit Hilfe von Co-Immunpräzipitation. Die biotinylierten Peptide (cytoplasmatische Sequenzen) wurden entweder mit gereinigtem GPP34 oder Vps74 inkubiert, gefolgt von einer *Western Blot*-Untersuchung mittels anti-His Antikörper, der den N-terminalen His-tag der Proteine erkennt. Reihe 1: 250ng GPP34 nach Reinigung; Reihe 2: Co-Immunpräzipitation von 125pmol GPP34 ohne Peptid; Reihe 3: Co-Immunpräzipitation von 125pmol Vps74 mit 250pmol Kre2-Peptid; Reihe 4: Co-Immunpräzipitation von 125pmol GPP34 mit 250pmol ST6Gal I-Peptid; Reihe 5: Co-Immunpräzipitation von 125pmol GPP34 mit 250pmol h-isoQC-Peptid; Reihe 6: Co-Immunpräzipitation von 125pmol GPP34 mit 250pmol GnT-IX-Peptid

Die Untersuchungen lassen auf eine Interaktion von isoQC und GnT-IX mit GPP34 schließen, infolge deren das Protein im Golgi-Apparat zurückgehalten wird. GPP34R zeigt diese Eigenschaften offensichtlich nicht.

4. Diskussion

Neben zahlreichen anderen Modifikationen von Proteinen und Peptiden ist die Bildung von N-terminalem pGlu, katalysiert durch die Enzyme QC und isoQC, in den Fokus der Wirkstoffentwicklung gerückt. Die pGlu-Modifikation führte bei Peptiden zu einer gesteigerten Hydrophobizität und zu einer erhöhten Stabilität gegenüber dem Abbau durch Aminopeptidasen (Schlenzig *et al.*, 2009; Cynis *et al.*, 2011; Schilling *et al.*, 2011). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der pGlu-Rest bei Peptiden wie TRH, GnRH oder CCL2 für die Ausprägung der biologischen Aktivität notwendig ist (Abraham & Podell, 1981; Van Coillie *et al.*, 1998; Morty *et al.*, 2006).

Bei verschiedenen Krankheiten wurde unter anderem das Peptid pGlu-CCL2 als ein Hauptmediator identifiziert, welcher die Monozyteninfiltration in entzündetes Gewebe vermittelt. Aus diesem Grund stellte die Unterdrückung der Aktivität von CCL2 bei verschiedenen inflammatorischen Krankheiten wie z.B. Atherosklerose, rheumatoider Arthritis oder auch der Alzheimer-Krankheit ein Ziel der Wirkstoffentwicklung dar (Ishizuka *et al.*, 1997; Charo & Taubman, 2004; Rantapaa-Dahlqvist *et al.*, 2007;).

Ein weiteres pGlu-modifiziertes Peptid, welches bei der Alzheimer-Krankheit eine Rolle spielt, ist das pGlu-A β . Bei diesem Peptid führt der pGlu-Rest ebenfalls zu einer Veränderung der biophysikalischen Eigenschaften und u.a. auch zu einer erhöhten Aggregationsneigung (Schilling *et al.*, 2006; Schlenzig *et al.*, 2009). Es konnte gezeigt werden, dass vom pGlu-A β eine Keimbildung für die Aggregation ausgehen könnte (Schilling *et al.*, 2006). Schilling *et al.* zeigten 2008, dass eine Inhibierung der pGlu-Bildung zu einer Unterdrückung der Alzheimer-Pathologie in Mäusen führt (Schilling *et al.*, 2008b). Aufgrund der Beteiligung von QC/isoQC-Substraten bei einer Vielzahl von Krankheiten bzw. Krankheitsverläufen könnte die Inhibierung der Enzymaktivität eine Möglichkeit darstellen, in die pathophysiologischen Prozesse einzugreifen. Für die Entwicklung der Inhibitoren war eine Untersuchung von isoQC und QC sowie deren Rolle im Organismus bedeutsam.

Während die QC bereits umfassend untersucht wurde, ist über die isoQC weit weniger bekannt (Schilling *et al.*, 2002a; Schilling *et al.*, 2003b; Schilling *et al.*, 2005; Cynis *et al.*, 2008a). Ein Vergleich beider Enzyme zeigte sehr ähnliche biochemische Eigenschaften aber eine unterschiedliche Gewebeverteilung und subzelluläre Lokalisation. Die QC wird von der Zelle zusammen mit ihren physiologischen Substraten sezerniert, wohingegen die isoQC als ein Typ II-Membranprotein im Golgi-Apparat verbleibt. Aus diesem Grund ließ sich vermuten, dass beide Enzyme die N-terminale pGlu-Bildung bei verschiedenen physiologischen Substraten katalysieren.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten weitere Eigenschaften beider Enzyme analysiert und verglichen werden. Dies schloss eine detaillierte Untersuchung der subzellulären Lokalisation der isoQC, bzw. welche Mechanismen diese bedingen, ein.

4.1. Enzymatische und strukurelle Eigenschaften von QC und isoQC

4.1.1. Expression der isoQCs in *P. pastoris*

Die Expression von h-, m- und r-isoQC erfolgte in der Hefe *P. pastoris*. Vorangegangene Versuche, diese Enzyme in unterschiedlichen *E.coli* Stämmen zu exprimieren, resultierten in sehr geringen Proteinausbeuten (Koch, 2006; Stephan, 2007). Da die QC aus Pflanzen und Säugern in hohen Ausbeuten mit Hilfe eines Hefeexpressionssystems hergestellt werden konnten (Schilling *et al.*, 2002a; Schilling *et al.*, 2007b), sollte dieses System auch auf die isoQCs übertragen werden.

Die Expression in Hefe bietet den Vorteil, dass die Proteine posttranslational modifiziert werden und es durch die sekretorische Expression zur Ausbildung von Disulfidbrücken kommt. Im Fall der QC war dies bedeutsam, da vermutet wurde, dass eine Disulfidbrücke notwendig für die Ausprägung der katalytisch aktiven Struktur sein könnte (Schilling *et al.*, 2002). In späteren Arbeiten konnte jedoch gezeigt werden, dass die Disulfid-Verknüpfung keinen Einfluß auf die katalytische Aktivität ausübt und die Enzymstabilität nur schwach beeinflusst (Ruiz-Carrillo *et al.*, 2011).

Im Vergleich zur QC ist die isoQC offensichtlich nicht glykosyliert (siehe Sequenzvergleich Abbildung 1-2). Die Glykosylierung der humanen QC vermittelt dem Protein offensichtlich Löslichkeit. Die Expression einer QC-Variante, bei der die Glykosylierungsstelle entfernt wurde, resultierte in nur sehr geringen Ausbeuten. Um die Bildung von isoQC in *P. pastoris* zu verbessern, wurde in vorangegangenen Untersuchungen eine artifizielle Glykosylierungsstelle in die codierende Sequenz eingefügt. Dies führte zu einer deutlichen Erhöhung der Proteinausbeute (Stephan, 2007). Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, traf dies auch für die isoQC aus Maus und Ratte zu (Abbildung 3-5). Die gesteigerte Ausbeute der isoQCs im Medium ist höchstwahrscheinlich auf eine Erhöhung der Löslichkeit bzw. Reduktion der Aggregationsneigung des Proteins zurückzuführen (Tams *et al.*, 1999; Hoiberg-Nielsen *et al.*, 2006). Die Erhöhung der Proteinlöslichkeit durch die Glykosylierung zeigte sich ebenfalls bei Deglykosylierung der gereinigten h-isoQC. Die Entfernung der Zuckerreste reduzierte die Löslichkeit auf etwa 1mg/ml, wohingegen das glykosylierte Protein bis 30mg/ml in Lösung blieb. Bei der Expression von Proteinen kann es in den sekretorischen Kompartimenten, insbesondere bei der Abschnürung von Vesikeln, zu

sehr hohen Proteinkonzentrationen kommen. So ist beispielsweise die Konzentration von Hormonen in sekretorischen Vesikeln bis zu 200-mal höher als im Lumen des ERs (Farquhar *et al.*, 1978). Außerdem kann die Aggregation von Proteinen im sekretorischen Weg in der Folge zum Abbau führen. Im Fall der heterologen Expression von isoQC könnte somit die hohe lokale Konzentration zur Aggregation und zu einer Verringerung der Ausbeute geführt haben. Die Einführung der Glykosylierungsstelle wirkte diesem Prozess entgegen. Zudem zeigten die erhaltenen Daten, dass sich durch die weitere Verkürzung und somit vermutliche Deletion einer potentiellen Stammregion eine etwa zehnfache Erhöhung der Sekretionseffizienz erzielen ließ (siehe Abbildung 3-3 und Abbildung 3-5). Mit Hilfe dieses Expressionssystems konnten durchschnittlich 3,5mg/L gereinigte h-isoQC hergestellt werden. Im Vergleich zu mQC oder CCL2, die ebenfalls in *P. pastoris* exprimiert wurden, ist die Ausbeute sehr gering (Cereghino *et al.* 2000; Schilling *et al.* 2005). Auch dies könnte auf einen Einfluss des hydrophoben N-terminalen Bereichs der isoQC hindeuten. Ein ähnlicher Ansatz, welcher auf einer Deletion des N-terminalen Bereiches beruhte, wurde auch in einer Arbeit verfolgt, welche während der Verfassung dieser Dissertation erschienen ist. Hier erfolgte die Expression der h-isoQC mit einer Thioredoxin-Fusion in *E. coli* BL21-Zellen, wobei die Ausbeute bei diesem Expressionssystem nicht diskutiert wurde (Huang *et al.*, 2011).

Für die im Folgenden geplante Charakterisierung der isoQC-Eigenschaften war bedeutsam, dass die Sequenzveränderungen am Enzym keinen Einfluss auf die Aktivität ausüben. Hierfür wurden die katalytischen Parameter einiger Substrate sowie kompetitiver Inhibitoren mit verschiedenen h-isoQC Varianten bestimmt. Die Daten bewiesen, dass weder die N-terminale Verkürzung der Aminosäuresequenz bis Glu60 noch die Einführung einer artifiziellen Glykosylierungsstelle einen deutlichen Einfluss auf die katalytische Aktivität ausüben (siehe Tabelle 3-1). Dies ist vermutlich in der Lage des aktiven Zentrums begründet. So befindet sich das aktive Zentrum der isoQCs im C-terminalen Bereich der Primärsequenz, wobei die im Rahmen dieser Arbeit vorgenommenen Veränderungen N-terminal sind (Vergleich auch Abbildung 3-1 und Abbildung 3-2). So ist ebenfalls der fehlende Einfluss der artifiziellen Glykosylierung auf die Substrat- und Inhibitorspezifität in der räumlichen Entfernung der Glykosylierungsstellen vom aktiven Zentrum begründbar. Aufgrund der mehr als 80%igen Sequenzidentität zwischen den isoQC aus Ratte, Mensch und Maus war davon auszugehen, dass dies für alle isoQCs der Säuger zutrifft. Die erfolgreiche Expression der isoQCs der verschiedenen Spezies stellte eine Voraussetzung für die vergleichende Charakterisierung von QC und isoQC dar.

4.1.2. Enzymatische Eigenschaften der Säuger-isoQCs im Vergleich mit den QCs

Cynis *et al.* zeigten 2008 bei ersten Untersuchungen zur Substratspezifität der h-isoQC, dass bevorzugt Substrate mit hydrophoben Aminosäuren an Position 2 nach dem N-terminalen Glutamin umgesetzt werden (z.B. QFA und QYA; Cynis *et al.*, 2008a). Gegenüber Dipeptid-Substraten mit kleinen oder negativ geladenen Resten besitzt die h-isoQC eine geringere Spezifität. Diese Eigenschaft lässt auf hydrophobe Interaktionen vom Enzym mit dem Substrat schließen.

Zum anderen konnte auch gezeigt werden, dass die pGlu-Bildung bei längeren Peptiden effizienter katalysiert wird (vgl. QE und QEDL). Aus der Untersuchung von m- und r-isoQC ließ sich prinzipiell die gleiche Substratspezifität ableiten (siehe 3.2.3). Das lässt auf einen sehr ähnlichen Aufbau der aktiven Zentren schließen und geht mit der hohen Sequenzidentität zwischen h-, m- und r-isoQC einher (siehe Abbildung 3-1). Die Ähnlichkeit in der Substratspezifität wurde durch die Bestimmung der pH-Abhängigkeit der katalytischen Effizienz (k_{cat}/K_M) für die m-isoQC noch verdeutlicht. So ließ sich ein pH-Optimum der Reaktion zwischen pH 7,5 und 8 feststellen. Dies konnte zuvor auch für die h-isoQC gezeigt werden (Cynis *et al.*, 2008a).

Auch ein Vergleich von isoQC und QC offenbart eine grundsätzliche Ähnlichkeit hinsichtlich der enzymatischen Charakteristika. Die Isoenzyme weisen eine ca. 40%ige Sequenzidentität auf. Vergleicht man ausschließlich die Sequenz der globulären Bereiche der Proteine, so resultierte eine Sequenzidentität von ca. 60% (Abbildung 1-2). Es zeigte sich, dass der Aufbau des katalytischen Zentrums zwischen QC und isoQC konserviert ist.

Die Ähnlichkeit der Isoenzyme war ebenfalls beim Substratumsatz zu detektieren. Cynis *et al.* konnten 2008 vergleichbare Substrat- und Inhibitorspezifitäten zwischen hQC und h-isoQC nachweisen (Cynis *et al.*, 2008a). Anhand der hier durchgeführten Analysen wurden sehr ähnliche katalytische Aktivitäten ebenfalls für mQC und m-isoQC festgestellt (Tabelle 4-1).

Tabelle 4-1: Kinetische Parameter der Substratumsetzung durch humane und Maus isoQC im Vergleich zu den QC-Enzymen.

Die untersuchten Substrate sind im Einbuchstabencode der Aminosäuren dargestellt. n.b. = nicht bestimmt; Daten publiziert in ^(a) Schilling *et al.* 2003; ^(b) Schilling *et al.* 2005; ^(c) Stephan *et al.* 2009;

	h-isoQC _(F48;I73N;C369A) C-His ^(c)	h-QC ^(a)	m-isoQC _(E61;I74N) ^(c)	mQC ^(c)
Substrat	k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ *s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ *s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ *s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ *s ⁻¹)
Q-βNA	229 ± 22	294 ± 6	554 ± 47	550 ± 30
Q-AMC	103 ± 29	98 ± 2	311 ± 27	125 ± 4
QQ	54 ± 5	140 ± 2	95 ± 6	213 ± 8
QE	9 ± 1	58 ± 1	16 ± 2	36 ± 1
QG	9 ± 2	53 ± 1	28 ± 2	30 ± 2
QGP	38 ± 3	195 ± 7	111 ± 7	n.b.
QYA	207 ± 57	930 ± 27	394 ± 21	n.b.
QFA	117 ± 34	1811 ± 64	403 ± 49	n.b.
QEYF	123 ± 6	979 ± 62	413 ± 46	n.b.
QEDL	55 ± 5	833 ± 21	104 ± 4	n.b.

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die aktiven Zentren zwischen QC und isoQC sehr ähnlich aufgebaut sind und die Substraterkennung und –umsetzung auf identischen Prinzipien beruht. Mit Hilfe der durchgeführten Fern-UV CD Spektroskopie der mQC und m-isoQC wurden diese Aussagen unterstützt, die Sekundärstrukturanteile waren zwischen QC und isoQC gleich (Stephan *et al.*, 2009).

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte auch die Bestimmung der Hemmkonstanten verschiedener kompetitiver Inhibitoren (siehe Tabelle 3-3). Die erhaltenen Daten bewiesen, dass die untersuchten isoQCs mit sehr ähnlichen Hemmkonstanten durch Imidazol bzw. –derivate inhibiert werden. Dies galt auch im Vergleich mit den entsprechenden QC-Enzymen (Tabelle 4-2). So war der basische Ringstickstoff durch seine Interaktion mit dem Zink im aktiven Zentrum für die Bindung von Imidazol bzw. –derivate essentiell. Die inhibitorische Potenz konnte durch eine Derivatisierung des Imidazols gesteigert werden. Dies galt besonders für eine Derivatisierung am Ringstickstoff durch das Einbringen eines hydrophoben Anteils (vgl. Imidazol und Benzylimidazol). Dieser Einfluss des hydrophoben Restes wurde vermutlich über eine Interaktion mit der hydrophoben Tasche im aktiven Zentrum ausgelöst (Buchholz *et al.*, 2006).

Tabelle 4-2: Inhibitorkonstanten einiger Inhibitoren der humanen und Maus isoQC im Vergleich zu den QC-Enzymen.

(^a) Schilling *et al.* 2003, (^b) Schilling *et al.* 2005, (^c) Stephan *et al.*, 2009, , ^d K_i-Bestimmung wurde durch Mitarbeiter der Probiodrug AG durchgeführt, (^e) Koch *et al.* 2012.

	h-isoQC _(F48;I73N;C368A) C-His ^(c)	hQC ^(a)	m-isoQC _(E61;I74) ^(c)	mQC ^(b)
Inhibitor	K _i (μM)	K _i (μM)	K _i (μM) ^a	K _i (μM)
Imidazol	235 ± 13	103 ± 4	103 ± 35	160 ± 10
Benzimidazol	250 ± 5	138 ± 5	124 ± 4	192 ± 3
Benzylimidazol	6,2 ± 0,2	7,1 ± 0,3	3,9 ± 0,3	6,4 ± 0,7
Methylimidazol	82 ± 3	30 ± 1	52 ± 5	23 ± 1
PQ50	0,80 ± 0,02	0,054 ± 0,0002 ^d	0,20 ± 0,01 ^d	0,114 ± 0,011 ^e

Für den spezifischen QC Inhibitor PQ50 wurden für die Säuger isoQC nahezu identische K_i-Werte bestimmt. Bei PQ50 handelte es sich ebenfalls um ein Imidazolderivat, das eine Propylkette, eine Thiazolgruppe und einen Methoxyphenylring enthält (Struktur siehe Tabelle 2-17). Dieser Inhibitor wurde durch Struktur-Wirkungsbeziehungen mit der hQC so generiert, dass er das aktive Zentrum ausfüllt und durch Interaktionen der Seitenketten im aktiven Zentrum mit dem Inhibitor eine höhere inhibitorische Potenz erreicht wird (Buchholz *et al.*, 2006). Deshalb ließ sich aus den ähnlichen Hemmkonstanten für die isoQCs ableiten, dass auch die sekundären Interaktionen (z.B. des Dimethoxyphenylringes) in den Enzymen ähnlich sind.

Hinsichtlich der vergleichenden Untersuchung der Substrat- und Inhibitorspezifität ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der humanen und der isoQC aus Nagern feststellen. Dies verhält sich analog zu den QCs der Säuger (Schilling *et al.*, 2002a; Schilling *et al.*, 2005).

Trotz des scheinbar sehr ähnlichen Aufbaus der aktiven Zentren der isoQCs ließen sich bei Substratspezifitätsuntersuchungen höhere k_{cat}-Werte für die m- und r-isoQC detektieren (siehe Abbildung 3-8). Es kann allerdings nicht gesagt werden, ob die bessere Substratumsetzung durch einen Speziesunterschied bedingt ist, oder ob sie auf die verschiedenen Expressionsbedingungen (h-isoQC synthetisiert im Schüttelkolben, m- und r-isoQC durch Fermentation) bzw. Reinigungsprotokolle zurückzuführen waren.

Bei der Untersuchung von QC und isoQC wurde ebenfalls die Bindung des Zinkions im aktiven Zentrum bzw. die Zinkabhängigkeit der Katalyse betrachtet. Das Zinkbindungsmotiv der Säuger-QCs, welches durch die Aminosäuren Asp-Glu-His ausgebildet wird, ist in der Sequenz der isoQCs konserviert. Es konnte mit Hilfe der durchgeführten TXRF-Messung ein Zink-Ion pro Enzymmolekül detektiert werden (siehe Abbildung 3-11 A). Dieses Zink-Ion ist notwendig und ausreichend, um die volle katalytische Aktivität auszubilden (siehe Abbildung 3-11 B). Das konnte in

vorhergehenden Untersuchungen ebenfalls für die QCs gezeigt werden (Stephan et al., 2009). Ein interessanter Aspekt bei der Erforschung Zink-abhängiger Enzyme ist die Möglichkeit des Ersatzes des Zink-Ions durch andere 2-wertige Metall-Ionen (Prescott et al., 1985; Bayliss & Prescott, 1985). Mit Hilfe dieser Metallsubstitutionstechnik lässt sich sehr viel über die Reaktionsmechanismen herausfinden (D'souza et al., 2000; Garrity et al., 2005). Für die QCs konnten Schilling et al. zeigen, dass einzig und allein Kobalt die Enzyme reaktivieren kann (Schilling et al., 2005; Schilling et al., 2007a). Zu Vergleichszwecken wurden diese Untersuchungen auch für die m-isoQC im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass ein Ersatz des Zinks durch Kobalt möglich ist (Abbildung 3-11 B). Die Substitution des Zinks durch Kobalt führt zu einer um etwa 50% reduzierten Aktivität. Diese Eigenschaft des Kobalts ist vermutlich auf eine ähnliche Elektronenkonfiguration und ein ähnliches Koordinationsverhalten von Kobalt und Zink zurückzuführen und konnte schon für andere Zink-abhängige Enzyme gezeigt werden (Crawford et al., 2005). Dieses Ergebnis belegt einmal mehr die Ähnlichkeiten der Katalysemeechanismen von QC und isoQC.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die QC und isoQC der Säuger sehr ähnliche enzymatische Eigenschaften aufweisen. Die Isoenzyme besitzen ein *in vitro* identisches Substratspektrum und schwach basisches pH-Optimum, binden ein Zink-Ion im aktiven Zentrum und werden durch Imidazolderivate gehemmt. Diese Eigenschaften sind durch einen sehr ähnlichen Aufbau der Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur bedingt und legen nahe, dass beide Enzyme den gleichen evolutionären Ursprung besitzen.

Obwohl die enzymatischen Eigenschaften *in vitro* sehr ähnlich sind, konnte anhand von *knockout*-Mausmodellen gezeigt werden, dass beide Enzyme verschiedene Substrate umsetzen (Schilling et al., 2011; Becker et al., 2015). Vermutlich ist diese differentielle Substratumsetzung auf die Unterschiede in der subzellulären Lokalisation zurückzuführen. Allerdings kann auch nicht ganz ausgeschlossen werden, dass die Expression von isoQC in Hefe nicht der eigentlichen Zelllokalisierung entspricht. Die isoQCs sind *in vivo* in der Zellmembran des Golgi-Apparates zu finden. Die Deletion des N-terminalen Bereiches (zytoplasmatische –und Transmembransequenz) könnte daher einen Einfluss auf die Substratumsetzung ausüben. Die Nähe zur Membran oder aber mögliche mit der isoQC interagierende Proteine (siehe nachfolgende Kapitel) könnten den Substratumsatz in der Zelle beeinflussen.

4.1.3. Kristallisation und Strukturaufklärung von isoQC

Im Anschluss an die enzymatische Charakterisierung von isoQC sollte das Enzym kristallisiert und die 3D-Struktur aufgeklärt werden. Diese Untersuchungen sind insbesondere für die Entwicklung von Inhibitoren bedeutsam, da durch die

Entschlüsselung der Wechselwirkung von Enzym und Inhibitor Rückschlüsse auf eine Verbesserung der Hemmeigenschaften, z.B. Isoenzym-Selektivität, gezogen werden könnten. Dies wäre u.U. für die Entwicklung von Inhibitoren zur spezifischen Unterdrückung der Reifung von CCL2 von Interesse (siehe auch Einleitung, Seite 12). Zeitgleich zur Kristallisation und Strukturaufklärung der humanen isoQC aus *P. pastoris*, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, ist die Struktur der humanen isoQC durch eine andere Arbeitsgruppe veröffentlicht worden (Huang *et al.*, 2011). Im Vergleich der beiden Strukturen ist eine große Übereinstimmung in der α/β -Hydrolase-Faltung zu detektieren (Abbildung 4-1 A). In beiden Strukturen ist das Zinkion im aktiven Zentrum gebunden (Abbildung 4-1 C). Ein Unterschied stellt die Disulfidbrücke dar, welche in der publizierten Struktur (3PB7), aufgrund der Expression in *E. coli* nicht ausgebildet ist. Zusätzlich lässt sich ebenfalls ein Unterschied innerhalb von zwei *loop*-Regionen feststellen. In der *loop*-Region von His168 - Ser187 sind ebenfalls die Cysteine der Disulfidbrücke zu finden. Durch die nicht ausgebildete Disulfidbrücke in der publizierten Struktur wäre möglicherweise dieser Unterschied erklärbar. Deutlicher unterscheidet sich die *loop*-Region zwischen Aminosäure Leu302-His328, was aber nicht durch die geringe Auflösung der im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Struktur bedingt ist.

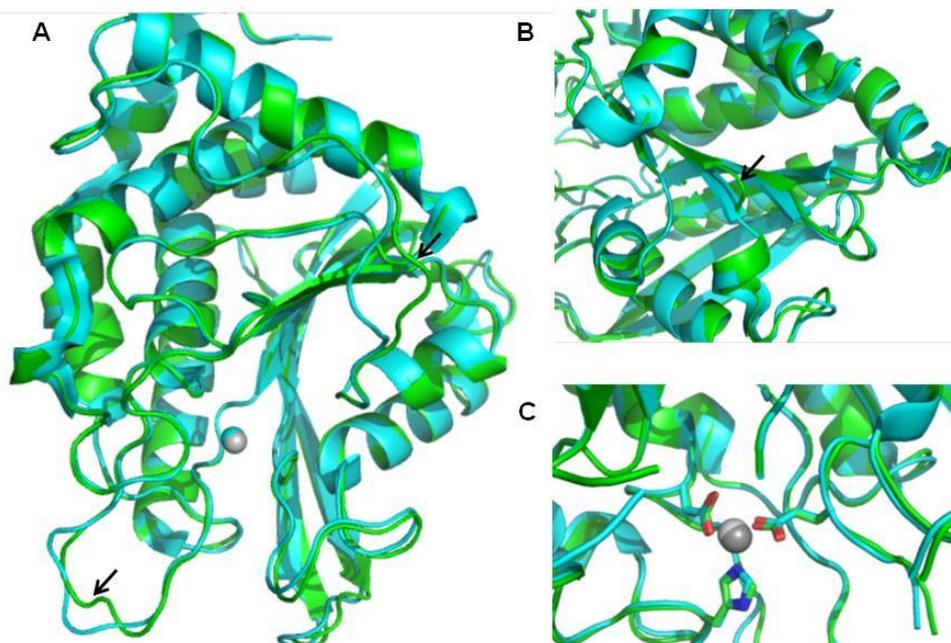


Abbildung 4-1: Schematischer Vergleich verschiedener Kristallstrukturen der h-isoQC.

Die Strukturen wurden entweder der Literatur entnommen (Huang *et al.*, 2011; 3PB7; cyan) oder im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhalten (grün).

(A) Der Vergleich der generellen Struktur der h-isoQCs zeigt eine hohe Übereinstimmung. Innerhalb von zwei *loop* Regionen (His168-Ser187 und Leu302-His328) sind Unterschiede zu detektieren (markiert durch Pfeile)

(B) Eine detailliertere Betrachtung der im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Struktur zeigt einige undefinierte Bereiche, was auf die geringe Auflösung zurückzuführen ist. (markiert durch einen Pfeil).

(C) Der Vergleich des Zinkbindungsmotives beider Strukturen zeigt eine hohe Übereinstimmung in der Lage der Zink-bindenden Aminosäuren D168, E207 und H333.

Mittels der Untersuchung der Substratspezifität konnten keine deutlichen Unterschiede zwischen QC und isoQC festgestellt werden, die auf potentiell unterschiedliche Wechselwirkung schließen lassen. Molekulare Interaktionen im aktiven Zentrum sollten deshalb durch die Co-Kristallisation der h-isoQC mit dem Inhibitor PQ50 identifiziert werden. Es wurde dieser Inhibitor ausgewählt, da er eine etwa zehnfach geringere Hemmung der isoQC aufweist. Somit schien es möglich, potentielle andere Interaktionen des Inhibitors, die für die weitere Inhibitorprofilierung hilfreich wären, in QC und isoQC zu detektieren. In den verschiedenen Publikationen zur Struktur von mQC, hQC und h-isoQC mit PQ50 im aktiven Zentrum, zeigten sich wenige Abweichungen in den Strukturen der beiden Isoformen (Ruiz-Carrillo *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2011). Sowohl in der hQC als auch in der h-isoQC liegt das aktive Zentrum am Boden einer hydrophoben Tasche. Dabei ist festzustellen, dass die hydrophobe Tasche in der h-isoQC breiter ist als in der h-QC. Ein deutlicherer Unterschied zwischen beiden Enzymen kann möglicherweise innerhalb des aktiven Zentrums mit gebundenem Inhibitor gefunden werden.

Wie bereits in Abschnitt 3.4 erwähnt, wurde die h-isoQC in deglykosylierter Form mit PQ50 co-kristallisiert. Die geringe Auflösung von 3,4 Å und 11 Molekülen pro asymmetrische Einheit ließ keine endgültige Aussage über die Interaktionen des Inhibitors mit den Aminosäuren im aktiven Zentrum zu. Aus diesem Grund wird nachfolgend die Bindung des Inhibitors im aktiven Zentrum vergleichend zur publizierten h-isoQC Kristallstruktur betrachtet (Abbildung 4-2; Huang *et al.*, 2011). Bei der publizierten h-isoQC Struktur (3PB7) konnte eine Interaktion des freien Stickstoffs des Imidazolrings, des Inhibitors mit dem Zinkion detektiert werden. Dabei besetzt der Stickstoff die 4. Koordinationsstelle des Zink-Ions, wo innerhalb der freien Form (ohne Substrat oder Inhibitor) ein Wassermolekül zu finden ist. Diese Interaktion ist ebenfalls bei der in dieser Arbeit erhaltenen Struktur zu finden. Des Weiteren lassen sich als potentielle Interaktionsstellen Trp231 mit der Propylkette von PQ50 sowie die Interaktion des Schwefels der Thioharnstoffgruppe mit dem Stickstoff des Peptidrückrats von Glu325 über eine Wasserstoffbrückenbindung feststellen (Abbildung 4-2 A). Auch diese Interaktionen sind bei der in dieser Arbeit erhaltenen Struktur zu detektieren. Demgegenüber weicht die Lage des Phenylringes von PQ50 im aktiven Zentrum von der publizierten Struktur ab. So wird für die 3PB7-Struktur eine hydrophobe Interaktion zwischen dem π -Elektronensystem des Phenylringes und dem des Phe346 postuliert. Die Orientierung des Restes wird noch verstärkt durch eine van der Waals-Interaktion zwischen Trp350 und dem Phenylring sowie durch eine Interaktion der Methoxygruppe mit Val 324 (Abbildung 4-2 B; Huang *et al.*, 2011). Innerhalb der Ergebnisse dieser Arbeit scheint der Dimethoxyphenylring des PQ50 in

den verschiedenen Molekülen des Kristalls eine flexible Position einzunehmen. Es ist z.B. in der Kette C nur eine Interaktion des Phenylrings mit der Proteinoberfläche zu detektieren. Dadurch hat PQ50 die Möglichkeit mit dem Lösungsmittel in Wechselwirkung zu treten. Im Vergleich dazu lässt sich in Kette B eine hydrophobe Wechselwirkung mit Phe346 ableiten (siehe Anhang Abbildung 7-11 B und D). Dieser Unterschied könnte durch einen Kristallisationsartefakt entstanden sein, z.B. durch die sehr dichte Packung der Moleküle im Kristall und der sehr Oberflächen-exponierten Lage des Inhibitors im Molekül. Es ergeben sich scheinbar Interaktionen von Seitenketten benachbarter Moleküle im Kristall mit den Aminosäuren im aktiven Zentrum, wodurch es zu einer Beeinflussung der Wechselwirkung zwischen dem Enzymmolekül und dem Inhibitor kommt (siehe Anhang Abbildung 7-11)

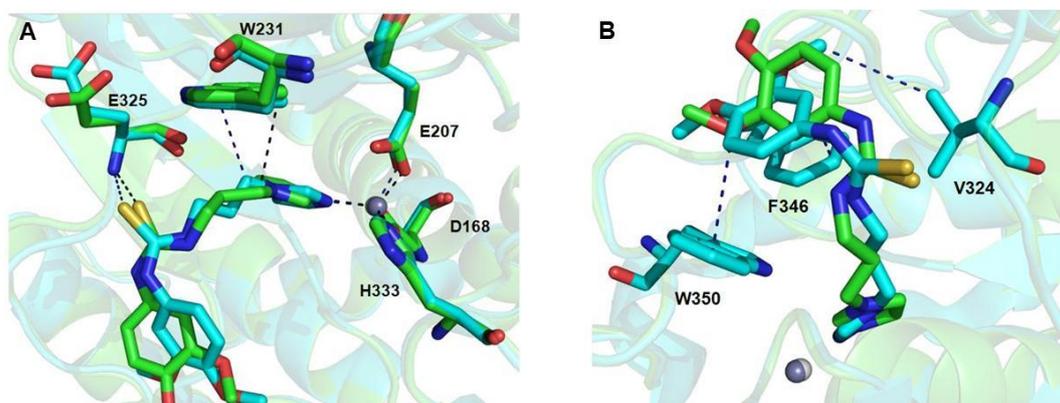


Abbildung 4-2: Vergleich der Orientierung des Inhibitors PQ50 im aktiven Zentrum von h-isoQC in verschiedenen Kristallstrukturen.

Die Strukturen wurden entweder der Literatur entnommen (Huang *et al.*, 2011; 3PB7; cyan) oder im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhalten (grün).

(A) Der Vergleich beider Strukturen zeigt die Interaktionen des basischen Stickstoffs des Imidazolrings mit dem Zink, der Propyl-Kette mit W231 und des Schwefels der Thioharnstoffgruppe mit dem Stickstoff des Peptidrückrats über eine Wasserstoffbrückenbindung.

(B) Der Phenylring von PQ50 in der 3PB7 Struktur interagiert mit F346, W350 und V324, diese Interaktionen sind innerhalb der Kette C nicht zu detektieren

Im Vergleich dazu wurde bei mQC eine über ein Wassermolekül vermittelte Interaktion des N1-Atoms der Thioharnstoffgruppe mit dem Amid des Peptidrückrats von Gln305 festgestellt (Ruiz-Carrillo *et al.*, 2011). In der von Huang *et al.* veröffentlichten Struktur der hQC konnte die für die mQC beschriebene Interaktion nicht detektiert werden. Hier erfolgte die Interaktion der Thioharnstoffgruppe mit Glu304 wie zuvor bei der h-isoQC beschrieben (Huang *et al.*, 2011). Somit lassen sich die verschiedenen Hemmkonstanten von PQ50 für QC und isoQC nicht durch eine unterschiedliche Interaktion der Thioharnstoffgruppe erklären. Beim Vergleich der Kristallstrukturen von mQC und hQC ließ sich kein übereinstimmender Bindungsmodus des Phenylrings von PQ50 mit den Aminosäureseitenketten des aktiven Zentrums feststellen (Huang *et al.*, 2011; Ruiz-Carrillo *et al.*, 2011)

Die Ergebnisse weisen insgesamt darauf hin, dass die verschiedenen Kristallstrukturen nicht mit einem einheitlichen Bindungsmodus von PQ50 in QC und isoQC in Einklang

zu bringen sind. Auch lassen die Ergebnisse keinen Schluss zu, welche Konformation in Lösung vorliegen könnte.

Ursprünglich wurde angenommen, dass die schlechtere Inhibitorbindung in der isoQC auf einen Verlust einer hydrophoben Interaktion zurückzuführen ist. Diese Annahme basierte auf der Tatsache, dass in der isoQC die Aminosäure Val324 in der Sequenz der QC ein Ile ist (Huang *et al.*, 2011). Es wird aber in Abbildung 7-11 B und D deutlich, dass dieser Val-Rest nicht direkt an der Bindung des Inhibitors beteiligt ist, sondern vermutlich nur einen Einfluss auf das Milieu im aktiven Zentrum besitzt. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit somit nicht geklärt werden, wodurch der Unterschied in den PQ50 Hemmkonstanten für QC und isoQC zu Stande kommt. Für eine weiterführende Untersuchung der Inhibitorinteraktion in der isoQC könnte ein gekoppelter Ansatz aus *in silico-Modelling* und Mutagenesen durchgeführt werden. Dadurch besteht die Möglichkeit der Analyse der Inhibitorbindung in Lösung. Dieser Ansatz wurde schon erfolgreich für die Bindung von PQ50 in der QC durchgeführt (Koch *et al.*, 2012).

4.2. Die GPP34-vermittelte Retention von isoQC im Golgi-Apparat bedingt eine differentielle Substratumsetzung durch QC und isoQC

Isoenzyme sind in pflanzlichen und tierischen Organismen zahlreich vertreten. Dabei katalysieren sie die gleiche Reaktion, unterscheiden sich aber z.T. deutlich in ihrer Primärstruktur, ihrer Substrataffinität, ihrer Sensitivität gegenüber Inhibitoren bzw. ihrem pH- oder Temperaturoptimum. Außerdem sind Isoenzyme oft in verschiedenen Geweben lokalisiert und speziell an die dort herrschenden Reaktionsbedingungen angepasst. Die vorangegangene, vergleichende Betrachtung von isoQC und QC zeigt, dass beide Enzyme eine hohe Ähnlichkeit in Bezug auf ihre Struktur und die enzymatischen Eigenschaften aufweisen. Dies wurde auch durch initiale Untersuchungen bestätigt (Cynis *et al.*, 2008a).

Erste Hinweise auf verschiedene physiologische Substrate *in vivo* ergeben sich aus der unterschiedlichen Gewebeverteilung der Enzyme. So wird die isoQC ubiquitär und in verschiedenen Geweben ähnlich stark exprimiert (siehe Abbildung 3-20 A; Cynis *et al.*, 2008a). Im Vergleich dazu wird die QC am stärksten in neuronalen Geweben wie z.B. Cortex oder Thalamus exprimiert (Abbildung 3-20 B; Pohl *et al.*, 1991). In diesen Geweben werden zahlreiche Neuropeptide synthetisiert, welche Substrate der QC darstellen könnten (siehe weiter unten). Der Beleg für eine differentielle Umsetzung von Substraten in der Zelle durch QC und isoQC konnte durch die Charakterisierung von QC- und isoQC-*knockout* Mäusen erbracht werden.

Die isoQC ist offensichtlich für die Bildung von pGlu-CCL2 verantwortlich, QC katalysiert die Reifung von pGlu-Neuropeptiden wie z.B. TRH (Cynis *et al.*, 2011; Schilling *et al.*, 2011, Becker *et al.*, 2015).

Diese Schlussfolgerung wurde aus der Analyse des Thyroxinspiegels bzw. der pGlu-CCL2-Konzentration gezogen. Die Thyroxinkonzentration unterliegt dem hypothalamisch-hypophysären Regelkreislauf, der durch das pGlu-Hormon TRH gesteuert wird (Yamada *et al.*, 1997; Yamada *et al.*, 2003). Ein *knockout* von QC beeinflusst die Thyroxinkonzentration (Schilling *et al.*, 2011), ein *knockout* von isoQC nicht (Becker *et al.*, 2015). Im Gegensatz hierzu wurde anhand von isoQC-ko Mäusen gezeigt, dass die Bildung von pGlu-CCL2 nur durch einen knock-out von isoQC beeinflusst wird (Cynis *et al.*, 2011). Diese Beobachtungen stimmen mit der Hypothese überein, dass isoQC und QC – bedingt durch eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation – verschiedene Peptide *in vivo* umsetzen (Abbildung 4-3).

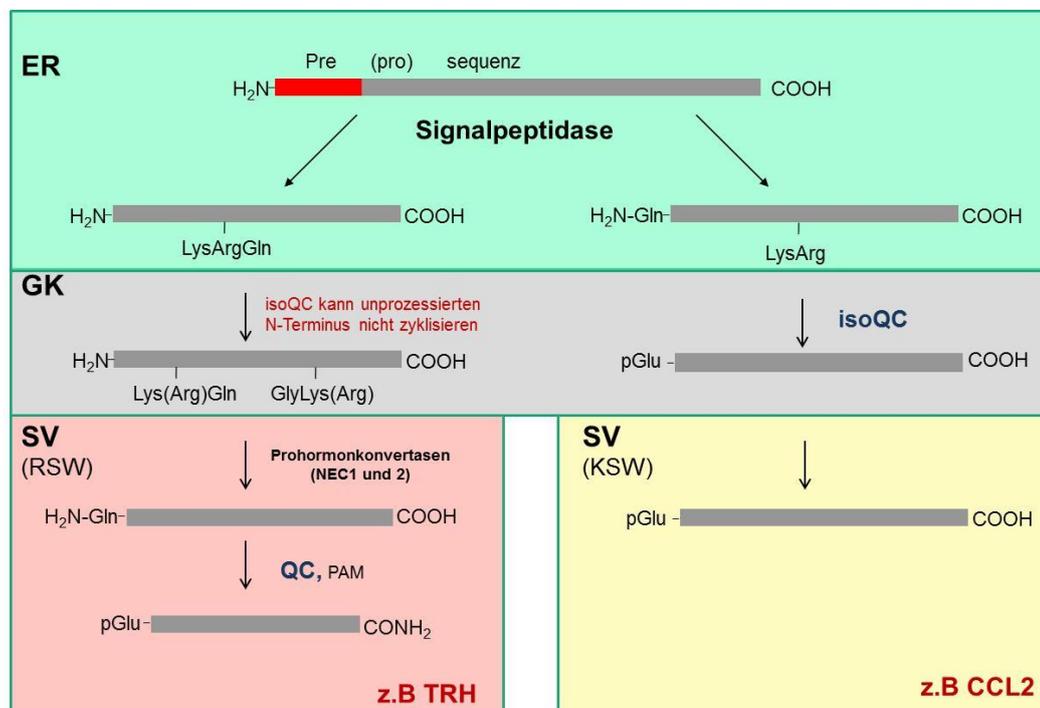


Abbildung 4-3: Hypothetisches Fließschema des Reifungsprozesses von pGlu-Hormonen oder – Proteinen einschließlich der potentiellen Funktion der QC und isoQC bei dieser Substrateifung.

Neuropeptidhormone wie TRH unterliegen einer Spaltung durch Prohormonkonvertasen (z.B. NEC2) innerhalb des regulierten sekretorischen Weges, gefolgt von der QC vermittelten pGlu-Bildung. Der Verlust der QC, aber nicht der isoQC, führt in der Folge zur Unterdrückung der pGlu-Bildung. Bei Proteinen, die in peripheren Zellen exprimiert werden, unterbleibt eine solch extensive Reifung (z.B. CCL2). Deshalb werden sie primäre isoQC Substrate, da der Glutaminyl-Vorläufer im ER bzw. Golgi-Apparat vorliegt und dort die QC unterrepräsentiert ist. (GK – Golgi Komplex; SV – sekretorische Vesikel, RSW – regulierte sekretorische Weg, KSW – konstitutive sekretorische Weg)

Die Prozessierung der Substrate während der Sezernierung sowie der Zelltyp spielen dabei eine entscheidende Rolle. Zellen wie z.B. Neuronen des Hypothalamus, welche pGlu-Neuropeptide sezernieren, verfügen über eine regulierte Sekretion. Zudem verfügen sie, wie alle weniger differenzierten Zelltypen, über einen konstitutiven Sekretionsweg. Prohormon-Präkursoren werden während der Passage und der

Verpackung in Vesikel des regulierten Sekretionsweges durch Konvertasen prozessiert, es kommt zur Freisetzung der QC-Substrate vornehmlich nach der Abschnürung vom Golgi-Apparat (Abbildung 4-3). Die QC ist mit den Vorläuferpeptiden co-lokalisiert und wird nach einem elektrischen Stimulus zusammen mit den Substraten ausgeschleust (Bockers *et al.*, 1995; Cynis *et al.*, 2006). Peptide und Proteine, welche einer weniger komplexen Prozessierung unterliegen, d.h. bei denen die pGlu-Bildung nach der Spaltung durch Signalpeptidase erfolgt, werden während der Passage durch den Golgi-Apparat modifiziert und daher durch isoQC umgesetzt. Dies konnte an primären Neuronen bestätigt werden, welche, obgleich QC gebildet wird, nur nach isoQC ko weniger pGlu-CCL2 produzierten (Becker *et al.*, 2015). Dem Ergebnis entsprechend konnte auch in den Tieren keine kompensatorische Regulation des jeweiligen Isoenzym nach ko des anderen beobachtet werden (Abbildung 3-21; Abbildung 3-22). Der milde Phänotyp der *knockout* Mäuse könnte auch auf Bildung von pGlu-Peptiden durch eine spontane Zyklisierung von N-terminalem Glutamin zurückzuführen sein. So wurde gezeigt, dass die spontane Glutaminzyklisierung mit einer Geschwindigkeitskonstante von 10^{-6} s^{-1} stattfindet (Seifert *et al.*, 2009). Aus diesem Grund ist es wahrscheinlich, dass die pGlu-Bildung bei solchen Substraten auch spontan erfolgen kann.

Aufgrund der differentiellen Umsetzung verschiedener Peptide durch QC und isoQC *in vivo*, welche offensichtlich nicht durch eine primäre Selektivität der QCs, sondern durch die Lokalisation innerhalb der Zelle bedingt wird, sollte untersucht werden, wodurch die Retention der isoQC im Golgi vermittelt wird. In vielen Fällen wird die subzelluläre Lokalisation von Proteinen durch spezifische Aminosäuresequenzen vorgegeben. Ein sehr gut untersuchtes Beispiel stellt hier die KDEL-Sequenz für die Lokalisation von Proteinen im Endoplasmatischen Retikulum dar (Lewis & Pelham, 1992; Griffiths *et al.*, 1994). Proteine, die dieses Motiv besitzen, binden an den KDEL-Rezeptor. Dieser Rezeptor ist hauptsächlich innerhalb der Membran des Cis-Golgi-Komplexes lokalisiert und vermittelt den Rücktransport der Proteine in das ER, über einen *coat protein I* (COPI) -abhängigen Mechanismus (Griffiths *et al.*, 1994; Orci *et al.*, 1997).

Es gibt eine große Gruppe an Typ II Membranproteinen wie z.B. Glykosyltransferasen, die eine wichtige Funktion in der Proteinreifung besitzen und im Golgi zurückgehalten werden. Eine einheitliche Retentionssequenz konnte nicht gefunden werden. Die Retention der untersuchten Glykosyltransferasen wird entweder durch Transmembransequenz oder der luminalen katalytischen Domäne vermittelt. Dabei ist dieser Mechanismus unabhängig von spezifischen (Primär-)Sequenzen (Colley *et al.*, 1992; Dahdal & Colley, 1993).

Im Gegensatz dazu besitzen einige Glykosyltransferasen aus Hefe innerhalb der zytoplasmatischen Sequenz ein Bindemotiv für das Protein Vps74. Vps74 ist essentiell für die Retention der Glykosyltransferasen im medialen Golgi-Komplex (Tu *et al.*, 2008; Schmitz *et al.*, 2008). Neuere Untersuchungen zeigten, dass Vps74 sowohl mit Phosphatidyl-Inositol-(4)-Phosphat (PtdIns4P) interagiert als auch im medialen Golgi die Phosphatidyl-Inositol-Phosphatase Sac1 rekrutiert. Es erfolgt ein COPI vermittelter Transport aus dem trans-Golgi von PtdIns4P und den medialen Glykosyltransferasen. Durch die Dephosphorylierung von PtdIns4P durch Sac1 im medialen Golgi erfolgt dann die Freisetzung der Glykosyltransferasen (Modell siehe Abbildung 4-4). Dadurch wird ein stetiger Rücktransport der Glykosyltransferasen aus dem trans-Golgi gewährleistet (Wood *et al.*, 2012).

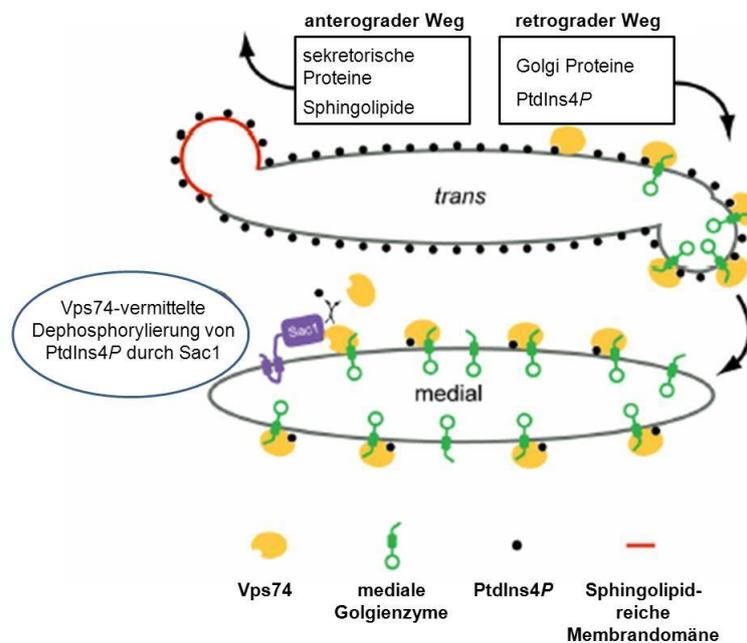


Abbildung 4-4: Modell der Vps74 vermittelten Proteinsortierung und des PtdIns4P Signalwegs im Golgi-Apparat.

Durch die Interaktion von Vps74 mit PtdIns4P und einigen Glykosyltransferasen erfolgt die Sortierung der Enzyme in COPI-bedeckte Vesikel (nicht dargestellt). Innerhalb dieser Vesikel werden die Glykosyltransferasen zum medialen Golgi transportiert. Durch Sac1 im medialen Golgi wird PtdIns4P dephosphoryliert und die Glykosyltransferasen freigesetzt. Modifiziert nach Wood *et al.*, 2012.

Interessanterweise konnte für das humane orthologe Protein GPP34 kein Einfluss auf die Lokalisation von Glykosyltransferasen festgestellt werden. Dies ist aber vermutlich darauf zurückzuführen, dass die untersuchten Glykosyltransferasen keine zu Hefe vergleichbare Sequenz aufwiesen (Dippold *et al.*, 2009). Diese humanen Glykosyltransferasen verbleiben offensichtlich aufgrund anderer Retentions- bzw. Rückholmechanismen im Golgi (Opat *et al.*, 2001; de Graffenried & Bertozzi, 2004). So konnte kürzlich für ST6Gal I und B4GalT I gezeigt werden, dass der *conserved oligomeric Golgi* – Komplex (COG-Komplex), als weiteres peripheres Membranprotein,

eine wichtige Funktion in der Retention dieser Enzyme spielt (Peanne *et al.*, 2011; Pokrovskaya *et al.*, 2011). Dieser kann offenbar mit den Enzymen und zusätzlich mit COPI interagieren, wodurch ein Rücktransport zum ER erfolgt.

Eine Datenbankrecherche nach Typ II-Membranproteinen des Golgi-Apparates, welche das Vps74 Bindungsmotiv (F/L)(L/I/V)-X-X-(R/K) aufwiesen, resultierte in der Identifikation einiger humaner Proteine, die das potentielle Bindemotiv besitzen (Abbildung 4-5). Die überwiegende Mehrheit der Proteine besitzt das Sequenzmotiv jedoch nicht.

Hefe Retentionsmotiv XXX- (F/L) - (L/I/V) -X-X- (R/K) -XXX

h-isoQC	MRS GG RGRPRRLRLGERGLMEP LLPP KRRLLPRVRLLP LLL LALAVGSAFYTIW SG ...
GnT-IX	MITVNPDGKIMVRRCL V T L R P FR L FV L GIGFF T L C F L M T S L G G Q F ...
ST3Gal III	MGL L V F V R NLLLALCLF L V L G F L Y S A W...
BGnT-5	MRM L V S G R RVKKWQLIIQLFATCFLASLMFFWEPI...
C2GNT	MLRT L L R R R LFSYPTKY F M V L V L S LITFSVL...
ST6Gal I	MIHTNLKKKFSCCVLVFLLFAVICVW...
b4Gal T1	MPGASLQRACRL L VAVCALHLGVTLVYYLAG...
FucT-III	MDPLGAAKPQWPWRRCL A A L L F Q L L V A V C F F S Y L R V S...
NAGAT	MAEVLRTLAGKPKCHALRPMILFLIMLVLVLF G Y G V L SP R S L MP G S L ER G ...

Abbildung 4-5: Aminosäuresequenzen des N-terminalen Bereiches verschiedener TypII-Membranproteine.

Der nicht unterlegte Teil ist cytosolisch, der grau unterlegte Bereich innerhalb der Membran lokalisiert. Die aufgeführten Proteine sind im Golgi-Apparat vorzufinden, einige weisen ein GPP34 Bindemotiv (F/L)(L/I/V)-X-X-(R/K) auf (rot), andere Glykosyltransferasen nicht.

In ersten Untersuchungen dieser putativen Bindesequenz erfolgte ein Aminosäureaustausch zu Alanin in der zytoplasmatischen Sequenz der isoQC (siehe Kapitel 3.6.4-3.6.5). Als Referenzprotein wurden diese Untersuchungen auch mit GnT-IX durchgeführt. GnT-IX ist ebenfalls eine Glykosyltransferase, die den Transfer von N-Acetylglukosamin auf die 6'OH-Gruppe von Mannose-Resten katalysiert. Diese Reaktion erfolgt in der Struktur von N-Glykanen und O-Mannosylglykanen (Inamori *et al.*, 2003; Inamori *et al.*, 2004). Durch den Aminosäureaustausch in der putativen Bindesequenz für GPP34 und die anschließenden Lokalisationsanalysen mittels Immunfluoreszenz wurde gezeigt, dass diese Sequenz für die Golgi-Lokalisation der h-isoQC und des GnT-IX Proteins notwendig ist (Abbildung 3-26, Abbildung 3-27). Die Beobachtung einer signifikant erhöhten isoQC-Aktivität im Medium der Zellen nach Expression der h-isoQC Bindemotiv-Mutante bestätigte die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Untersuchungen (siehe Anhang Abbildung 7-9, Reimann, 2012). Die Untersuchungen wiesen darauf hin, dass der Verlust des Motivs zu einer Fehlleitung des Proteins an die Oberfläche der Zellen führt. Dies wurde durch FACS-

Untersuchungen bestätigt (S. Schilling, persönliche Mitteilung). An der Zellmembran wird das Protein gespalten und der globuläre Teil, der das aktive Zentrum enthält, gelangt in das Medium der Zellen. Als Beleg für eine Rolle von GPP34 bei der Retention können die Untersuchungen zum *knockdown* von GPP34 mit anschließender Bestimmung der h-isoQC Aktivität im Medium angesehen werden (siehe Kapitel 3.6.6; Abbildung 3-28). Auf eine Veränderung der Lokalisation von isoQC und GnT-IX weisen auch die Western-Blot-Untersuchungen hin. Es konnte in den Zellen eine Abnahme des Signals bei isoQC und ein kompletter Signalverlust bei GnT-IX nach GPP34 *knockdown* beobachtet werden (Abbildung 3-29). Da bei Expression der ST6Gal I und Depletion von GPP34 keine Änderung in der Signalintensität im Western Blot zu detektieren war, kann eine unspezifische Reaktion der verwendeten siRNAs ausgeschlossen werden.

Für Glykosyltransferasen aus Hefe wurde beschrieben, dass die Mutation des Bindemotivs bzw. Deletion von Vps74 zum Abbau der Glykosyltransferasen in der Vakuole führt (Tu *et al.*, 2008). Analog dazu könnte das Abbaufragment von GnT-IX in Säugerzellen auf einem lysosomalen Abbau zurückzuführen sein. Um auszuschließen, dass die gemessenen Effekte im Bezug auf den Transport zur Zelloberfläche durch eine erhöhte Toxizität hervorgerufen wurden, erfolgte zusätzlich die Bestimmung der Toxizität nach Transfektion von HEK293-Zellen mit der nativen h-isoQC und der Bindemotiv-Variante. Die Bestimmung der Toxizität nach Expression der nativen isoQC und der Bindemotiv-Variante zeigte, dass eine hohe native isoQC Expression zu einer erhöhten Zytotoxizität führt. Dies könnte auf eine gestörte Golgi-Homöostase zurück zu führen sein, die einen Weitertransport anderer Proteine zu den entsprechenden Zielkompartimenten verhindert. Nach Transfektion der Bindemotiv-Variante ließ sich dieser gesteigerte Toxizitätseffekt nicht mehr detektieren, was vermutlich durch einen Transport der isoQC aus dem Golgi bedingt ist (siehe Anhang Abbildung 7-9; Reimann, 2012).

Allerdings könnte bei der isoQC auch ein weiterer Mechanismus zur Retention im Golgi beitragen. Hinweise dafür ergeben sich aus dem moderaten Anstieg der Aktivität im Medium und dem noch zu detektierenden isoQC-Signal bei der Western-Blot-Analyse nach GPP34-*knockdown*. Möglicherweise besitzt die Transmembransequenz eine zusätzliche Retentionsfunktion. Dies wurde bereits in anderen Arbeiten postuliert. Hier wird davon ausgegangen, dass sich die Proteine aufgrund von Unterschieden in der Transmembransequenz entsprechend verteilen (Patterson *et al.*, 2008). Da dieser Mechanismus unabhängig von Protein-Protein Interaktionen abläuft, ist nicht auszuschließen, dass sowohl die GPP34-Interaktion als auch dieses Fluiditätsmodell synergetisch zur Lokalisation von isoQC und anderen Proteinen beitragen. Die im

Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse weisen nur auf eine Interaktion zwischen GPP34 und isoQC hin (Abbildung 3-28 und 3-29). Für das GPP34-Isoenzym GPP34R konnte keine Funktion bei der Retention nachgewiesen werden, obwohl das Protein GPP34R eine sehr hohe Sequenzähnlichkeit innerhalb der zentralen Domäne von 84% aufweist. Größere Unterschiede sind nur in den N- und C-terminal flankierenden Sequenzen zu finden (Wu *et al.*, 2000). GPP34R konnte noch keine Funktion zugeordnet werden. Aber in den siRNA-Versuchen ist zu beachten, dass die Effizienz des *knockdown* von GPP34 und GPP34R unterschiedlich war (siehe Abbildung 3-28). Somit kann anhand dieser Experimente nicht ausgeschlossen werden, dass der fehlende Effekt nach Reduktion der GPP34R mRNA auf die geringere *knockdown* Effizienz zurückzuführen ist.

Zur Analyse dieses Sachverhalts wurden Immunpräzipitationen der isoQC aus untransfizierten HEK293 Zellen durchgeführt. Dies erfolgte zum einen unter Verwendung eines GPP34-Antikörpers und zum anderen mit einem GPP34R Antikörper. Ein spezifisches isoQC Signal wurde nur bei der Verwendung des GPP34 Antikörpers detektiert. Dies unterstreicht zusätzlich die Retentionsfunktion von GPP34 *in vivo*, da in dieser Immunpräzipitation mit untransfizierten Zellen gearbeitet wurde (Abbildung 3-30).

Die Unterschiede zwischen beiden Proteinen sind durch die hohe Sequenzähnlichkeit dieser überraschend. Es ist z.B. im Vergleich der zentralen Domäne mit dem orthologen Protein aus Hefe (Vps74) eine Sequenzähnlichkeit von 62% zu detektieren und für dieses Protein konnte die Funktion in der Retention von Glykosyltransferasen, im Gegensatz zu GPP34 bzw. GPP34R, gezeigt werden (Tu *et al.*, 2008; Schmitz *et al.*, 2008).

Im Gegensatz zu Vps74 in der Hefe konnte für GPP34 bisher noch keine Interaktion mit Membranproteinen nachgewiesen werden. In humanen Zellen scheint GPP34 jedoch an PtdIns4P und das Protein MYO18A zu binden. Letzteres interagiert mit dem Aktinzytoskelet. Diese beiden Interaktionen des GPP34 besitzen eine essentielle Funktion in der Aufrechterhaltung der Golgi-Struktur (Dippold *et al.*, 2009). Mit Hilfe von *in silico* Untersuchungen an einem GPP34-Dimer Modell mit gebundenem PtdIns4P (M-GPP34-Dim/P) wurden spezifische Aminosäuren identifiziert (E175 und D198), die potentielle Interaktionen mit den cytoplasmatischen Sequenzen der h-isoQC und GnT-IX eingehen könnten und dadurch deren Retention vermitteln. Diese *in silico*-Analyse basierte auf den Kristallstrukturen von GPP34 und VPS74 sowie einer Kombination eines Fragment-basierten Ansatzes, gefolgt von Peptid-Protein-*docking* Experimenten und deren quantitativer Auswertung (Abbildung 4-6, Anhang Abbildung 7-12). Diese erhaltenen Reste sind ebenfalls in der Sequenz von Vps74 konserviert.

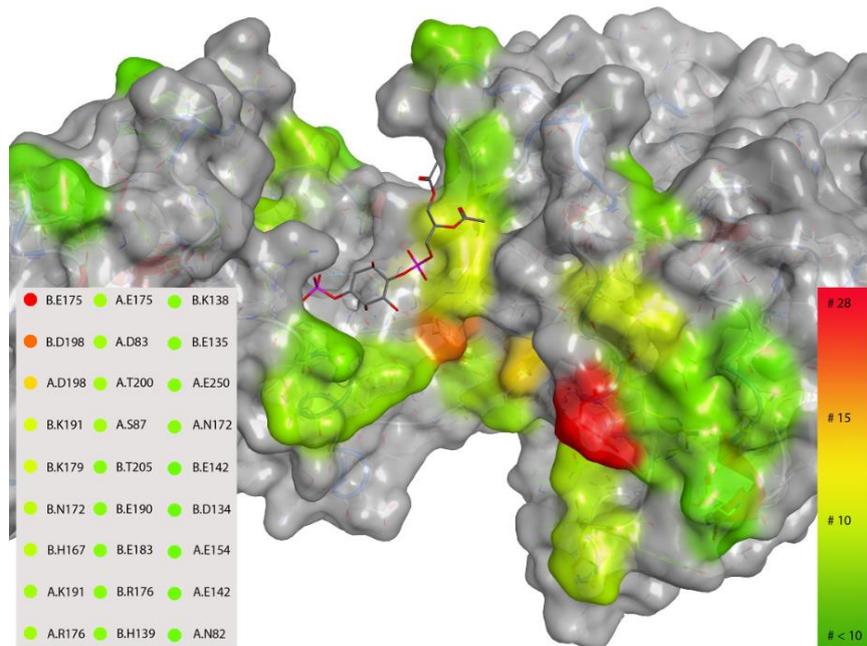


Abbildung 4-6: Schematische Darstellung der Proteinoberfläche des M-GPP34-Dim/P, farblich markiert von grün zu rot.

Dies spiegelt die Häufigkeit der Interaktion der cytoplasmatischen Sequenz der isoQC und GnT-IX wieder. Je mehr die Farbe ins Rot geht umso häufiger ergab das *docking* diese Aminosäure für eine potentielle Interaktion. Die Farbmarkierungen mit den entsprechenden Aminosäuren sind jeweils an der Seite der Abbildung dargestellt.

In nachfolgenden Untersuchungen könnten unter anderem Aminosäure-Austausche an diesen beiden Positionen im GPP34 durchgeführt werden, um den Einfluss auf die Interaktion mit der isoQC zu untersuchen. Zur Analyse des Bindungsmodus könnten Co-Kristallisationen von GPP34 mit den cytoplasmatischen Sequenzen der h-isoQC und GnT-IX erfolgen. Weiterführend könnte ebenfalls die Retention der isoQCs aus Nagern betrachtet werden. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit festgestellt werden, dass der N-Terminus in beiden Proteinen eine Rolle spielt, aber in der cytoplasmatischen Sequenz ist das GPP34-Bindemotiv nicht exakt konserviert. In der cytoplasmatischen Sequenz der m/r-isoQC ist eine Sequenz zu finden, die der Retentionssequenz ähnelt und aus den Aminosäuren L-S-K-R-R besteht. Mit Hilfe von Mutationsuntersuchungen könnte ein Einfluss dieser Sequenz auf die Golgi-Lokalisation festgestellt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass dem Protein GPP34 eine weitere Funktion, die Vermittlung der Retention von Golgi-Enzymen, zugeordnet werden kann. Der Verbleib von isoQC im Golgi könnte durch die Interaktion von GPP34 mit dem Zytoskelett vermittelt werden. Diese Ergebnisse widersprechen aber nicht den vorhergehenden Untersuchungen von ST6Gal I oder B4GalT I, da scheinbar in humanen Zellen mehr als ein Retentionsmechanismus für Golgi-Enzyme zu finden ist (Abbildung 4-7).

Eine Betrachtung von Protein-Protein-Interaktionen ist für eine Inhibitorentwicklung notwendig, da sich durch die Interaktion die Spezifität für bestimmte Inhibitoren ändern könnte. Im Fall der isoQC ist nicht davon auszugehen, da sich die GPP34-isoQC Interaktion am relativ unstrukturierten N-Terminus im Zytoplasma befindet und die katalytische Domäne C-terminal im Golgi-Apparat ist. Generell ist eine spezifische Inhibitorentwicklung für isoQC und QC durch die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation nicht von essentieller Bedeutung. So müßte ein isoQC Inhibitor erst in die Zelle bzw. den Golgi-Apparat gelangen, wohingegen der QC-Inhibitor durch die Sekretion des Proteins die Zellmembran nicht passieren muss.

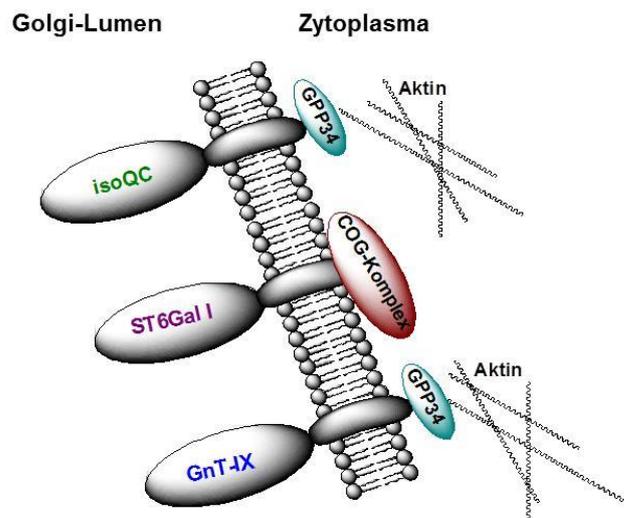


Abbildung 4-7: Schematische Darstellung verschiedener putativer Retentionsformen von Golgi-Proteinen.

Die isoQC und GnT-IX werden unter anderem durch eine Interaktion mit GPP34, welches mit dem Zytoskelet der Zelle interagiert, im Golgi zurückgehalten. Im Gegensatz dazu hat der COG-Komplex eine wichtige Funktion bei der Retention von ST6Gal I im Golgi-Apparat.

5. Zusammenfassung

Glutaminylyklasen (QCs) katalysieren die Bildung von Pyroglutamat (pGlu) aus Glutaminyl- oder Glutanyl-Resten am N-Terminus verschiedener pflanzlicher und tierischer Peptide bzw. Proteine. Einige dieser pGlu-modifizierten Peptide spielen offenbar eine entscheidende Rolle bei pathophysiologischen Prozessen. Aus diesem Grund stellen die QCs Zielenzyme der derzeitigen Wirkstoffentwicklung zur Behandlung inflammatorischer und neurodegenerativer Erkrankungen dar. Obgleich die QCs sehr gut charakterisiert wurden, ist über die Isoenzyme (isoQC) der Säuger bezüglich ihrer enzymatischen Eigenschaften und subzellulären Lokalisation noch nichts bekannt. Vor diesem Hintergrund sollten im Rahmen dieser Arbeit detaillierte Analysen der Säuger-isoQCs durchgeführt werden.

Der Vergleich der enzymatischen Charakteristika der humanen, Maus- und Ratten-isoQC zeigt für die drei Enzyme eine prinzipiell gleiche Aktivität, wobei ein breites Substratspektrum umgesetzt wird. Dabei weisen die Säuger-isoQCs die höchste Substratspezifität für Peptide mit hydrophoben Seitenketten, insbesondere in der auf das N-terminal folgenden Position, auf. Außerdem zeigten die Bestimmung des Zinkgehalts und die Reaktivierungsanalysen, dass ein Zinkatom pro isoQC-Molekül gebunden ist und dieses für die Aktivität der isoQCs essentiell ist. Aus dem Vergleich der enzymatischen Charakteristika sowie der Untersuchung von kompetitiven Inhibitoren der QCs und isoQCs lässt sich eine sehr ähnliche Substratumsetzung sowie ein ähnlicher Aufbau der katalytischen Zentren schlussfolgern, was auch mit Hilfe der Kristallstruktur der h-isoQC bestätigt wurde.

Unterschiede zwischen QC und isoQC bestehen in der subzellulären Lokalisation und der Gewebeverteilung. So stellt die isoQC im Gegensatz zur QC ein ubiquitär vorkommendes Protein dar, was anhand von Aktivitätsbestimmungen in verschiedenen Zelllinien und mittels Western-Blot-Analyse von verschiedenen Mausorganen nachgewiesen werden konnte.

Die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation von isoQC und QC beruht auf einer N-terminalen Sequenz der isoQC, dies konnte in vorangegangenen Arbeiten bereits gezeigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zudem nachgewiesen, dass die Retention der h-isoQC unter anderem durch das Protein GPP34 vermittelt wird. GPP34 erkennt ein Sequenzmotiv bestehend aus den Aminosäuren (F/L)(L/I/V)-X-X-(R/K) im N-terminalen, cytosolisch lokalisierten Bereich der isoQC. Auch andere Golgi-Proteine weisen diese Konsensussequenz auf, die erstmalig für Proteine der Hefe beschrieben wurde. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde diesbezüglich die Glykosyltransferase GnT-IX vergleichend zur isoQC untersucht. Es könnte sich somit um einen allgemeingültigen Mechanismus der Retention handeln.

Die erzielten Ergebnisse tragen zum Verständnis von Struktur und Funktion von isoQC bei. Besonders hervorzuheben ist die Identifizierung von Interaktionspartnern von isoQC, was auch aus Sicht der Wirkstoffentwicklung von Interesse sein könnte, da noch unbekannt ist, ob die Interaktion die Hemmbarkeit bzw. Aktivität des Enzyms in der Zelle beeinflusst. Die erhaltenen Erkenntnisse *in vitro* weisen darauf hin, dass eine spezifische Inhibierung von QC bzw. isoQC-Aktivität bei pathophysiologischen Prozessen aufgrund der sehr ähnlichen enzymatischen Eigenschaften und des ähnlichen strukturellen Aufbaus schwierig sein könnte. Es besteht aber ggf. hier die Möglichkeit, die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation der beiden Enzyme zu nutzen.

6. Literaturverzeichnis

Abraham, G.N. & Podell, D.N. (1981). Pyroglutamic acid. Non-metabolic formation, function in proteins and peptides, and characteristics of the enzymes effecting its removal 1. *Mol. Cell Biochem.* 38 Spec No(Pt 1), 181-90.

Ahlquist, P. (2002). RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science* 296 (5571), 1270-3. Review.

Alzheimer, A., Stelzmann, R.A., Schnitzlein, H.N., & Murtagh, F.R. (1995). An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clin. Anat.* 8, 429-431.

Awade, A.C., Cleuziat, P., Gonzales, T., & Robert-Baudouy, J. (1994). Pyrrolidone carboxyl peptidase (Pcp): an enzyme that removes pyroglutamic acid (pGlu) from pGlu-peptides and pGlu-proteins. *Proteins* 20, 34-51.

Azarkan, M., Wintjens, R., Looze, Y., & Baeyens-Volant, D. (2004). Detection of three wound-induced proteins in papaya latex. *Phytochemistry* 65, 525-534.

Bayliss, M.E. & Prescott, J.M. (1986). Modified activity of *Aeromonas* Aminopeptidase: Metal ion substitutions and role of substrates. *Biochemistry* 25, 8113-8117

Becker, A, Eichentopf, R, Sedlmeier, R, Waniek, A, Cynis, H, Koch, B, Stephan, A, Bäuscher, C, Kohlmann, S, Hoffmann, T, Kehlen, A, Berg, S, Freyse, EJ, Osmand, A, Plank, AC, Rossner, S, Hörsten, SV, Graubner, S, Demuth, HU & Schilling, S. (2015). IsoQC (QPCTL) knockout mice suggest differential substrate conversion by glutaminyl cyclase isoenzymes. *Biol Chem.* in press

Berger, E.G. & Hesford, F.J. (1985). Localization of galactosyl- and sialyltransferase by immunofluorescence: evidence for different sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 4736-4739.

Bernstein, E., Caudy, A., Hammond, S. & Hannon, G. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409 (6818), 363-6.

Bockers, T.M., Kreutz, M.R., & Pohl, T. (1995). Glutaminyl-cyclase expression in the bovine/porcine hypothalamus and pituitary. *J. Neuroendocrinol.* 7, 445-453.

Bodmer, S., Strommer, K., Frei, K., Siepl, C., de Tribolet, N., Heid, I., & Fontana, A. (1989). Immunosuppression and transforming growth factor-beta in glioblastoma. Preferential production of transforming growth factor-beta 2. *J. Immunol.* 143, 3222-3229.

Booth, R.E., Lovell, S.C., Misquitta, S.A., & Bateman, R.C., Jr. (2004). Human glutaminyl cyclase and bacterial zinc aminopeptidase share a common fold and active site. *BMC. Biol.* 2, 2.

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.

Bretscher, M.S. & Munro, S. (1993). Cholesterol and the Golgi apparatus. *Science* 261, 1280-1281.

- Buchholz, M., Heiser, U., Schilling, S., Niestroj, A.J., Zunkel, K., & Demuth, H.U. (2006). The first potent inhibitors for human glutaminyl cyclase: synthesis and structure-activity relationship. *J. Med. Chem.* 49, 664-677.
- Busby, W.H., Jr., Quackenbush, G.E., Humm, J., Youngblood, W.W., & Kizer, J.S. (1987). An enzyme(s) that converts glutaminyl-peptides into pyroglutamyl-peptides. Presence in pituitary, brain, adrenal medulla, and lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 262, 8532-8536.
- Cereghino, J.L. & Cregg, J.M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 45-66.
- Charo, I.F. & Taubman, M.B. (2004). Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ. Res.* 95, 858-866.
- Chen, C., Ma, J., Lazic, A., Backovic, M., & Colley, K.J. (2000). Formation of insoluble oligomers correlates with ST6Gal I stable localization in the golgi. *J. Biol. Chem.* 275, 13819-13826.
- Chen, Y.L., Huang, K.F., Kuo, W.C., Lo, Y.C., Lee, Y.M., & Wang, A.H. (2011). Inhibition of Glutaminyl Cyclase Attenuates Cell Migration Modulated by Monocyte Chemoattractant Proteins. *J. Biol. Chem.* 286(14):12439-49.
- Colley, K.J., Lee, E.U., & Paulson, J.C. (1992). The signal anchor and stem regions of the beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase may each act to localize the enzyme to the Golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* 267, 7784-7793.
- Crawford, P.A., Yang, K.W., Sharma, N., Bennett, B., & Crowder, M.W. (2005). Spectroscopic studies on cobalt(II)-substituted metallo-beta-lactamase ImiS from *Aeromonas veronii* bv. *sobria*. *Biochemistry* 44, 5168-5176.
- Cynis, H., Hoffmann, T., Friedrich, D., Kehlen, A., Gans, K., Kleinschmidt, M., Rahfeld, J.U., Wolf, R., Wermann, M., Stephan, A., Haegele, M., Sedlmeier, R., Graubner, S., Jagla, W., Muller, A., Eichentopf, R., Heiser, U., Seifert, F., Quax, P.H., de Vries, M.R., Hesse, I., Trautwein, D., Wollert, U., Berg, S., Freyse, E.J., Schilling, S., & Demuth, H.U. (2011). The isoenzyme of glutaminyl cyclase is an important regulator of monocyte infiltration under inflammatory conditions. *EMBO Mol. Med.* 3 (9), 545-58.
- Cynis, H., Rahfeld, J.U., Stephan, A., Kehlen, A., Koch, B., Wermann, M., Demuth, H.U., & Schilling, S. (2008a). Isolation of an Isoenzyme of Human Glutaminyl Cyclase: Retention in the Golgi Complex Suggests Involvement in the Protein Maturation Machinery. *J. Mol. Biol.* 379 (5), 966-80.
- Cynis, H., Scheel, E., Saido, T.C., Schilling, S., & Demuth, H.U. (2008b). Amyloidogenic processing of amyloid precursor protein: evidence of a pivotal role of glutaminyl cyclase in generation of pyroglutamate-modified amyloid-beta. *Biochemistry* 47, 7405-7413.
- Cynis, H., Schilling, S., Bodnar, M., Hoffmann, T., Heiser, U., Saido, T.C., & Demuth, H.U. (2006). Inhibition of glutaminyl cyclase alters pyroglutamate formation in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1764, 1618-1625.
- Dahdal, R.Y. & Colley, K.J. (1993). Specific sequences in the signal anchor of the beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase are not essential for Golgi localization. Membrane flanking sequences may specify Golgi retention. *J. Biol. Chem.* 268, 26310-26319.

- Dahl, S.W., Slaughter, C., Lauritzen, C., Bateman, R.C., Jr., Connerton, I., & Pedersen, J. (2000). Carica papaya glutamine cyclotransferase belongs to a novel plant enzyme subfamily: cloning and characterization of the recombinant enzyme. *Protein Expr. Purif.* 20, 27-36.
- de Graffenried, C.L. & Bertozzi, C.R. (2004). The roles of enzyme localisation and complex formation in glycan assembly within the Golgi apparatus. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 356-363.
- Deshmane, S.L., Kremlev, S., Amini, S., & Sawaya, B.E. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J. Interferon Cytokine Res.* 29, 313-326.
- Dippold, H.C., Ng, M.M., Farber-Katz, S.E., Lee, S.K., Kerr, M.L., Peterman, M.C., Sim, R., Wiharto, P.A., Galbraith, K.A., Madhavarapu, S., Fuchs, G.J., Meerloo, T., Farquhar, M.G., Zhou, H., & Field, S.J. (2009). GOLPH3 bridges phosphatidylinositol-4-phosphate and actomyosin to stretch and shape the Golgi to promote budding. *Cell* 139, 337-351.
- D'Souza, V.M., Bennet, B., Copik, A.J. & Holz, R.C. (2000). Divalent metal binding properties of the methionyl aminopeptidase from *Echerichia coli*. *Biochemistry* 39, 3817-3826
- El Moussaoui, A., Nijs, M., Paul, C., Wintjens, R., Vincentelli, J., Azarkan, M., & Looze, Y. (2001). Revisiting the enzymes stored in the laticifers of *Carica papaya* in the context of their possible participation in the plant defence mechanism. *Cell Mol. Life Sci.* 58, 556-570.
- Ellis, K.J. & Morrison, J.F. (1982). Buffers of constant ionic strength for studying pH-dependent processes. *Methods Enzymol.* 87, 405-426.
- Elsasser, H.P., Lehr, U., Agricola, B., & Kern, H.F. (1992). Establishment and characterisation of two cell lines with different grade of differentiation derived from one primary human pancreatic adenocarcinoma. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 61, 295-306.
- Evans, V.J. & Earle, W.R. (1947). The use of perforated cellophane for the growth of cells in tissue culture. *J. Natl. Cancer Inst.* 8, 103-119.
- Farquhar, M.G., Reid, J.J and Daniell, L.W. (1978). Intracellular transport and packaging of prolactin: a quantitative electron microscope autoradiographic study of mammothrophs dissociated from rat pituitarities. *Endocrinology* 102, 296-311.
- Fenteany, F.H. & Colley, K.J. (2005). Multiple signals are required for alpha2,6-sialyltransferase (ST6Gal I) oligomerization and Golgi localization. *J. Biol. Chem.* 280, 5423-5429.
- Fischer, W.H. & Spiess, J. (1987). Identification of a mammalian glutaminyl cyclase converting glutaminyl into pyroglutamyl peptides
1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84, 3628-3632.
- Galimberti, D., Fenoglio, C., Lovati, C., Venturelli, E., Guidi, I., Corra, B., Scalabrini, D., Clerici, F., Mariani, C., Bresolin, N., & Scarpini, E. (2006). Serum MCP-1 levels are increased in mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 27, 1763-1768.

- Garavelli, J.S., Hou, Z., Pattabiraman, N., & Stephens, R.M. (2001). The RESID Database of protein structure modifications and the NRL-3D Sequence-Structure Database. *Nucleic Acids Res.* 29, 199-201.
- Garrity, J.D., Bennet, B. & Crowder, M.W. (2005). Direct evidence that the reaction intermediate of Metallo- β -lactamase L1 is metal bound. *Biochemistry* 44, 1078-1087.
- Gherzi, G., Zhao, Q., Salamone, M., Yeh, Y., Zucker, S., & Chen, W.T. (2006). The protease complex consisting of dipeptidyl peptidase IV and seprase plays a role in the migration and invasion of human endothelial cells in collagenous matrices. *Cancer Res.* 66, 4652-4661.
- Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H., & Parks, W.P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 51, 1417-1423.
- Gill, S.C. & von Hippel, P.H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* 182, 319-326.
- Gluzman, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23, 175-182.
- Goldgaber, D., Lerman, M.I., McBride, O.W., Saffiotti, U., & Gajdusek, D.C. (1987). Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science* 235, 877-880.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., & Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36, 59-74.
- Griffiths, G., Ericsson, M., Krijnse-Locker, J., Nilsson, T., Goud, B., Soling, H.D., Tang, B.L., Wong, S.H., & Hong, W. (1994). Localization of the Lys, Asp, Glu, Leu tetrapeptide receptor to the Golgi complex and the intermediate compartment in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 127, 1557-1574.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y.C., Zaidi, M.S., & Wisniewski, H.M. (1986). Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J. Biol. Chem.* 261, 6084-6089.
- Haegele, M (2012). Physiologische Relevanz der Pyroglutamat-Bildung am N-Terminus von CCL2 und CX3CL1. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Harigaya, Y., Saido, T.C., Eckman, C.B., Prada, C.M., Shoji, M., & Younkin, S.G. (2000). Amyloid beta protein starting pyroglutamate at position 3 is a major component of the amyloid deposits in the Alzheimer's disease brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276, 422-427.
- Hemmerich, S., Paavola, C., Bloom, A., Bhakta, S., Freedman, R., Grunberger, D., Krstenansky, J., Lee, S., McCarley, D., Mulkins, M., Wong, B., Pease, J., Mizoue, L., Mirzadegan, T., Polsky, I., Thompson, K., Handel, T.M., & Jarnagin, K. (1999). Identification of residues in the monocyte chemotactic protein-1 that contact the MCP-1 receptor, CCR2. *Biochemistry* 38, 13013-13025.
- Hirokawa, T., Boon-Chieng, S., & Mitaku, S. (1998). SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics.* 14, 378-379.

- Hoiberg-Nielsen, R., Fuglsang, C.C., Arleth, L., & Westh, P. (2006). Interrelationships of glycosylation and aggregation kinetics for *Peniophora lycii* phytase 1. *Biochemistry* *45*, 5057-5066.
- Huang, K.F., Liaw, S.S., Huang, W.L., Chia, C.Y., Lo, Y.C., Chen, Y.L., & Wang, A.H. (2011). Structures of Human Golgi-resident Glutaminyl Cyclase and Its Complexes with Inhibitors Reveal a Large Loop Movement upon Inhibitor Binding. *J. Biol. Chem.* *286*, 12439-12449.
- Huang, K.F., Liu, Y.L., Cheng, W.J., Ko, T.P., & Wang, A.H. (2005a). Crystal structures of human glutaminyl cyclase, an enzyme responsible for protein N-terminal pyroglutamate formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *102*, 13117-13122.
- Huang, K.F., Liu, Y.L., & Wang, A.H. (2005b). Cloning, expression, characterization, and crystallization of a glutaminyl cyclase from human bone marrow: a single zinc metalloenzyme. *Protein Expr. Purif.* *43*, 65-72.
- Huang, K.F., Wang, Y.R., Chang, E.C., Chou, T.L., & Wang, A.H. (2008). A conserved hydrogen-bond network in the catalytic centre of animal glutaminyl cyclases is critical for catalysis. *Biochem. J.* *411*, 181-190.
- Huang, W.L., Wang, Y.R., Ko, T.P., Chia, C.Y., Huang, K.F., & Wang, A.H. (2010). Crystal structure and functional analysis of the glutaminyl cyclase from *Xanthomonas campestris*. *J. Mol. Biol.* *401*, 374-388.
- Illenberger, S., Zheng-Fischhofer, Q., Preuss, U., Stamer, K., Baumann, K., Trinczek, B., Biernat, J., Godemann, R., Mandelkow, E.M., & Mandelkow, E. (1998). The endogenous and cell cycle-dependent phosphorylation of tau protein in living cells: implications for Alzheimer's disease. *Mol. Biol. Cell* *9*, 1495-1512.
- Inamori, K., Endo, T., Gu, J., Matsuo, I., Ito, Y., Fujii, S., Iwasaki, H., Narimatsu, H., Miyoshi, E., Honke, K., & Taniguchi, N. (2004). N-Acetylglucosaminyltransferase IX acts on the GlcNAc beta 1,2-Man alpha 1-Ser/Thr moiety, forming a 2,6-branched structure in brain O-mannosyl glycan. *J. Biol. Chem.* *279*, 2337-2340.
- Inamori, K., Endo, T., Ide, Y., Fujii, S., Gu, J., Honke, K., & Taniguchi, N. (2003). Molecular cloning and characterization of human GnT-IX, a novel beta1,6-N-acetylglucosaminyltransferase that is specifically expressed in the brain. *J. Biol. Chem.* *278*, 43102-43109.
- Ishizuka, K., Kimura, T., Igata-yi, R., Katsuragi, S., Takamatsu, J., & Miyakawa, T. (1997). Identification of monocyte chemoattractant protein-1 in senile plaques and reactive microglia of Alzheimer's disease. *Psychiatry Clin. Neurosci.* *51*, 135-138.
- Jalava, A.M., Heikkila, J., Akerlind, G., Pettit, G.R., & Akerman, K.E. (1990). Effects of bryostatins 1 and 2 on morphological and functional differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Cancer Res.* *50*, 3422-3428.
- Kain, R., Angata, K., Kerjaschki, D., & Fukuda, M. (1998). Molecular cloning and expression of a novel human trans-Golgi network glycoprotein, TGN51, that contains multiple tyrosine-containing motifs. *J. Biol. Chem.* *273*, 981-988.
- Kang, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.H., Multhaup, G., Beyreuther, K., & Muller-Hill, B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* *325*, 733-736.

- Karcher, T. (2010). Untersuchung zur zellulären Lokalisation eines Isoenzym der humanen Glutaminyl-Zyklase zu anderen Typ-2- Membranproteinen. Bachelorarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Klein, W.L. (2002). Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochem. Int.* 41, 345-352.
- Klockenkämper, R. & von Bohlen, A. Total reflection X-ray fluorescence moving towards nanoanalysis: a survey. *Spectrochim Acta B* 56, 2005-2018. 2001.
- Koch, B. (2006). Isolierung und Charakterisierung homologer Proteine der humanen Glutaminyl-Cyclase aus Mensch und *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Fachhochschule Köthen
- Koch, B., Buchholz, M., Wermann, M., Heiser, U., Schilling, S. & Demuth, H-U.(2012). Probing secondary Glutaminyl Cyclase (QC) Inhibitor interactions applying an in silico-Modeling/Site –directed mutagenesis approach: Implications for Drug Development. *Chem. Biol. Drug Des.* 80(6), 937-46.
- Kyhse-Andersen, J. (1984). Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* 10, 203-209.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lau, E.K., Paavola, C.D., Johnson, Z., Gaudry, J.P., Geretti, E., Borlat, F., Kungl, A.J., Proudfoot, A.E., & Handel, T.M. (2004). Identification of the glycosaminoglycan binding site of the CC chemokine, MCP-1: implications for structure and function in vivo. *J. Biol. Chem.* 279, 22294-22305.
- Lewis, M.J. & Pelham, H.R. (1992). Ligand-induced redistribution of a human KDEL receptor from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Cell* 68, 353-364.
- Masure, S., Paemen, L., Proost, P., Van Damme, J., & Opdenakker, G. (1995). Expression of a human mutant monocyte chemotactic protein 3 in *Pichia pastoris* and characterization as an MCP-3 receptor antagonist. *J. Interferon Cytokine Res.* 15, 955-963.
- Mayo, J.G. (1972). Biologic characterization of the subcutaneously implanted Lewis lung tumor. *Cancer Chemother. Rep* 2. 3(1), 325-30.
- Meister, A. (1985). Glutamine synthetase from mammalian tissues. *Methods Enzymol.* 113, 185-199.
- Messer, M. (1963). Enzymatic cyclization of L-glutamine and L-glutaminyl peptides. *Nature* 197, 1299.
- Montecarlo, F.S. & Charo, I.F. (1997). The amino-terminal domain of CCR2 is both necessary and sufficient for high affinity binding of monocyte chemoattractant protein 1. Receptor activation by a pseudo-tethered ligand. *J. Biol. Chem.* 272, 23186-23190.
- Moremen, K.W. & Touster, O. (1985). Biosynthesis and modification of Golgi mannosidase II in HeLa and 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 260, 6654-6662.

- Morley, J.E., Farr, S.A., Banks, W.A., Johnson, S.N., Yamada, K.A., & Xu, L. (2010). A physiological role for amyloid-beta protein: enhancement of learning and memory. *J. Alzheimers. Dis.* 19, 441-449.
- Morty, R.E., Bulau, P., Pelle, R., Wilk, S., & Abe, K. (2006). Pyroglutamyl peptidase type I from *Trypanosoma brucei*: a new virulence factor from African trypanosomes that de-blocks regulatory peptides in the plasma of infected hosts. *Biochem. J.* 394, 635-645.
- Munro, S. (1995). An investigation of the role of transmembrane domains in Golgi protein retention
115. *EMBO J* 14, 4695-4704.
- Ni, W., Kitamoto, S., Ishibashi, M., Usui, M., Inoue, S., Hiasa, K., Zhao, Q., Nishida, K., Takeshita, A., & Egashira, K. (2004). Monocyte chemoattractant protein-1 is an essential inflammatory mediator in angiotensin II-induced progression of established atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 534-539.
- Nillni, E.A., Sevarino, K.A., & Jackson, I.M. (1993a). Identification of the thyrotropin-releasing hormone-prohormone and its posttranslational processing in a transfected AtT20 tumoral cell line. *Endocrinology* 132, 1260-1270.
- Nillni, E.A., Sevarino, K.A., & Jackson, I.M. (1993b). Processing of proTRH to its intermediate products occurs before the packing into secretory granules of transfected AtT20 cells. *Endocrinology* 132, 1271-1277.
- Nilsson, T., Rabouille, C., Hui, N., Watson, R., & Warren, G. (1996). The role of the membrane-spanning domain and stalk region of N-acetylglucosaminyltransferase I in retention, kin recognition and structural maintenance of the Golgi apparatus in HeLa cells. *J. Cell Sci.* 109 (Pt 7), 1975-1989.
- 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., & Bloom, G.S. (2012). Prion-like behaviour and tau-dependent cytotoxicity of pyroglutamylated amyloid-beta. *Nature* 485, 651-655.
- Oberg, K.A., Ruysschaert, J.M., Azarkan, M., Smolders, N., Zerhouni, S., Wintjens, R., Amrani, A., & Looze, Y. (1998). Papaya glutamine cyclase, a plant enzyme highly resistant to proteolysis, adopts an all-beta conformation. *Eur. J. Biochem.* 258, 214-222.
- Olmsted, J.B., Carlson, K., Klebe, R., Ruddle, F., & Rosenbaum, J. (1970). Isolation of microtubule protein from cultured mouse neuroblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 65, 129-136.
- Opat, A.S., van Vliet, C., & Gleeson, P.A. (2001). Trafficking and localisation of resident Golgi glycosylation enzymes. *Biochimie* 83, 763-773.
- Orci, L., Starnes, M., Ravazzola, M., Amherdt, M., Perrelet, A., Sollner, T.H., & Rothman, J.E. (1997). Bidirectional transport by distinct populations of COPI-coated vesicles. *Cell* 90, 335-349.
- Patrick, G.N., Zukerberg, L., Nikolic, M., de La, M.S., Dikkes, P., and Tsai, L.H. (1999). Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* 402, 615-622.

- Patterson, G.H., Hirschberg, K., Polishchuk, R.S., Gerlich, D., Phair, R.D., and Lippincott-Schwartz, J. (2008). Transport through the Golgi apparatus by rapid partitioning within a two-phase membrane system. *Cell* 133, 1055-1067
- Peanne, R., Legrand, D., Duvet, S., Mir, A.M., Matthijs, G., Rohrer, J., & Foulquier, F. (2011). Differential effects of lobe A and lobe B of the Conserved Oligomeric Golgi complex on the stability of β 1,4-galactosyltransferase 1 and α 2,6-sialyltransferase 1. *Glycobiology* 21, 864-876.
- Pohl, T., Zimmer, M., Mugele, K., & Spiess, J. (1991). Primary structure and functional expression of a glutaminy cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 88, 10059-10063.
- Pokrovskaya, I.D., Willett, R., Smith, R.D., Morelle, W., Kudlyk, T., & Lupashin, V.V. (2011). Conserved oligomeric Golgi complex specifically regulates the maintenance of Golgi glycosylation machinery. *Glycobiology* 21, 1554-1569.
- Prescott, J.M., Wagner, F.W., Holmquist, B., & Vallee, B.L. (1985). Spectral and kinetic studies of metal-substituted *Aeromonas* Aminopeptidase: Nonidentical, interacting metal-binding sites. *Biochemistry* 24, 5350-5356
- Proost, P., Struyf, S., Couvreur, M., Lenaerts, J.P., Conings, R., Menten, P., Verhaert, P., Wuyts, A., & Van Damme, J. (1998). Posttranslational modifications affect the activity of the human monocyte chemotactic proteins MCP-1 and MCP-2: identification of MCP-2(6-76) as a natural chemokine inhibitor. *J. Immunol.* 160, 4034-4041.
- Proudfoot, A.E., Handel, T.M., Johnson, Z., Lau, E.K., LiWang, P., Clark-Lewis, I., Borlat, F., Wells, T.N., & Kosco-Vilbois, M.H. (2003). Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 1885-1890.
- Ralph, P. & Nakoinz, I. (1977). Direct toxic effects of immunopotentiators on monocytic, myelomonocytic, and histiocytic or macrophage tumor cells in culture. *Cancer Res.* 37, 546-550.
- Rantapaa-Dahlqvist, S., Boman, K., Tarkowski, A., & Hallmans, G. (2007). Up regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression in anti-citrulline antibody and immunoglobulin M rheumatoid factor positive subjects precedes onset of inflammatory response and development of overt rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 66, 121-123.
- Reimann, A. (2012). Untersuchung eines mutmaßlichen Golgi-Retentionssignals der humanen Glutaminyl-Zyklase (isoQC). Bachelorarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Richter, K., Kawashima, E., Egger, R., & Kreil, G. (1984). Biosynthesis of thyrotropin releasing hormone in the skin of *Xenopus laevis*: partial sequence of the precursor deduced from cloned cDNA. *EMBO J.* 3, 617-621.
- Rodriguez-Frade, J.M., Vila-Coro, A.J., de Ana, A.M., Albar, J.P., Martinez, A., & Mellado, M. (1999). The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 induces functional responses through dimerization of its receptor CCR2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 3628-3633.
- Ruiz-Carrillo, D., Koch, B., Parthier, C., Wermann, M., Dambe, T., Buchholz, M., Ludwig, H.H., Heiser, U., Rahfeld, J.U., Stubbs, M.T., Schilling, S., & Demuth, H.U. (2011). Structures of glycosylated mammalian glutaminy cyclases reveal conformational variability near the active center. *Biochemistry* 50, 6280-6288.

- Saido, T.C., Iwatsubo, T., Mann, D.M., Shimada, H., Ihara, Y., & Kawashima, S. (1995). Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, A beta N3(pE), in senile plaques. *Neuron* *14*, 457-466.
- Saido, T.C., Yamao-Harigaya, W., Iwatsubo, T., & Kawashima, S. (1996). Amino- and carboxyl-terminal heterogeneity of beta-amyloid peptides deposited in human brain. *Neurosci. Lett.* *215*, 173-176.
- Schilling, S., Appl, T., Hoffmann, T., Cynis, H., Schulz, K., Jagla, W., Friedrich, D., Wermann, M., Buchholz, M., Heiser, U., von Horsten, S., & Demuth, H.U. (2008a). Inhibition of glutaminyl cyclase prevents pGlu-Abeta formation after intracortical/hippocampal microinjection in vivo/in situ. *J. Neurochem.* *106*, 1225-1236.
- Schilling, S., Cynis, H., von Bohlen, A., Hoffmann, T., Wermann, M., Heiser, U., Buchholz, M., Zunkel, K., & Demuth, H.U. (2005). Isolation, catalytic properties, and competitive inhibitors of the zinc-dependent murine glutaminyl cyclase. *Biochemistry* *44*, 13415-13424.
- Schilling, S., Hoffmann, T., Manhart, S., Hoffmann, M., & Demuth, H.U. (2004). Glutaminyl cyclases unfold glutamyl cyclase activity under mild acid conditions. *FEBS Lett.* *563*, 191-196.
- Schilling, S., Hoffmann, T., Rosche, F., Manhart, S., Wasternack, C., & Demuth, H.U. (2002a). Heterologous expression and characterization of human glutaminyl cyclase: evidence for a disulfide bond with importance for catalytic activity. *Biochemistry* *41*, 10849-10857.
- Schilling, S., Hoffmann, T., Wermann, M., Heiser, U., Wasternack, C., & Demuth, H.-U. (2002b). Continuous spectrometric assays for glutaminyl cyclase activity. *Anal. Biochem* *303*, 49-56.
- Schilling, S., Kohlmann, S., Bauscher, C., Sedlmeier, R., Koch, B., Eichentopf, R., Becker, A., Cynis, H., Hoffmann, T., Berg, S., Freyse, E.J., von Horsten, S., Rossner, S., Graubner, S., & Demuth, H.U. (2011). Glutaminyl Cyclase Knock-out Mice Exhibit Slight Hypothyroidism but No Hypogonadism: IMPLICATIONS FOR ENZYME FUNCTION AND DRUG DEVELOPMENT. *J. Biol. Chem.* *286*, 14199-14208.
- Schilling, S., Lauber, T., Schaupp, M., Manhart, S., Scheel, E., Bohm, G., & Demuth, H.U. (2006). On the seeding and oligomerization of pGlu-amyloid peptides (in vitro). *Biochemistry* *45*, 12393-12399.
- Schilling, S., Lindner, C., Koch, B., Wermann, M., Rahfeld, J.U., von Bohlen, A., Rudolph, T., Reuter, G., & Demuth, H.U. (2007a). Isolation and characterization of glutaminyl cyclases from *Drosophila*: evidence for enzyme forms with different subcellular localization. *Biochemistry* *46*, 10921-10930.
- Schilling, S., Manhart, S., Hoffmann, T., Ludwig, H.H., Wasternack, C., & Demuth, H.U. (2003a). Substrate specificity of glutaminyl cyclases from plants and animals. *Biol. Chem.* *384*, 1583-1592.
- Schilling, S., Niestroj, A.J., Rahfeld, J.U., Hoffmann, T., Wermann, M., Zunkel, K., Wasternack, C., & Demuth, H.U. (2003b). Identification of human glutaminyl cyclase as a metalloenzyme. Potent inhibition by imidazole derivatives and heterocyclic chelators. *J. Biol. Chem.* *278*, 49773-49779.
- Schilling, S., Stenzel, I., von Bohlen, A., Wermann, M., Schulz, K., Demuth, H.U., & Wasternack, C. (2007b). Isolation and characterization of the glutaminyl cyclases from

Solanum tuberosum and *Arabidopsis thaliana*: implications for physiological functions. *Biol. Chem.* 388, 145-153.

Schilling, S., Zeitschel, U., Hoffmann, T., Heiser, U., Francke, M., Kehlen, A., Holzer, M., Hutter-Paier, B., Prokesch, M., Windisch, M., Jagla, W., Schlenzig, D., Lindner, C., Rudolph, T., Reuter, G., Cynis, H., Montag, D., Demuth, H.U., & Rossner, S. (2008b). Glutaminyl cyclase inhibition attenuates pyroglutamate Abeta 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., & Demuth, H.U. (2009). Pyroglutamate formation influences solubility and amyloidogenicity of amyloid peptides. *Biochemistry* 48, 7072-7078.

Schlenzig, D., Ronicke, R., Cynis, H., Ludwig, H.H., Scheel, E., Reymann, K., Saido, T., Hause, G., Schilling, S., & Demuth, H.U. (2012). N-Terminal pyroglutamate formation of Abeta38 and Abeta40 enforces oligomer formation and potency to disrupt hippocampal long-term potentiation. *J. Neurochem.* 121, 774-784.

Schmitz, K.R., Liu, J., Li, S., Setty, T.G., Wood, C.S., Burd, C.G., & Ferguson, K.M. (2008). Golgi localization of glycosyltransferases requires a Vps74p oligomer. *Dev. Cell* 14, 523-534.

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

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

Soscia, S.J., Kirby, J.E., Washicosky, K.J., Tucker, S.M., Ingelsson, M., Hyman, B., Burton, M.A., Goldstein, L.E., Duong, S., Tanzi, R.E., & Moir, R.D. (2010). The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide. *PLoS One.* 5, e9505.

Stephan, A. (2007). Charakterisierung eines Isoenzym der humanen Glutaminylzyklase. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Stephan, A., Wermann, M., von Bohlen, A., Koch, B., Cynis, H., Demuth, H.U., & Schilling, S. (2009). Mammalian glutaminyl cyclases and their isoenzymes have identical enzymatic characteristics. *FEBS J.* 276 (22), 6522-36.

Tams, J.W., Vind, J., & Welinder, K.G. (1999). Adapting protein solubility by glycosylation. N-glycosylation mutants of *Coprinus cinereus* peroxidase in salt and organic solutions. *Biochim. Biophys. Acta.* 1432(2), 214-21.

Tanuma, N., Sakuma, H., Sasaki, A., & Matsumoto, Y. (2006). Chemokine expression by astrocytes plays a role in microglia/macrophage activation and subsequent neurodegeneration in secondary progressive multiple sclerosis. *Acta Neuropathol.* 112, 195-204.

Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., & Tada, K. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer* 26, 171-176.

Tu, L., Tai, W.C., Chen, L., & Banfield, D.K. (2008). Signal-mediated dynamic retention of glycosyltransferases in the Golgi. *Science* 321, 404-407.

- Tusnady, G.E. & Simon, I. (1998). Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction. *J. Mol. Biol.* 283, 489-506.
- Tusnady, G.E. & Simon, I. (2001). The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics.* 17, 849-850.
- Vaheri, A., Ruoslahti, E., Westermark, B., & Ponten, J. (1976). A common cell-type specific surface antigen in cultured human glial cells and fibroblasts: loss in malignant cells. *J. Exp. Med.* 143, 64-72.
- Van Coillie, E., Proost, P., Van Aelst, I., Struyf, S., Polfliet, M., De Meester, I., Harvey, D.J., Van Damme, J., & Opdenakker, G. (1998). Functional comparison of two human monocyte chemotactic protein-2 isoforms, role of the amino-terminal pyroglutamic acid and processing by CD26/dipeptidyl peptidase IV 39. *Biochemistry* 37, 12672-12680.
- Van Damme, J., Struyf, S., Wuyts, A., Van Coillie, E., Menten, P., Schols, D., Sozzani, S., De, M., I, & Proost, P. (1999). The role of CD26/DPP IV in chemokine processing. *Chem. Immunol.* 72, 42-56.
- Vidal, R., Frangione, B., Rostagno, A., Mead, S., Revesz, T., Plant, G., & Ghiso, J. (1999). A stop-codon mutation in the BRI gene associated with familial British dementia. *Nature* 399, 776-781.
- Voorhoeve, P.M. & Agami, R. (2003). Knockdown stands up. *Trends Biotechnol.* 21 (1): 2-4.
- Weichler, T. (2012). Biochemische und strukturelle Charakterisierung der humanen Glutaminyl-Cyclase (hQC) nach Expression in *E. coli*. Masterarbeit, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg
- Wintjens, R., Belrhali, H., Clantin, B., Azarkan, M., Bompard, C., Baeyens-Volant, D., Looze, Y., & Villeret, V. (2006). Crystal structure of papaya glutaminyl cyclase, an archetype for plant and bacterial glutaminyl cyclases. *J. Mol. Biol.* 357, 457-470.
- Wirhth, O., Breyhan, H., Cynis, H., Schilling, S., Demuth, H.U., & Bayer, T.A. (2009). Intraneuronal pyroglutamate-Abeta 3-42 triggers neurodegeneration and lethal neurological deficits in a transgenic mouse model. *Acta Neuropathol.* 118, 487-496.
- Wood, C.S., Hung, C.S., Huoh, Y.S., Mousley, C.J., Stefan, C.J., Bankaitis, V., Ferguson, K.M., & Burd, C.G. (2012). Local control of PtdIns4P signaling in the Golgi apparatus by Vps74 and Sac1 phosphoinositide phosphatase. *Mol. Biol. Cell.* 23 (13), 2527-36.
- Wu, C.C., Taylor, R.S., Lane, D.R., Ladinsky, M.S., Weisz, J.A., & Howell, K.E. (2000). GMx33: a novel family of trans-Golgi proteins identified by proteomics. *Traffic.* 1, 963-975.
- Yamada, M., Saga, Y., Shibusawa, N., Hirato, J., Murakami, M., Iwasaki, T., Hashimoto, K., Satoh, T., Wakabayashi, K., Taketo, M.M. & Mori, M. (1997). Tertiary hypothyroidism and hyperglycemia in mice with targeted disruption of the thyrotropin-releasing hormone gene. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 94, 10862-10867.
- Yamada, M., Satoh, T. & Mori M. (2003). Mice lacking the thyrotropin-releasing hormone gene: what do they tell us?. *Thyroid* 13, 1111-1121

Yoshimura, T., Robinson, E.A., Tanaka, S., Appella, E., & Leonard, E.J. (1989). Purification and amino acid analysis of two human monocyte chemoattractants produced by phytohemagglutinin-stimulated human blood mononuclear leukocytes. *J. Immunol.* 142, 1956-1962.

Zhang, Y.J., Rutledge, B.J., & Rollins, B.J. (1994). Structure/activity analysis of human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) by mutagenesis. Identification of a mutated protein that inhibits MCP-1-mediated monocyte chemotaxis. *J. Biol. Chem.* 269, 15918-15924.

Zou, K., Gong, J.S., Yanagisawa, K., & Michikawa, M. (2002). A novel function of monomeric amyloid beta-protein serving as an antioxidant molecule against metal-induced oxidative damage. *J. Neurosci.* 22, 4833-4841.

7. Anhang

Tabelle 7-1: Verwendete Oligonukleotide; die eingesetzten Primer wurden von der Firma Metabion hergestellt, die Restriktionsschnittstellen sind in Rot dargestellt.

Name	Sequenz (5'-3')	Verwendung
hisoQC E60 pPICZαA s	ATAT GAATTC GAGGAGCTGCCGCTG GGCCGG	Klonierung von h-isoQC ab E ₆₀ in Hefe Vektor
hisoQC N-HIS pPICZαA as	ATATAT GCGGCCGC CCTAGAGCCCCA GGTATTCAGC	
m-isoQC F49 His N-Term s	ATAT GAATTC CATCACCATCACCATCA CTTCTATATCGTCTGGAACAGC	Klonierung m-isoQC F ₄₉ in pPICZαA Vektor mit N- terminalem His-tag
m-isoQC His N- Term as	ATATAT GCGGCCGC CCTAGAGTCCCAG GTA CT CGGC	
m-isoQC E61 His N-Term s	ATAT GAATTC CATCACCATCACCATCA CGAGGAGATGTCACGGAGCCGG	m-isoQC E ₆₁ in pPICZαA Vektor mit N-His tag
m-isoQC E61 s	ATAT GAATTC GAGGAGATGTCACGGA GC	m-isoQC E ₆₁ in pPICZαA Vektor
m/r-isoQC I74N s	GATCTGCGGGTCCCGCTGAACGGAA GCCTTTCAGAAGCC	Mutageneseprimer zur Einführung der Glykosy- lierungsstelle in m- und r- isoQC
m/r-isoQC I74N as	GGCTTCTGAAAGGCTTCCGTT CAGCG GGACCCGCAGATC	
r-isoQC F49 His N-Term s	ATAT GAATTC CATCACCATCACCATCA CTTTTATATCGTCTGGAATAGC	Klonierung r-isoQC F ₄₉ in pPICZαA Vektor mit N- terminalem His-tag
r-isoQC F49 His N-Term as	ATATAT GCGGCCGC CCTAGAGACCCAG GTA CT CAGC	
risoQC E61 His N- Term s	ATAT GAATTC CATCACCATCACCATCA CGAGGAGGTATCACGGAGCCGG	r-isoQC E ₆₁ in pPICZαA Vektor mit N-His tag
m-isoQC Met1 EGFP pcDNA s	ATAT GAATTC ATGAGTCCCGGGAGCC GC	Klonierung m-isoQC ab Met 1 für Lokalisation
m-isoQC EGFP pcDNA as	ATAT GCGGCCGC ATGAGTCCCAGGTA CTCGGCCAG	Klonierung m-isoQ für Lokalisation
m-isoQC SS EGFP pcDNA as	ATAT GCGGCCGC ATGCTGTTCCAGAC GATATAGAAAGC	Klonierung m-isoQC ab Aminosäure 55 für Lokalisation
m/r-isoQC Met2 EGFP pcDNA s	ATAT GAATTC ATGAAACCACCCTCAC TT	Klonierung m-/r-isoQC ab Met ₂ für Lokalisation
r-isoQC Met1 EGFP pcDNA s	ATAT GAATTC ATGAGTCCGGCCAGCC GC	Klonierung r-isoQC ab Met ₁ für Lokalisation
r-isoQC EGFP pcDNA as	ATAT GCGGCCGC ATGAGACCCAGGT ACTCAGCCAG	Klonierung r-isoQC für Lokalisationsstudien
r-isoQC SS EGFP pcDNA as	ATAT GCGGCCGC ATGCTATTCCAGAC GATATAAAAAGC	Klonierung r-isoQC ab Aminosäure 55 für Lokalisation
h-isoQC Met1 EGFP pcDNA s	TATAG GGATCC ATGCGTTCCGGGGGC	Klonierung h-isoQC ab Met ₁ bis Arg ₃₂ in EGFP pcDNA Vektor für Lokalisation
h-isoQC SS EGFP pcDNA as	ATAT GCA TGC CCGCGGTAGCAGGCG	

FAP s	ATAT GGATCC ATGAAGACTTGGGTAA AAATC	Klonierung FAP ab Met ₁ bis Val ₂₅ in EGFP pcDNA Vektor
FAP TM as	ATAT GCGGCCGC ATCACAATGCACAT CACC	
ST6Gal1 s	ATAT AAGCTT ATGATTACACCAACCT G	Klonierung FAP ab Met ₁ bis Trp ₂₅ in EGFP pcDNA Vektor
ST6Gal1 TM as	TATA GCGGCCGC ATCCACACACAGAT GACTGC	
ST Cyt FAP TM	ATAT AAGCTT ATGATTACACCAACCT GAAGAAAGTAAAATCGTATTTGGAG TTGCCACC	Klonierung ST6Gal1 Cyt- FAPTM sense Primer
hisoQC Cyt s	ATAT AAGCTT ATGCGTTCCGGGGGCC GC	zur Klonierung von hisoQC Cyt vor FAP TM
hisoQC Cyt as	ATAT GCATGC CCGCGGTAGCAGGCG	
FAP TM s	ATAT GCATGC GTAAAATCGTATTTG G	zur Klonierung von FAP TM sense Primer
hiCyt F TM Mut s	CGCCGCCTGCTACCGCGGGTTCGGG TAAAATCGTATTTGG	Mutagenese der Sph I Schnittstelle im isoQC Cyt-FAP TM Konstrukt
hiCyt F TM Mut as	CCAAATACGATTTTTACCCGAACCCG CGGTAGCAGGCGGCG	
Mut VPS74 s	CGTGGCCTCATGGAGCCAGCCGCGC CGCCGGCGCGCCGCCTGCTACCGCG G	Mutagenese hisoQC Cyt - Sequenz der potentiellen GPP34 Bindestelle
Mut VPS74 as	CCGCGGTAGCAGGCGGCGCGCCGG CGGCGCGGCTGGCTCCATGAGGCCA CG	
GnT-IX s	TATA GAATTC ATGATCACCGTCAAC	Klonierung h-isoQC ab Met ₁ bis Phe ₄₅ in EGFP pcDNA Vektor für Lokalisation
GnT-IX TM as	ATATGCGGCCGCATGAACTGGCCTCC CAGAGAC	
Mu GnT-IX VPS74 s	GATAATGGTCAGAAGATGCGCGGCC ACCCTGGCGCCCTTTTCGGCTTTTTGT C	Mutagenese hisoQC Cyt - Sequenz der potentiellen GPP34 Bindestelle
Mu GnT-IX VPS74 as	GACAAAAAGCCGAAAGGGCGCCAGG GTGGCCGCGCATCTTCTGACCATTAT C	

Q-Neurotensin	QLYENKPRRPYIL
Q-GnRH	QHWSYGLRPG
Q-Fraktalkin	QHHGVTKCNI
Q- α -Amylase	QYSSNTQQGR
Q-Fibronektin	QAQQMVQPQS
Q-CRP	QTDMSRKAFV
Q-CCL7	QPVGINTSTT
Q-CCL8	QPDSVSIPIT
Q-CCL13	QPDALNVPST

Abbildung 7-1: N-terminale Aminosäuresequenzen der untersuchten physiologischen Glutaminylzyklase-Substrate

Tabelle 7-2: Kinetische Parameter der Umsetzung verschiedener Substrate durch humane, Maus und Ratten isoQC.

Die untersuchten Substrate sind im Einbuchstabencode der Aminosäuren dargestellt. Die Messungen wurden in 0,05M Tris-HCl, pH 8 bei 30°C durchgeführt. ^a Daten publiziert in A. Stephan *et al.* 2009

Substrat	isoQC _(F48;I73N;C368A) C-His		m-isoQC _(E61;I74N)		r-isoQC _(E61;I74N) N-His	
	K_M (mM) ^a	k_{cat} (s ⁻¹) ^a	K_M (mM) ^a	k_{cat} (s ⁻¹) ^a	K_M (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)
Q- β NA	0,035 \pm 0,001	3,4 \pm 0,1	0,032 \pm 0,003	17,48 \pm 0,97	0,040 \pm 0,002	18,99 \pm 0,54
Q-AMC	0,030 \pm 0,006	1,07 \pm 0,03	0,022 \pm 0,001	6,98 \pm 0,35	0,031 \pm 0,004	6,8 \pm 0,4
QQ	0,11 \pm 0,01	2,7 \pm 0,2	0,092 \pm 0,005	8,66 \pm 0,37	0,11 \pm 0,01	7,2 \pm 0,2
QE	0,61 \pm 0,06	2,6 \pm 0,2	0,47 \pm 0,04	7,79 \pm 0,44	0,63 \pm 0,02	6,1 \pm 0,2
QG	0,36 \pm 0,05	1,65 \pm 0,04	0,16 \pm 0,01	4,57 \pm 0,12	0,20 \pm 0,01	3,8 \pm 0,1
QGP	0,23 \pm 0,02	4,0 \pm 0,1	0,102 \pm 0,006	11,4 \pm 0,4	0,128 \pm 0,003	10,7 \pm 0,3
QYA	0,08 \pm 0,02	7,7 \pm 0,4	0,058 \pm 0,004	22,9 \pm 0,9	0,060 \pm 0,005	17,7 \pm 0,2
QFA	0,10 \pm 0,02	7,5 \pm 0,3	0,060 \pm 0,006	24,1 \pm 0,5	0,07 \pm 0,01	21,7 \pm 0,8
QEYF	0,040 \pm 0,004	3,3 \pm 0,1	0,029 \pm 0,003	11,78 \pm 0,61	0,031 \pm 0,002	15 \pm 1
QEDL	0,16 \pm 0,01	6,4 \pm 0,1	0,13 \pm 0,01	13,7 \pm 0,8	0,22 \pm 0,02	17,3 \pm 0,6

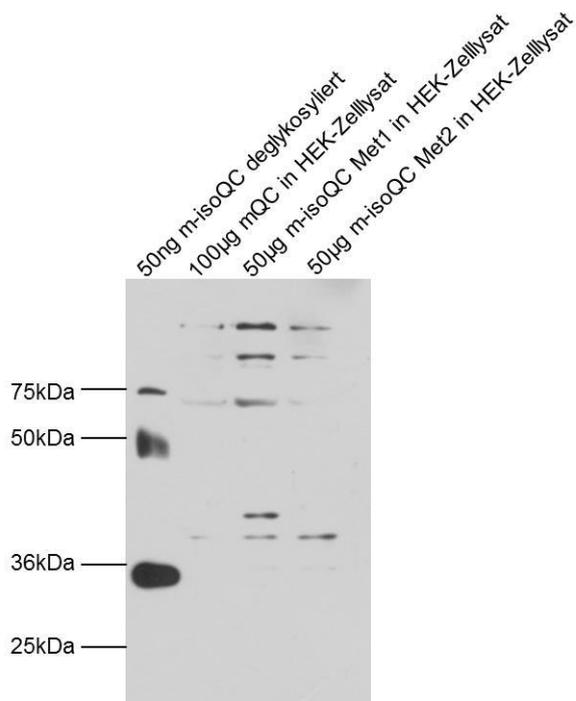


Abbildung 7-2: Untersuchung der Spezifität sowie Sensitivität der m-isoQC Antikörper 6004.

Untersuchung des m-isoQC Antikörpers 5407 mittels Western Blot von HEK293 Zelllysaten nach Transfektion mQC, m-isoQC beginnend mit Met1 oder m-isoQC beginnend mit Met2. Der Antikörper wurde 1:1000 in 5% Milchpulver verdünnt.

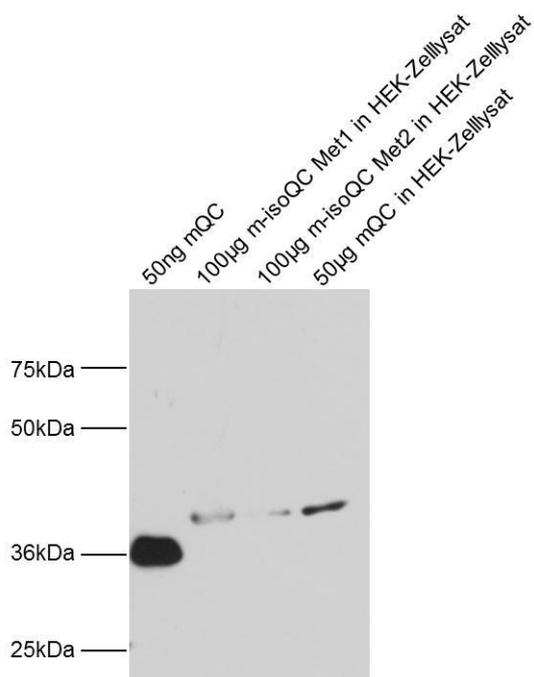


Abbildung 7-3: Untersuchung der Spezifität sowie Sensitivität der mQC Antikörper 6001.

Untersuchung des mQC Antikörpers 6001 mittels Western Blot von HEK293 Zelllysaten nach Transfektion mQC, m-isoQC beginnend mit Met1 oder m-isoQC beginnend mit Met2. Der Antikörper wurde 1:1000 in 5% Milchpulver verdünnt.

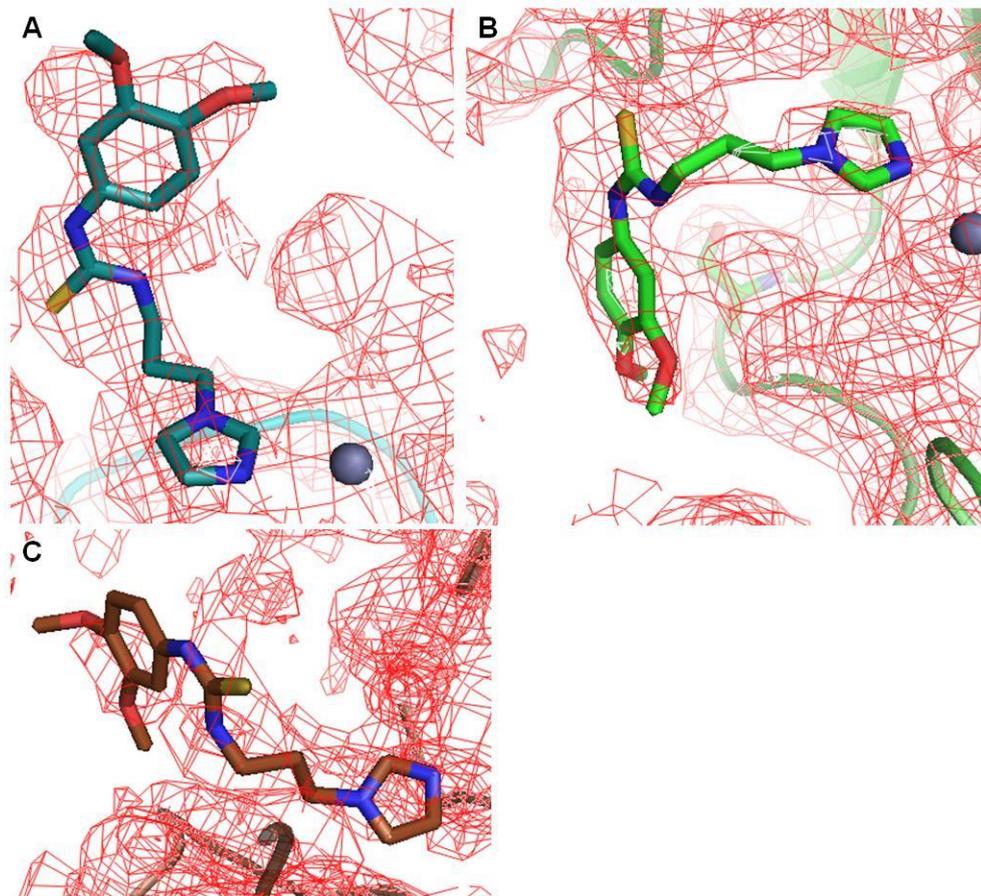


Abbildung 7-4: Darstellung des Inhibitors PQ50 mit der dazugehörigen Elektronendichte.

A) Das PQ50 in Kette B (blau) mit der entsprechenden Elektronendichte (rot) zeigt eine gute generelle Auflösung des Inhibitors.

B) Das PQ50 in Kette C (grün) mit der entsprechenden Elektronendichte (rot) zeigt eine gute generelle Auflösung des Inhibitors.

C) Das PQ50 in Kette I (braun) mit der entsprechenden Elektronendichte (rot) zeigt eine schlechte Auflösung des Inhibitors im aktiven Zentrum, der keine Rückschlüsse auf die Lage im aktiven Zentrum sowie über potentielle interagierende Aminosäuren zulässt.

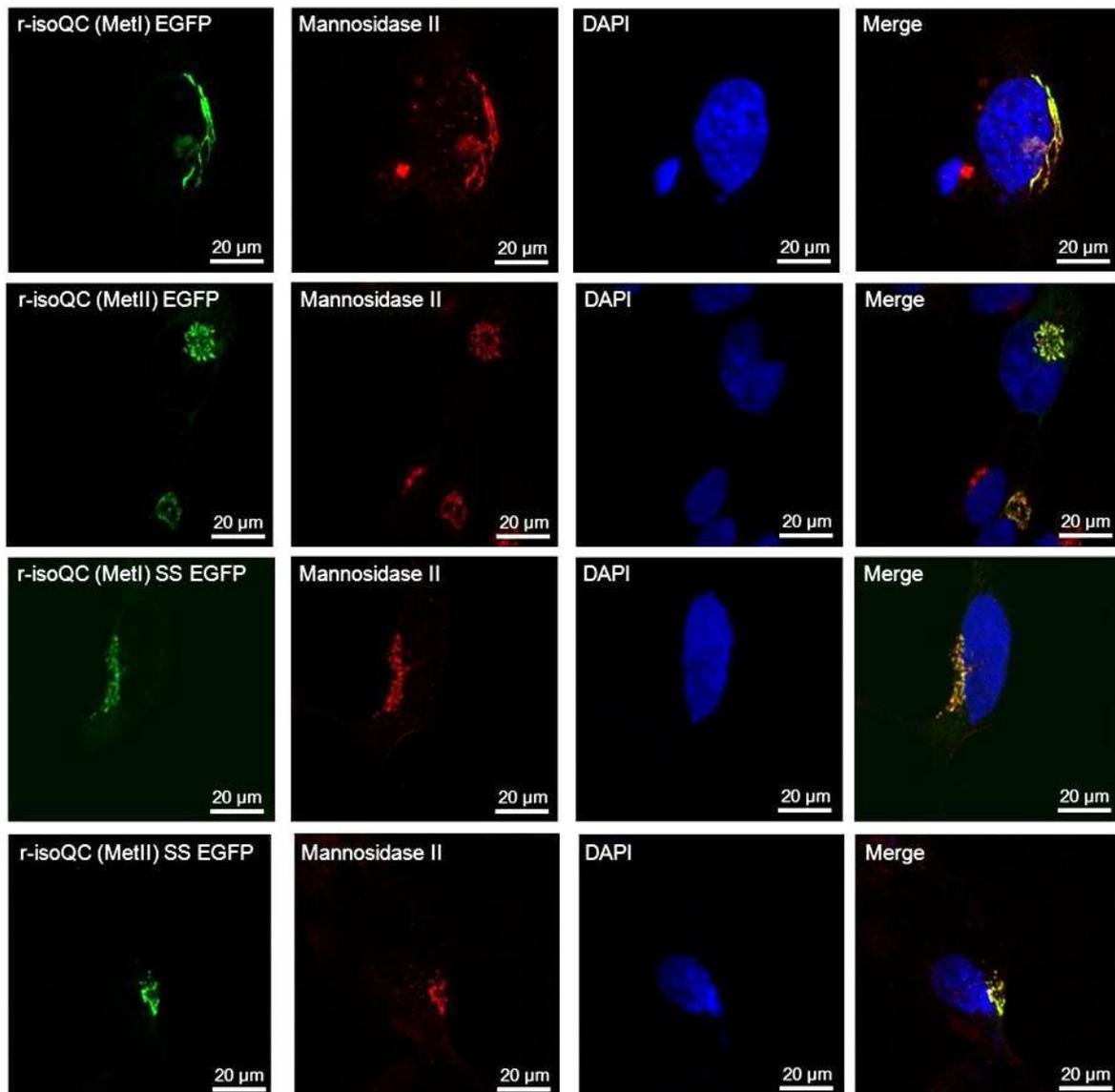


Abbildung 7-5 Untersuchung der subzellulären Lokalisation der r-isoQC.

Es wurde als Fusion mit EGFP die gesamte r-isoQC beginnend mit Methionin 1 (r-isoQC (MetI) EGFP) und beginnend mit Methionin 2 (r-isoQC (MetII) EGFP), sowie die entsprechenden N-terminalen Fragmente entweder mit Methionin 1 (r-isoQC (MetI) SS EGFP) oder mit Methionin 2 (r-isoQC (MetII) SS EGFP) exprimiert. Der Golgi wurde mittels anti-Mannosidase II Antikörper sichtbar gemacht. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mittels DAPI. Die vierte Spalte zeigt Überlagerung der EGFP, Cy³ und DAPI Fluoreszenz (Merge). Die Färbung der LN405-Zellen erfolgte etwa 24h nach Transfektion. Der Größenstandard ist angegeben in 20µm. Die Co-Lokalisation zeigt sich durch die Überlagerung der EGFP, Cy³ und DAPI Fluoreszenz (Merge) für alle exprimierten Konstrukte im Golgi-Apparat.

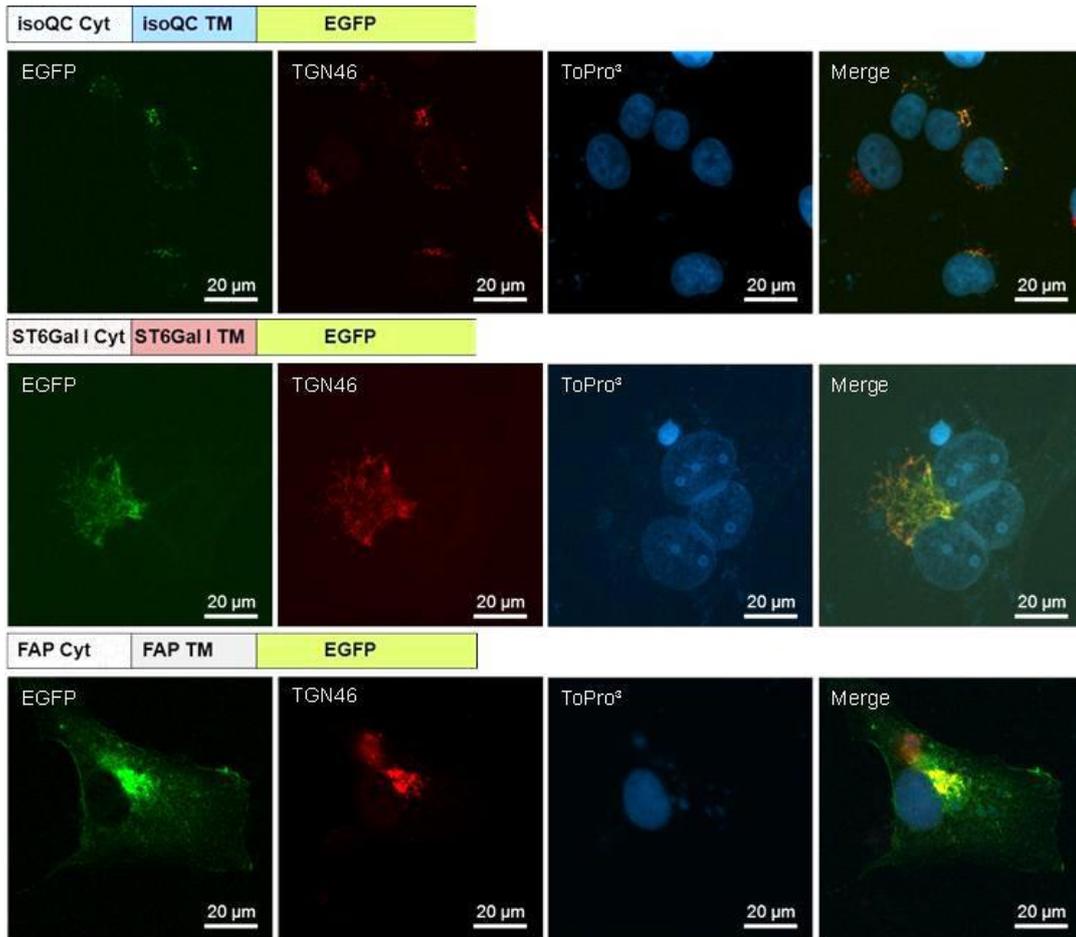


Abbildung 7-6: Subzelluläre Lokalisation von N-terminalen Fragmenten der isoQC, ST6Gal I und FAP.

GFP-Fusionen der N-terminalen Fragmente von h-isoQC (isoQC Cyt-isoQC TM EGFP), humanen ST6Gal I (ST6Gal I Cyt-ST6Gal I TM EGFP) und humanen FAP (FAP Cyt//FAP TM EGFP) wurden nach Transfektion in COS-7 Zellen untersucht. Der Golgi-Komplex wurde mit TGN46 Antikörper und anschließend Cy³-markierten sekundärem Antikörper (rot) und der Zellkern mit ToPro³ (blau) angefärbt. Die vierte Spalte zeigt die Überlagerung (Merge) der EGFP, Cy³ und ToPro³ Fluoreszenz. Die Färbung der Zellen erfolgte etwa 24h nach Transfektion. Der Größenstandart ist angegeben in 20µm. Die transfizierten Konstrukte sind schematisch über den Fluoreszenzbildern dargestellt.

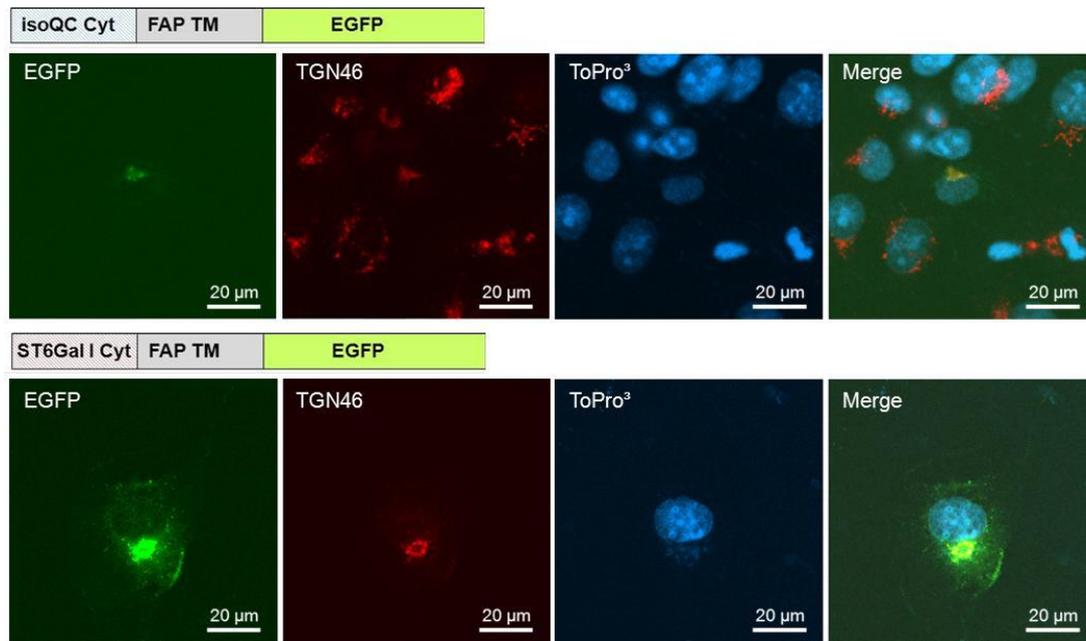


Abbildung 7-7: Subzelluläre Lokalisation der ST6Gal I- und isoQC-FAP-Chimären in COS-7-Zellen. Der Golgi Komplex wurde mit TGN46-Antikörper und anschließendem Cy³-markierten sekundär Antikörper (rot) angefärbt und der Zellkern mit ToPro³ (blau). Die Färbung erfolgte etwa 24h nach Transfektion der Zellen. Die vierte Spalte zeigt die Überlagerung (Merge) der EGFP, Cy³ und ToPro³ Fluoreszenz. Der Größenstandart ist angegeben in 20μm. Die transfizierten Konstrukte sind schematisch über den Fluoreszenzbildern dargestellt.

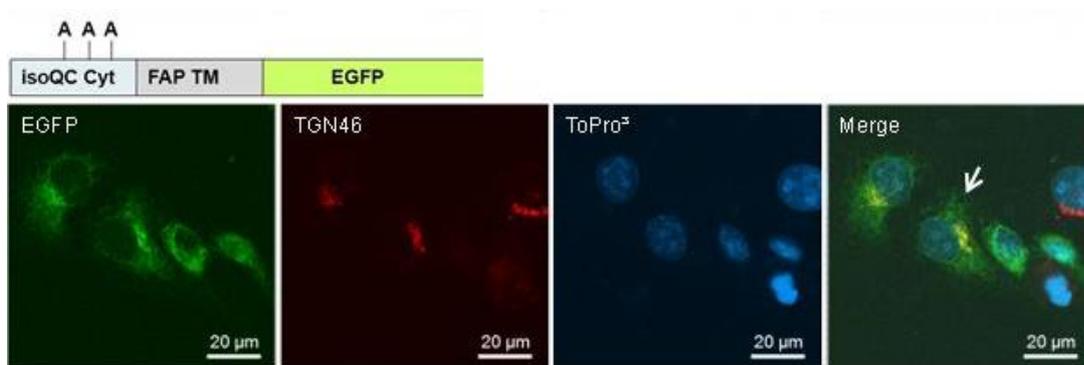


Abbildung 7-8: Subzelluläre Lokalisation der isoQC Bindungsmotivmutante (isoQC Cyt//FAPTM GPP34A EGFP) nach Transfektion in Cos-7 Zellen.

Der Golgi Komplex wurde mit TGN46 Antikörper angefärbt und der Zellkern mit ToPro³. Die vierte Spalte zeigt die Überlagerung (Merge) der EGFP, Cy³ und ToPro³ Fluoreszenz. Der Größenstandart ist angegeben in 20μm. Die transfizierten Konstrukte sind schematisch über den Fluoreszenzbildern dargestellt.

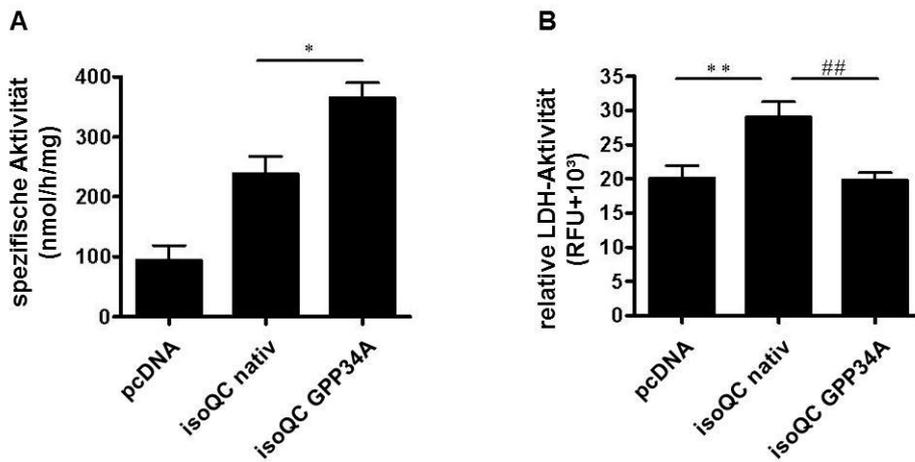


Abbildung 7-9: Untersuchung des Einflusses der Mutation des GPP34-Bindemotivs (isoQC GPP34A) auf die Lokalisation der isoQC.

A) Es erfolgte die Bestimmung der spezifischen Aktivität nach Transfektion von HEK293-Zellen mit isoQCGPP34A, isoQC nativ und pcDNA-Kontrolle im Medium. Die spezifische Aktivität ist ermittelt in units/ μ g und ergab eine signifikante Erhöhung der Aktivität im Medium nach Mutation des Bindemotivs. (* $p < 0.05$, isoQC nativ vs. isoQC GPP34A, *one way ANOVA* gefolgt von *Tukey post-hoc test*, $n=3$, mean \pm SEM).

B) Die Untersuchung der Zytotoxizität nach Transfektion der verschiedenen Konstrukte mittels der Bestimmung der Laktatdehydrogenase-Aktivität im Medium. (** $p < 0.01$, pcDNA vs. isoQC nativ und ## $p < 0.01$ isoQC nativ vs. isoQC GPP34A, *one way ANOVA* gefolgt von *Tukey post-hoc test*, $n=3$, mean \pm SEM)

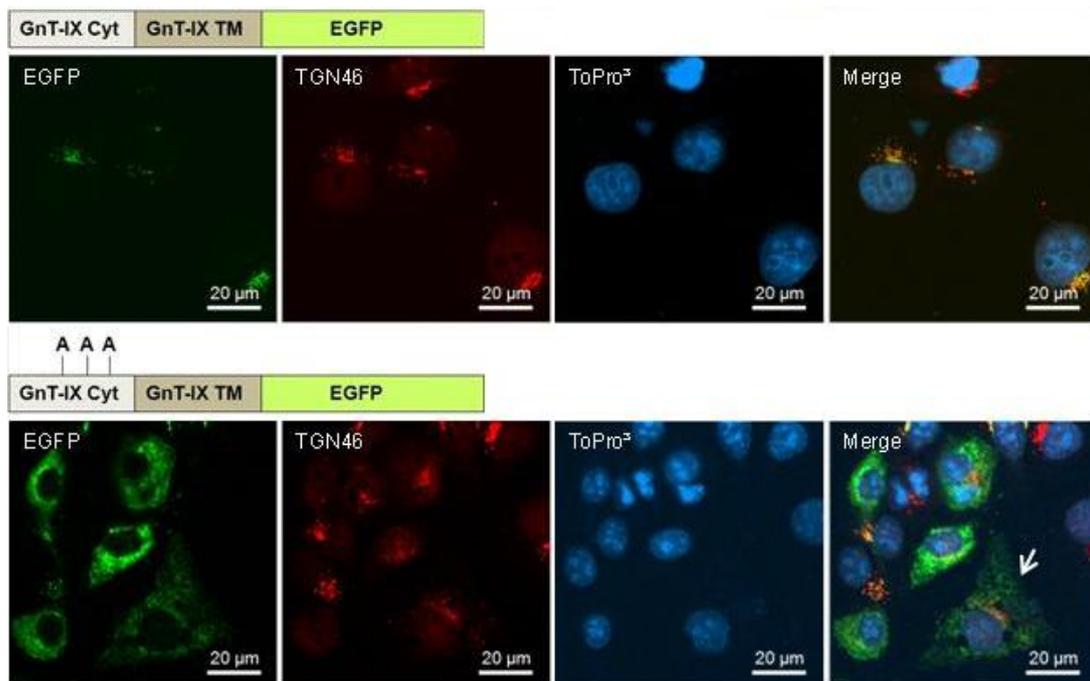


Abbildung 7-10: Subzelluläre Lokalisation des N-Terminus von GnT-IX sowie der Variante ohne potentielles GPP34-Bindemotiv.

Die GFP-Fusionen dieser N-terminalen Fragmente wurden nach Transfektion in COS-7 Zellen untersucht. Der Golgi Komplex wurde mit TGN46 Antikörper und anschließend Cy³-markiertem sekundärem Antikörper (rot) angefärbt und der Zellkern mit ToPro³ (blau). Die Färbung der Zellen erfolgte etwa 24h nach Transfektion. Die vierte Spalte zeigt die Überlagerung (Merge) der EGFP, Cy³ und ToPro³ Fluoreszenz. Der Größenstandart ist angegeben in 20 μ m. Die transfizierten Konstrukte sind schematisch über den Fluoreszenzbildern dargestellt.

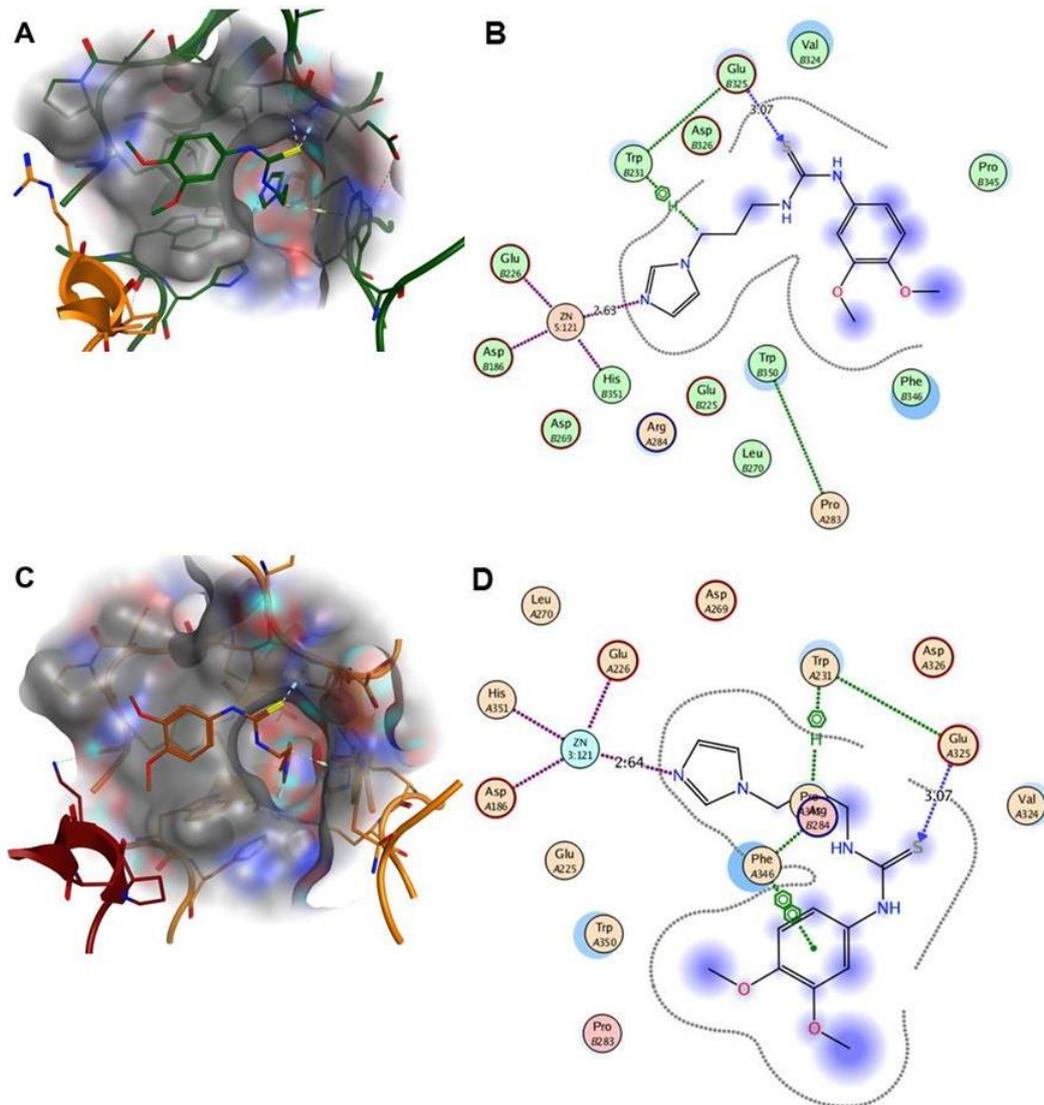


Abbildung 7-11: 3D und 2D-Darstellung der Bindung von PQ50 im aktiven Zentrum der h-isoQC von 2 Molekülen.

Bestimmung der Lage von PQ50 und Interaktionspartnern mittels MOE 2011.10 Software nach Energieminimierung. Die Erstellung der Abbildung erfolgte mit MOE 2011.10 Software

(A) 3D-Darstellung der PQ50-Bindung in Kette C in grün sowie die potentielle Interaktion der benachbarten Kette B (orange) mit Kette C;

(B) 2D-Darstellung der an der Inhibitorbindung beteiligten Aminosäuren aus Kette C (grün) und Kette B (orange);

(C) 3D-Darstellung der Lage des Inhibitors im aktiven Zentrum von Kette B (orange) sowie die potentielle Interaktion der benachbarten Kette G (rot) mit PQ50 und dem aktiven Zentrum;

(D) 2D-Darstellung der an der Inhibitorbindung beteiligten Aminosäuren aus Kette B (orange) und Kette G (rot);

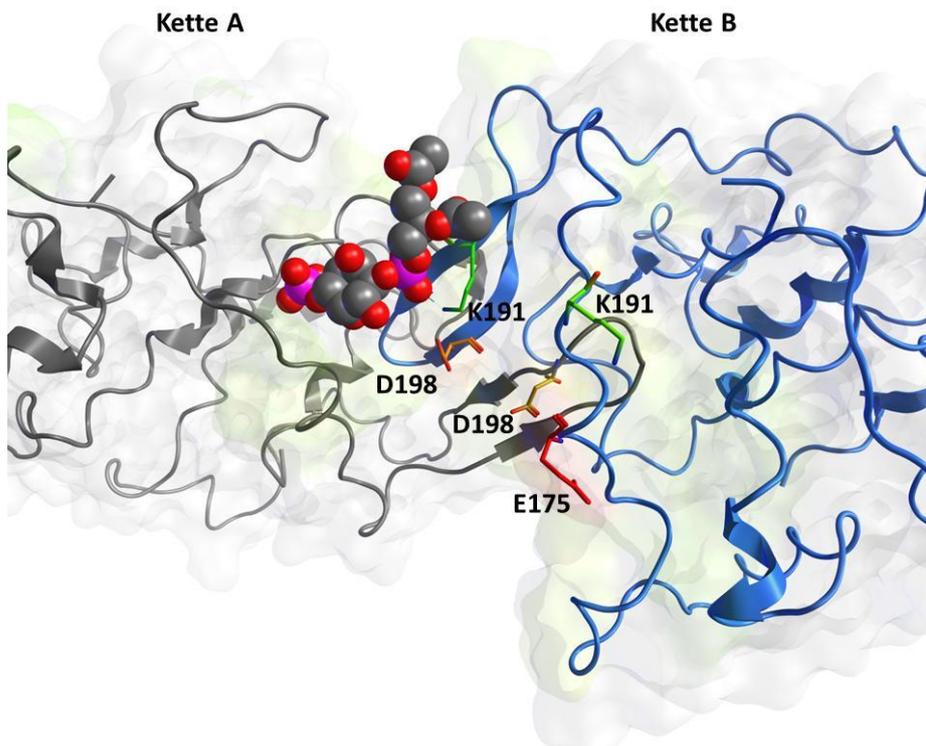


Abbildung 7-12: Alternative Darstellung des M-GPP34-Dim/P-Komplexes aus Abbildung 4-6.

Die Kette A ist in dunkel grau und die Kette B in blau und die Proteinoberfläche nur schattiert im Hintergrund dargestellt ist. Die Atome des PtdIns(4)P sind als Kugelmodell sichtbar und die colorierten Aminosäuren entsprechen den farblich sichtbar gemachten Regionen in Abbildung 4-6 dargestellt. Entsprechend des erstellten Modells und der vorhergehend publizierten Kristallstruktur von GPP34 (Wood *et al.*, 2009) ist das PtdIns(4)P in einer Tasche geformt von GPP34 gebunden. Die wahrscheinlichste Bindung der Golgi-Proteine erfolgt in der Spalte zwischen den beiden Monomere mit einer potentiellen Beteiligung von Aminosäuren beider Monomere an der Bindung.

Wissenschaftliche Publikationen

A. Becker, R. Sedlmeier, H.Cynis, B. Koch, **A. Stephan**, R. Eichentopf, C. Bäuscher, S. Kohlmann, T. Hoffmann, A. Kehlen, S. Berg, E.J. Freyse, A. Osmand, S. von Hörsten, S. Graubner, H.-U. Demuth, S. Schilling (2012). IsoQC (QPCTL) knockout mice suggest differential substrate conversion by glutaminyl cyclase isoenzymes. *Biol Chem.* in press

H. Cynis, T. Hoffmann, D. Friedrich, A. Kehlen, K. Gans, M. Kleinschmidt, J.U. Rahfeld, R. Wolf, M. Wermann, **A. Stephan**, M. Haegele, R. Sedlmeier, S. Graubner, W. Jagla, A. Müller, R. Eichentopf, U. Heiser, F. Seifert, P.H. Quax, M.R. de Vries, I. Hesse, D. Trautwein, U. Wollert, S. Berg, E.J. Freyse, S. Schilling, H.U. Demuth, (2011). The isoenzyme of glutaminyl cyclase is an important regulator of monocyte infiltration under inflammatory conditions, *EMBO Mol Med* 3, 1-14

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

H. Cynis, J-U. Rahfeld, **A. Stephan**, A. Kehlen, B. Koch, M. Wermann, H-U. Demuth and S. Schilling (2008). Isolation of an Isoenzyme of Human Glutaminyl Cyclase: Retention in the Golgi Complex Suggests Involvement in the Protein Maturation Machinery, *J. Mol. Biol.* 379, 966-980

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Stephan
Vorname: Anett
Anschrift: Carl von Ossietzky Str. 27, 06114 Halle
Akademischer Grad: Dipl. Biochemikerin
Geburtsdatum: 28.11.1981
Geburtsort: Potsdam
Geschlecht: weiblich
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung:

Fachgebiet der Promotion: Biochemie
Thema der Dissertation: Untersuchung zur Struktur und Funktion menschlicher und tierischer Glutaminyl-Zyklasen

seit 2012 wissenschaftlicher Mitarbeiter Nomad Bioscience GmbH
2010-2012 wissenschaftlicher Mitarbeiter FAU Erlangen-Nürnberg in Kooperation mit der Probiodrug AG; **Fortsetzung der Promotionsarbeit**
2008-2010 Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Probiodrug AG; **Beginn der Promotion**
2007-2008 Hilfwissenschaftliche Angestellte, Probiodrug AG, Halle
2004-2006 Hilfwissenschaftliche Angestellte, Probiodrug AG, Halle
2003-2004 Hilfwissenschaftliche Angestellte, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Fachbereich Biotechnologie
2001-2007 Studium im Fachbereich Biochemie
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Abschluss: Diplom (Note: 1,7)
Diplomarbeit: Biotechnologie/Probiodrug AG
Charakterisierung eines Isoenzym der humanen Glutaminyl Cyklase
1994-2011 Fontane Gymnasium in Rangsdorf, Abschluß: Abitur (Note: 2,9)

Halle (Saale), November 2015

Danksagung

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

Bei Herrn Prof. Dr. Milton T. Stubbs bedanke ich mich herzlich für die Bereitschaft, die Aufgabe des betreuenden Hochschullehrers zu übernehmen, sowie für seine Anregung und Unterstützung im Verlauf der Promotion.

Herrn Dr. Stephan Schilling bin ich zu großem Dank für die hervorragende Unterstützung und ständige Diskussionsbereitschaft verpflichtet. Die Motivation und vielen konstruktiven Vorschläge zu auftretenden Problemen haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Weiterhin möchte ich besonders Herrn Dr. Holger Cynis, Herrn Michael Wermann, Herrn Dr. Daniel Friedrich, Frau PD Dr. Astrid Kehlen, Herrn Dr. Mirko Buchholz und Herrn Christian Jäger für die angenehme Zusammenarbeit, stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung danken.

Mein Dank gilt weiterhin allen Mitarbeitern der Probiodrug AG, insbesondere der Arbeitsgruppe Enzymologie für die außerordentlich gute Zusammenarbeit und das unglaublich angenehme und lustige Arbeitsklima.

Herrn Dr. Ruiz Carrillo und Herrn Dr. Petr Kolenko danke ich für die gute Zusammenarbeit bei der Kristallisation der h-isoQC.

Außerdem möchte ich auch den zahlreichen Korrekturlesern Dr. Heike Berndt, Dr. Christiane Harnsich, Dr. Holger Cynis, Dr. Franziska Seifert, Antje Knöfel und natürlich Dr. Stephan Schilling danken, die wesentlich zum Entstehen der schriftlichen Abhandlung beigetragen haben.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für das in mich gesetzte Vertrauen und ihre Motivation, wodurch sie maßgeblich zur Fertigstellung der vorliegenden Arbeit beigetragen.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln verwendet habe. Textstellen, die wörtlich oder inhaltlich aus veröffentlichten Schriften entnommen wurden, sind als solche gekennzeichnet.

Hiermit erkläre ich weiterhin, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe und die Arbeit noch keiner anderen Prüfungskommission vorgelegt wurde.

Halle (Saale), 24. November 2015