

# Verstärkte Fibrillen-Fragmentierung N-terminal verkürzter, Pyroglutamat-modifizierter A $\beta$ -Peptide

Melanie Wulff, Monika Baumann, Anka Thümmler, Jay K. Yadav, Liesa Heinrich, Uwe Kniipfer, Dagmar Schlenzig, Angelika Schierhorn, Jens-Ulrich Rahfeld, Uwe Horn, Jochen Balbach, Hans-Ulrich Demuth und Marcus Fändrich\*

**Abstract:** N-terminal verkürzte, Pyroglutamat-modifizierte Varianten des A $\beta$ -Peptids sind natürlich vorkommende chemische Modifikationen bei der Alzheimerschen Krankheit. Wir zeigen hier, dass die beiden Modifikationen die Länge der Fibrillen und den Übergangsmittelpunkt der thermischen Entfaltung der Fibrillen signifikant herabsetzen. Die Peptidkonformation in den Fibrillen bleibt jedoch weitestgehend unbeeinflusst. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass der unmodifizierte N-Terminus die Fibrillen vor mechanischem Stress und Fragmentierung schützt. Sie erklärt ebenfalls die hohe Wahrscheinlichkeit von Pyroglutamat-modifiziertem Peptid, kleinere, besonders toxische Aggregate zu bilden.

Die N-terminale Verkürzung und Pyroglutamat(pE)-Modifikation von A $\beta$  bestimmen die biochemische Entwicklung und das Fortschreiten der Alzheimerschen Krankheit (AK).<sup>[1-3]</sup> Abhängig von der Analysemethode sind 10–50% des abgelagerten A $\beta$  Pyroglutamat-modifiziert.<sup>[4-6]</sup> Die pharmakologische Inhibierung der Glutaminyl-Cyclase, also des Enzyms, das die Bildung des Lactamrings katalysiert, ver-

ringert Amyloidablagerungen in vivo und verzögert den Gedächtnisverlust bei Mäusen.<sup>[1]</sup> Bisher wurden allerdings unterschiedliche Ergebnisse über die zugrundeliegenden bio-physikalischen Einflüsse dieser Modifikationen veröffentlicht. In mehreren Studien wurde eine beschleunigte Fibrillierung beobachtet,<sup>[7-10]</sup> während in anderen eine inhibitorische Wirkung,<sup>[11]</sup> eine verstärkte Bildung kleiner, zytotoxischer Oligomere<sup>[8,10,12,13]</sup> oder ein unterschiedlicher Einfluss auf A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 angegeben wird.<sup>[14]</sup>

Um den kinetischen Einfluss der N-terminalen Modifikation auf die Fibrillenbildung zu klären, wurden Thioflavin-T(ThT)-Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Diese zeigen, dass eine N-terminale Verkürzung die Fibrillenbildung beschleunigt. Der Effekt ist bei Pyroglutamat-modifiziertem Peptid noch ausgeprägter (Abbildung 1). Es wurden immer disaggregierte Peptide für die Messungen verwendet, und aufgrund der bekannten Streuung von ThT-Kinetiken wurden für jede Versuchsbedingung mindestens fünf Replikate untersucht.<sup>[15]</sup> Der beschleunigende Effekt wurde unabhängig davon beobachtet, ob die verwendeten Peptide bis Aminosäure 40 oder 42 reichten (Abbildung 1B). Die Modifikationen bewirken eine verkürzte Lag-Phase sowie eine erhöhte Wachstumsrate  $k$  (Abbildung S1 der Hintergrundinformationen). Dies bedeutet, dass sowohl die Lag-Phase als auch die Wachstumsphase der Fibrillenbildung durch die Modifikation beschleunigt werden.

Massenspektrometrie vor und nach erfolgter Disaggregation sowie der Fibrillenbildung ergaben identische Peptidmassen (Abbildung S2), sodass sich zumindest kein Anhaltspunkt dafür ergibt, dass die Ergebnisse durch pE-Ringbildung oder -öffnung beeinflusst werden. Die Bestimmung der kritischen Konzentration ermöglichte eine Messung der Änderung der Gibbs-Energie ( $\Delta G$ ) von A $\beta$ (1–40), A $\beta$ (3–40) und pEA $\beta$ (3–40) während der Aggregation zu  $(-34.7 \pm 0.2) \text{ kJ mol}^{-1}$ ,  $(-36.3 \pm 0.1) \text{ kJ mol}^{-1}$  bzw.  $(-35.9 \pm 0.3) \text{ kJ mol}^{-1}$ . Somit scheint die Aggregation der N-terminal modifizierten Peptide thermodynamisch etwas begünstigt zu sein. Die Modifikation beeinflusst also sowohl die Kinetik als auch die Thermodynamik der Fibrillierung.

Eine Analyse der Sekundärstruktur der disaggregierten Peptide mithilfe von Fern-UV-Circulardichroismus(CD)-Spektroskopie zeigt ähnliche spektrale Eigenschaften bei A $\beta$ (1–40)-, A $\beta$ (3–40)- und pEA $\beta$ (3–40)-Peptiden (Abbildung S3). Deutliche Minima der Elliptizität bei 200 nm lassen zusammen mit bereits publizierten Kernspinresonanz-Messungen<sup>[16]</sup> auf monomeres, entfaltetes Peptid schließen. Die ATR-Fourier-Transform-Infrarot(FTIR)-Spektren der Fibrillen zeigen Maxima im Bereich der Amid-I-Bande bei  $\tilde{\nu} =$

[\*] M. Wulff, Prof. Dr. M. Fändrich

Institut für Pharmazeutische Biotechnologie  
Universität Ulm  
Helmholtzstraße 8/1, 89081 Ulm (Deutschland)  
E-Mail: marcus.faendrich@uni-ulm.de

A. Thümmler  
Probiotrack AG, Biozentrum  
Halle (Saale) (Deutschland)

M. Baumann, Prof. Dr. J. Balbach  
Institut für Physik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Deutschland)

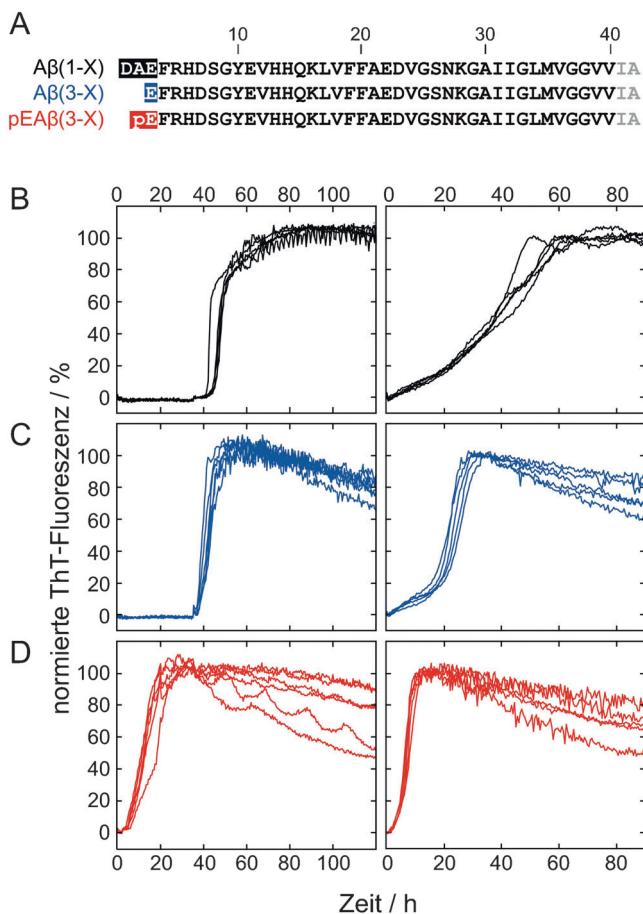
Dr. J. K. Yadav  
Department of Biotechnology, School of Life Sciences  
Central University of Rajasthan (Indien)

L. Heinrich, U. Kniipfer, Dr. U. Horn  
Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie,  
Hans-Knöll-Institut  
Jena (Deutschland)

D. Schlenzig, Dr. J.-U. Rahfeld, Prof. Dr. H.-U. Demuth  
Außenstelle Halle für Molekulare Wirkstoffbiochemie und Therapie-  
entwicklung MWT, Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immuno-  
logie IZI Leipzig, Biozentrum  
Halle (Saale) (Deutschland)

Dr. A. Schierhorn  
Serviceeinheit für Massenspektrometrie  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Halle (Saale) (Deutschland)

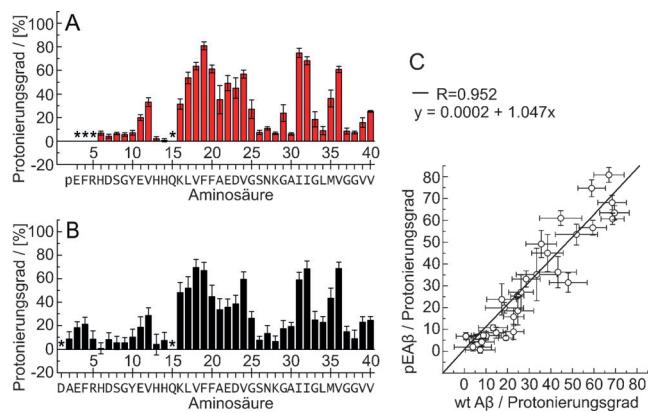
 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind unter:  
<http://dx.doi.org/10.1002/ange.201511099> zu finden.



**Abbildung 1.** N-terminale Modifikation beschleunigt die Fibrillierung von  $\text{A}\beta$ . A) Aminosäuresequenzen der untersuchten  $\text{A}\beta$ -Peptide. B–D) ThT-basierte Messungen der Aggregationskinetik von B)  $\text{A}\beta(1-X)$ , C)  $\text{A}\beta(3-X)$  und D) pEA $\beta(3-X)$  zeigen den Einfluss der N-terminalen Modifikation. Linke Spalte: Peptide, die bei Aminosäure 40 enden. Rechte Spalte: Peptide, die bei Aminosäure 42 enden ( $n=5, 6$ ). Die Aggregationskinetiken wurden bei  $37^\circ\text{C}$ ,  $50\text{ mM}$  Natriumphosphatpuffer (pH 7.4) und  $20\text{ }\mu\text{M}$   $\text{A}\beta$  aufgenommen. Farbkodierung:  $\text{A}\beta(1-X)$ : schwarz,  $\text{A}\beta(3-X)$ : blau, pEA $\beta(3-X)$ : rot.

$1630\text{ cm}^{-1}$  (Abbildung S4 A, Tabelle S1). Die Röntgenbeugungsmessung (XRD) mit vollständig hydrierten Fibrillen weist Reflexe bei ca.  $4.7$  und ca.  $10\text{ \AA}$  auf (Abbildung S4 B, Tabelle S1). Außerdem binden die Fibrillen aller Peptide an Fibrillen-spezifische Farbstoffe wie Kongorot (Abbildung S4 C,D) und ThT (Abbildung S4 E) sowie den Antikörper B10AP (Abbildung S4 F).

Im Anschluss wurde ein rekombinantes Expressionssystem für pEA $\beta(3-40)$  entwickelt, wodurch gleichförmig  $^{15}\text{N}$ -markiertes Pyroglutamat-modifiziertes  $\text{A}\beta$  hergestellt werden konnte. Dies war die Voraussetzung, um Amidprotonenaustausch (HX) mittels NMR-Spektroskopie messen zu können (Abbildung S5 A,B). Die an der Cross- $\beta$ -Konformation beteiligten Aminosäuren zeichnen sich durch verlangsamten Austausch der Amidprotonen durch Deuterium aus.<sup>[17–19]</sup> Insbesondere die Aminosäuren 17–25, 31, 32, 35 und 36 der pEA $\beta(3-40)$ -Fibrillen sind stark vor Austausch geschützt (Abbildung 2 A). Für die Aminosäuren 3–5 liegt

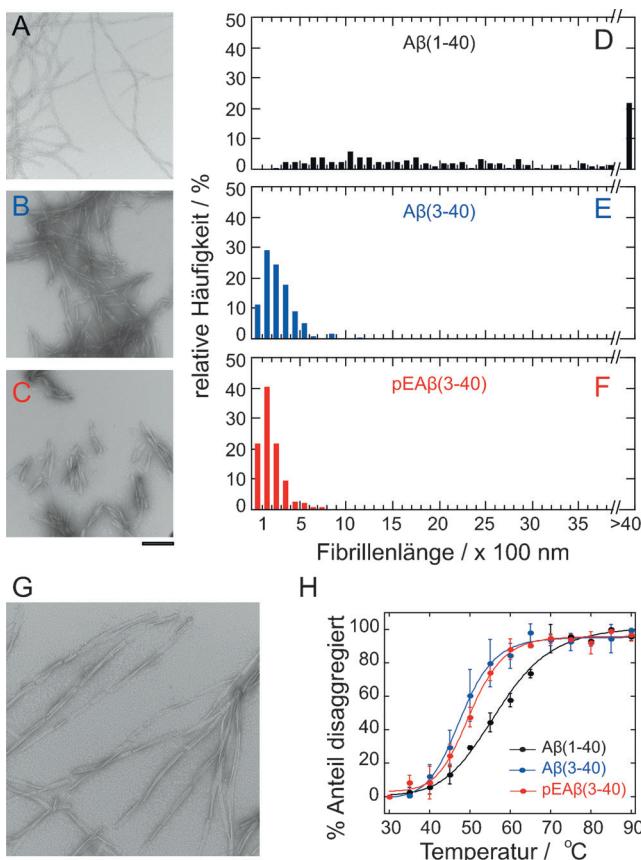


**Abbildung 2.** Protonierungsgrad nach HX-Austausch für A) pEA $\beta(3-40)$  und B)  $\text{A}\beta(1-40)$ . Aminosäuren, die nicht quantifiziert werden konnten, sind durch Sternchen gekennzeichnet. C) Korrelationsdiagramm der Protonierungsgrade. Eine lineare Regression und der  $R$ -Wert wurden durch lineare Anpassung mithilfe der Methode der kleinsten Fehlerquadrate erhalten. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung ( $n=3$ ).

mangels eindeutiger Zuordnung der NMR-Signale keine Aminosäure-spezifische Information vor.

Die vor Austausch geschützten Bereiche sind den Referenzmessungen mit  $\text{A}\beta(1-40)$  sehr ähnlich (Abbildung 2 B,C). Während die NMR-, XRD-, FTIR- und Ligandenbindungsexperimente zeigen, dass die aus modifizierten und unmodifizierten Peptiden gebildeten Fibrillen ähnliche Peptidkonformationen aufweisen, ergeben sich bei Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)-Messungen deutliche Unterschiede in der Morphologie der Fibrillen.  $\text{A}\beta(3-X)$ - und pEA $\beta(3-X)$ -Fibrillen sind signifikant kürzer als  $\text{A}\beta(1-X)$ -Filamente. Dies wurde sowohl mit verschiedenen Chargen der Peptide als auch für  $\text{A}\beta(1-40)$  und  $\text{A}\beta(1-42)$  beobachtet (Abbildungen 3 A–F und S6).

Das Versetzen von Lösungen der disaggregierten pEA $\beta(3-40)$ - oder  $\text{A}\beta(1-40)$ -Peptide mit 5% vorab gebildeten pEA $\beta(3-40)$ - oder  $\text{A}\beta(1-40)$ -Peptiden führt nicht zu einer Übertragung der Längeneigenschaften auf die Tochterfilamente und beeinflusst die Längenverteilung nur geringfügig (Abbildung S7). Disaggregiertes  $\text{A}\beta(1-40)$  bildet immer lange Filamente, während disaggregiertes pEA $\beta(3-40)$  einheitlich kurze Fibrillen ergibt. Wir schlussfolgern, dass die Längeneigenschaften der Fibrillen nicht die Gegenwart spezifischer Konformationen erfordern, die durch Seeding auf die Tochterfibrillen übertragen werden können, sondern vielmehr vom Einbau der chemisch modifizierten Peptide abhängen. Diese Schlussfolgerung wird weiter durch Experimente gestützt, bei denen die beiden Peptide in disaggregiertem Zustand gemischt wurden und die Länge der resultierenden Filamente bestimmt wurde (Abbildung S8). Während reine  $\text{A}\beta(1-40)$ -Fibrillen eine mittlere Länge von mehr als  $2.500\text{ nm}$  haben, sinkt dieser Wert auf ungefähr  $900\text{ nm}$  in der Gegenwart von 10% pEA $\beta(1-40)$ , auf weniger als  $500\text{ nm}$  mit 50% pEA $\beta$  und unter  $200\text{ nm}$  mit 100% pEA $\beta$ . Immunogoldmarkierung und TEM bestätigen die Bildung gemischter Fibrillen und zeigen die Bindung von  $\text{A}\beta(1-40)$ - und pEA $\beta(3-40)$ -spezifischen Antikörpern an dieselben Filamente (Abbildung S9).



**Abbildung 3.** Morphologie und strukturelle Stabilität von chemisch modifizierten Fibrillen. A–C) TEM-Abbildungen von A)  $\text{A}\beta(1-40)$ , B)  $\text{A}\beta(3-40)$ - und C) pEA $\beta(3-40)$ -Aggregaten. Maßstabsskala 200 nm. D–F) Histogramme der Fibrillenlängenmessung der jeweiligen TEM-Abbildungen (Klassenbreite 100 nm,  $n=200$ ). G) EM-Bild von pEA $\beta(3-40)$ -Aggregaten. Maßstabsskala 100 nm. H) Thermische Stabilität von  $\text{A}\beta$ -Fibrillen; zu sehen ist die schrittweise Disaggregation (Abnahme der molaren Elliptizität pro Aminosäure bei 220 nm) der Fibrillen mit zunehmender Temperatur ( $n=3$ ).

Fibrillen aus pEA $\beta(3-40)$  sind anfällig für Fragmentierung während der TEM-Probenpräparation, da wir häufig die Zerstörung ursprünglich viel längerer Filamente auf dem EM-Probengitter beobachten (Abbildung 3G). Für unmodifiziertes  $\text{A}\beta$  gibt es keine vergleichbaren EM-Aufnahmen. Darüber hinaus ist die Fibrillenlänge stark abhängig von der Agitationsstärke. Die Zugabe von Teflonkugeln und eine Erhöhung der Schüttelgeschwindigkeit verringern die Fibrillenlängen wirksam (Abbildung S10). Schrittweises Erhitzen führt zu sigmoidalem Verlust des für  $\beta$ -Faltblätter charakteristischen Fern-UV-CD-Signals bei 217 nm. Der Mittelpunkte der Temperaturübergänge liegen bei  $(56.6 \pm 0.8)^\circ\text{C}$  für  $\text{A}\beta(1-40)$ ,  $(48.7 \pm 0.5)^\circ\text{C}$  für  $\text{A}\beta(3-40)$  und  $(51.0 \pm 0.4)^\circ\text{C}$  für pEA $\beta(3-40)$ . Diese Daten zeigen die geringere Resistenz der modifizierten Fibrillen gegen Hitzedenaturierung oder physischen Stress im Vergleich zu unmodifizierten Fibrillen.

Aus unseren Daten ergeben sich mehrere Folgerungen. Zunächst zeigt sich, dass die pE-Modifikation die Fibrillierung einer Serie von Peptiden, die bis Aminosäure 40 oder 42 reichen, beschleunigt. Somit konnten frühere Mutmaßungen über unterschiedliche Effekte der Pyroglutamatmodifizie-

itung bei  $\text{A}\beta(1-40)$ - und  $\text{A}\beta(3-40)$ -Peptiden<sup>[14]</sup> oder über eine mögliche inhibitorische Wirkung der Modifikationen<sup>[11]</sup> nicht bestätigt werden. Die inhibitorische Aktivität wurde zunächst aufgrund von TEM-Aufnahmen angenommen, die zeigten, dass die Bildung langer Filamente durch die Modifizierung verhindert wird.<sup>[11]</sup> Dieses Resultat ist konsistent mit den hier gezeigten TEM-Aufnahmen, in denen kurze pEA $\beta$ -Fibrillen zu sehen sind (Abbildungen 3A–C und S6). Über die thermodynamischen Messungen konnte jedoch gezeigt werden, dass die molekulare Basis dieses Effekts nicht in verhinderter Aggregation/Fibrillenbildung begründet ist, sondern in verstärkter Fragmentierung der gebildeten Fibrillen sowie in erhöhter Anfälligkeit für mechanischen und thermischen Stress.

Die Fragmentierung von Fibrillen spielt eine entscheidende Rolle bei Fibrillierungskinetiken<sup>[20]</sup> und der Toxizität der Aggregate. Kleine Aggregate zeigen eine höhere spezifische Aktivität als große Aggregate,<sup>[21]</sup> und zahlreiche Publikationen belegen, dass die pathogen relevantesten Strukturen bei pEA $\beta$  besonders klein sind.<sup>[8,12,13]</sup> Der hier beschriebene Nachweis einer verstärkten Fragmentierung der Aggregate bietet eine Erklärung auf molekularer Ebene für die Neigung dieser Peptide, zytotoxische Strukturen zu bilden. Die geringere Stabilität der modifizierten Fibrillen hängt weniger von der Gegenwart eines Lactamrings ab als einfach vom Fehlen der beiden N-terminalen Aminosäuren, denn sowohl  $\text{A}\beta(3-X)$  als auch pEA $\beta(3-X)$  bilden kurze Fibrillen (Abbildungen 3 und S6). Diese Beobachtung legt zudem nahe, dass die beiden N-terminalen Reste eine Rolle bei der Stabilisierung der Fibrillen spielen (Abbildung 3H). Tatsächlich lassen frühere NMR- und Kryo-EM-Studien auf die N-terminale Stabilität in bestimmten  $\text{A}\beta$ -Aggregaten schließen,<sup>[22–24]</sup> und Festkörper-NMR-Messungen ergaben höhere Ordnungsparameter für die ersten beiden Aminosäuren von  $\text{A}\beta(1-40)$ -Fibrillen als für Aminosäure drei.<sup>[25,26]</sup> Somit hat das Peptid keinen ausgefransten, strukturell flexiblen N-Terminus; vielmehr ist dieser stattdessen an der Bildung einer stabilen Konformation beteiligt. Zudem stellt der N-Terminus mit zwei natürlich auftretenden Varianten, die in der Literatur beschrieben und biophysikalisch charakterisiert wurden,<sup>[27]</sup> einen der mutagenen Hotspots von  $\text{A}\beta$ -Peptiden dar.

Dass chemische Modifikationen in der Lage sind, die Fibrillenlänge zu beschränken, ist nicht nur relevant für das Verständnis der Effekte dieser natürlich vorkommenden Modifikation in der Ätiologie von AK, sondern beweist zu gleich, dass die Länge amyloider Strukturen durch chemische Mittel beeinflussbar ist. Diese Beobachtung könnte für die gezielte Entwicklung von Peptidaggregaten in aufstrebenden biotechnologischen Anwendungen mit Amyloid-ähnlichen Strukturen von Bedeutung sein.

### Danksagung

Die Arbeit wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (ProNet-T3) finanziert. M.F. wurde zusätzlich von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt (SFB 610 N01; FA456/12-1).

**Stichwörter:** Amyloide beta-Peptide · Kovalente Modifikationen · Neurodegenerative Erkrankungen · Proteine · Proteinfaltung

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 5081–5084  
*Angew. Chem.* **2016**, *128*, 5165–5168

- [1] S. Schilling et al., *Nat. Med.* **2008**, *14*, 1106–1111.
- [2] A. Rijal Upadhyaya, I. Kosterin, S. Kumar, C. A. F. von Arnim, H. Yamaguchi, M. Fändrich, J. Walter, D. R. Thal, *Brain* **2014**, *137*, 887–903.
- [3] D. R. Thal, J. Walter, T. C. Saido, M. Fändrich, *Acta Neuropathol.* **2015**, *129*, 167–182.
- [4] N. Sergeant, S. Bombois, A. Ghestem, H. Drobecq, V. Kostanjevicki, C. Missiaen, A. Wattez, J.-P. David, E. Vanmechelen, C. Sergheraert, A. Delacourte, *J. Neurochem.* **2003**, *85*, 1581–1591.
- [5] Y.-M. Kuo, M. R. Emmerling, A. S. Woods, R. J. Cotter, A. E. Roher, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *237*, 188–191.
- [6] Y. Horigaya, T. C. Saido, C. B. Eckman, C.-M. Prada, M. Shoji, S. G. Younkin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *276*, 422–427.
- [7] D. Schlenzig, S. Manhart, Y. Cinar, M. Kleinschmidt, G. Hause, D. Willbold, S. A. Funke, S. Schilling, H.-U. Demuth, *Biochemistry* **2009**, *48*, 7072–7078.
- [8] D. Schlenzig, R. Rönneke, H. Cynis, H.-H. Ludwig, E. Scheel, K. Reymann, T. Saido, G. Hause, S. Schilling, H.-U. Demuth, *J. Neurochem.* **2012**, *121*, 774–784.
- [9] W. He, C. J. Barrow, *Biochemistry* **1999**, *38*, 10871–10877.
- [10] S. Schilling, T. Lauber, M. Schaupp, S. Manhart, E. Scheel, G. Böhm, H.-U. Demuth, *Biochemistry* **2006**, *45*, 12393–12399.
- [11] J. O. Matos, G. Goldblatt, J. Jeon, B. Chen, S. A. Tatulian, *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 5637–5643.
- [12] O. Wirths, C. Erck, H. Marten, A. Harmeyer, C. Geumann, S. Jawhar, S. Kumar, G. Multhaup, J. Walter, M. Ingelsson et al., *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 41517–41524.
- [13] J. Nussbaum, J. Schilling, H. Cynis, A. Silva, E. Swanson, T. Wangsanut, K. Tayler, B. Wiltgen, A. Hatami, R. Rönneke, K. Reymann, B. Hutter-Paier, A. Alexandru, W. Jagla, S. Graubner, C. G. Glabe, H. U. Demuth, G. S. Bloom, *Nature* **2012**, *485*, 651–655.
- [14] C. Russo et al., *J. Neurochem.* **2002**, *82*, 1480–1489.
- [15] P. Hortschansky, V. Schroeckh, T. Christopeit, G. Zandomeneghi, M. Fändrich, *Protein Sci.* **2005**, *14*, 1753–1759.
- [16] N. Sun, R. Hartmann, J. Lecher, M. Stoldt, S. A. Funke, L. Gremer, H.-L. Ludwig, H.-U. Demuth, M. Kleinschmidt, D. Willbold, *J. Pept. Sci.* **2012**, *18*, 691–695.
- [17] N. A. Whittemore, R. Mishra, I. Kheterpal, A. D. Williams, R. Wetzel, E. H. Serpersu, *Biochemistry* **2005**, *44*, 4434–4441.
- [18] T. Lührs, C. Ritter, M. Adrian, D. Riek-Loher, B. Bohrmann, H. Döbeli, D. Schubert, R. Riek, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 17342–17347.
- [19] Y.-H. Lee, Y. Goto, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* **2012**, *1824*, 1307–1323.
- [20] T. P. J. Knowles, C. A. Waudby, G. L. Devlin, S. I. A. Cohen, A. Aguzzi, M. Vendruscolo, E. M. Terentjev, M. E. Welland, C. M. Dobson, *Science* **2009**, *326*, 1533–1537.
- [21] W.-F. Xue, A. L. Hellewell, W. S. Gosal, S. W. Homans, E. W. Hewitt, S. E. Radford, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 34272–34282.
- [22] C. Sachse, M. Fändrich, N. Grigorieff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 7462–7466.
- [23] C. Haupt, J. Leppert, R. Rönneke, J. Meinhardt, J. K. Yadav, R. Ramachandran, O. Ohlenschläger, K. G. Reymann, M. Görlach, M. Fändrich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1576–1579; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 1608–1611.
- [24] I. Bertini, L. Gonnelli, C. Luchinat, J. Mao, A. Nesi, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 16013–16022.
- [25] H. A. Scheidt, I. Morgado, S. Rothmund, D. Huster, M. Fändrich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2837–2840; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 2889–2892.
- [26] H. A. Scheidt, I. Morgado, S. Rothmund, D. Huster, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 2017–2021.
- [27] I. Benilova, R. Gallardo, A. A. Ungureanu, C. V. Castillo, A. Snellinx, M. Ramakers, C. Bartic, F. Rousseau, J. Schymkowitz, B. De Strooper, *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 30977–30989.

Eingegangen am 30. November 2015  
 Online veröffentlicht am 11. März 2016