

Untersuchungen zur Konformation und proteolytischen Stabilität von thioxylierten Oligopeptiden

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. rer. nat.

vorgelegt dem Fachbereich Biochemie / Biotechnologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Mario Jakob
geb. am 06.10.1967 in Heiligenstadt

Gutachter:

- Prof. Dr. Gunter Fischer,
Max-Planck-Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“, Halle
- Prof. Dr. H.-D. Jakubke,
Universität Leipzig, Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie
- Prof. Dr. Herbert Waldmann,
Universität Karlsruhe, Institut für Organische Chemie

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Physikalisch-Chemische Eigenschaften von Thiopeptidderivaten	9
2.1. UV/VIS und CD-spektroskopische Untersuchungen an Thiopeptiden	9
2.2. Nichtenzymatische Reaktionen von Thiopeptid-Derivaten	22
2.2.1. Reaktion der N-terminalen Aminogruppe mit Formaldehyd	22
2.2.2. Intramolekular nucleophile Reaktion der N-terminalen Aminogruppe	23
2.2.3. Hohe Basenstabilität von Peptidderivaten der Struktur R- ψ [CS-NH]-Phe-NH-Np und R-Phe- ψ [CS-NH]-Np	29
3. Untersuchungen zum Einfluß der Thioxosubstitution im Peptidrückgrat auf die proteasekatalysierte Peptidbindungshydrolyse	31
3.1. α -Chymotrypsin	35
3.1.1. Vorkommen, Eigenschaften und biologische Funktion	35
3.1.2. Bedeutung des Enzyms	35
3.1.3. Substrate und Inhibitoren	36
3.1.4. Ergebnisse der Untersuchungen	37
3.1.4.1. Hydrolyse von P ₄ , P ₃ und P ₂ -thioxylierten Tetrapeptid-4-Nitroaniliden	38
3.1.4.2. Derivate mit P ₁ -thioxylierter Peptidbindung	41
3.1.4.2.1. Hydrolyse P ₁ -thioxylierter Tetrapeptid-4-Nitroanilide (Thioxoarylamide)	41
3.1.4.2.2. P ₁ -thioxylierte Peptidderivate ohne aktivierte Abgangsgruppe	44
3.2. Subtilisin Carlsberg	47
3.2.1. Vorkommen, Eigenschaften und biologische Funktion	47
3.2.2. Bedeutung des Enzyms	47
3.2.3. Substrate und Inhibitoren	48
3.2.4. Ergebnisse der Untersuchungen	50
3.2.4.1. Hydrolyse von P ₄ , P ₃ und P ₂ -thioxylierten Tetrapeptid-4-Nitroaniliden	50
3.2.4.2. Derivate mit P ₁ -thioxylierter Peptidbindung	53
3.2.4.2.1. Hydrolyse P ₁ -thioxylierter Tetrapeptid-4-Nitroanilide (Thioxoarylamide)	53
3.2.4.3.2. P ₁ -thioxylierte Peptidderivate ohne aktivierte Abgangsgruppe	54
3.3. Prolyloligopeptidase	56
3.3.1. Vorkommen, Eigenschaften und biologische Funktion	56
3.3.2. Substrate und Inhibitoren	58
3.3.3. Ergebnisse der Untersuchungen	59
3.3.3.1. Hydrolyse von P ₃ , P ₂ und P ₁ -thioxylierten Tetrapeptid-4-Nitroaniliden	59
3.3.3.2. Derivate mit P ₁ -thioxylierter Peptidbindung	62
3.4. Dipeptidylpeptidase IV	65
3.4.1. Vorkommen, Eigenschaften und biologische Funktionen	65
3.4.2. Substrate und Inhibitoren	66
3.4.3. Ergebnisse der Untersuchungen	68

3.4.3.1.	Hydrolyse von P ₂ -thioxylierten Di- und Tripeptid-4-Nitroaniliden	68
3.4.3.2.	Derivate mit P ₁ -thioxylierter Peptidbindung	70
3.4.4.	Untersuchungen zur Inhibierung der DP IV mit zyklischen 2-Keto-5-amino-4,5-Dehydropiperazin-Derivaten	71
3.4.5.	Vergleichende Untersuchungen an der DP II	72
3.5.	Papain	74
3.5.1.	Vorkommen, Eigenschaften und biologische Funktion	74
3.5.2.	Substrate und Inhibitoren	75
3.5.4.	Ergebnisse der Untersuchungen	78
3.5.4.1.	Hydrolyse von P ₃ und P ₂ -thioxylierten Tripeptid-4-Nitroaniliden	78
3.5.4.2.	Derivate mit P ₁ -thioxylierter Peptidbindung	80
3.6.	Versuche zur proteasekatalysierten Thioxozeptidsynthese	83
3.6.1.	Kinetisch kontrollierte enzymatische Thioxozeptidsynthese	83
3.6.2.	Substitution wäßriger Puffer durch organische Lösungsmittel	87
3.7.	Thioxozeptide als potentielle Substrate einer induzierbaren Proteaseaktivität des Cyclophilins	89
4.	Zusammenfassung der Ergebnisse	91
5.	Experimenteller Teil	94
5.1.	Synthese der verwendeten Peptidderivate	94
5.2.	Allgemeine Bemerkungen	94
5.2.1	Puffer und Peptidlösungen	94
5.2.2.	Stabilitätsuntersuchungen	95
5.2.3.	Untersuchung der Hydrolyse- und Umwandlungsprodukte	95
5.2.4.	Beeinflussung der kinetischen Konstanten durch DMSO im Reaktionsansatz	95
5.3.	Messungen zu physikalisch-chemischen Eigenschaften der Thioxozeptide	96
5.4.	Enzymatische Untersuchungen	97
5.4.1.	α-Chymotrypsin	97
5.4.1.1.	Isolierung, Aufbewahrung und Aktivitätsbestimmung	97
5.4.1.2.	Puffer, Reaktionsbedingungen und Meßmethoden	97
5.4.2.	Subtilisin Carlsberg	98
5.4.2.1.	Isolierung, Aufbewahrung und Aktivitätsbestimmung	98
5.4.2.2.	Puffer, Reaktionsbedingungen und Meßmethoden	98
5.4.3.	Dipeptidylpeptidase IV	99
5.4.3.1.	Isolierung, Aufbewahrung und Aktivitätsbestimmung	99
5.4.3.2.	Puffer, Reaktionsbedingungen und Meßmethoden	99

5.4.4.	Dipeptidylpeptidase II	99
5.4.4.1.	Isolierung, Aufbewahrung und Aktivitätsbestimmung	99
5.4.4.2.	Puffer, Reaktionsbedingungen und Meßmethoden	100
5.4.5.	Prolyl oligopeptidase	100
5.4.5.1.	Isolierung, Aufbewahrung und Aktivitätsbestimmung	100
5.4.5.2.	Puffer, Reaktionsbedingungen und Meßmethoden	100
5.4.6.	Papain	101
5.4.6.1.	Isolierung, Aufbewahrung und Aktivitätsbestimmung	101
5.4.6.2.	Puffer, Reaktionsbedingungen und Meßmethoden	102
5.4.7.	Untersuchungen mit Cyclophilin und Thiopeptiden	102
5.5.	Beschreibung der allgemeinen Meß- und Analysemethoden	102
5.5.1.	Methode A - UV/VIS-spektroskopische Messung der kinetischen Konstanten	102
5.5.2.	Methode B - HPCE Messungen	104
5.5.3.	Methode C - HPLC Messungen	104
5.5.4.	Methode D - Enzymkatalysierte Synthese von Thiopeptiden	104
5.5.5.	Methode E - CD-Messungen	105
6.	Literaturverzeichnis	I - XX

Abkürzungsverzeichnis

Die verwendeten Abkürzungen für die Aminosäuren und Peptidderivate stimmen mit den Empfehlungen der IUPAC-IUB Kommission für die biochemische Nomenklatur überein. [Int. J. Peptide Prot. Res., 23 (1984) 9-39]

Ac-	Acetyl-
ACN	Acetonitril
c	Konzentration
CMK	Chlormethylketon
CD	Circulardichroismus
Cyp	Cyclophilin
d	Durchmesser, optische Weglänge
deg	degree
DMSO	Dimethylsulfoxid
DFP	Diisopropylfluorphosphat
DP II	Dipeptidylpeptidase II
DP IV	Dipeptidylpeptidase IV
DTT	Dithiothreitol
[E], [E ₀]	Enzymkonzentration, Enzymanfängskonzentration
ε	Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Et	Ethyl-
FMOc	Fluoren-9-methoxycarbonyl-
g	Gramm
G	freie Enthalpie
H	Enthalpie
HB	Wasserstoffbrückenbindung
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N`-(2-ethansulfonsäure)
HPCE	high performance capillary electrophoresis, Hochleistungskapillarelektrophorese
HPLC	high pressure liquid chromatography, Hochdruckflüssigchromatografie
HWZ	Halbwertszeit
[I], [I ₀]	Inhibitorkonzentration; Inhibitoranfängskonzentration
IC ₅₀	Inhibitorkonzentration, die eine 50%-ige Hemmung des Enzyms bewirkt
J	Joule
k	Geschwindigkeitskonstante
k _{cat}	Katalysekonstante
k _e	Geschwindigkeitskonstante der enzymkatalysierten Reaktion
k _i	Geschwindigkeitskonstante der enzymkatalysierten Reaktion in Gegenwart eines Inhibitors
K _i	Inhibitor-Konstante der enzymkatalysierten Reaktion
kJ	Kilojoule, 10 ³ Joule
K _m	Michaelis-Konstante der enzymkatalysierten Reaktion
LBHB	„low barrier hydrogen bond“
M	Molar, Mol pro Liter
MCA	Methylcoumarin
mdeg	Millidegree

Me	Methyl
ml	Milliliter, 10^{-3} Liter
μ l	Mikroliter; 10^{-6} Liter
mM	Millimolar, 10^{-3} Mol pro Liter
μ M	Mikromolar, 10^{-6} Mol pro Liter
min	Minute
mol	Mol
M_R	relatives Molekulargewicht
Nap	Naphtylamid
nm	Nanometer, 10^{-9} Meter
nM	Nanomolar, 10^{-9} Mol pro Liter
-Np	4-Nitrophenyl-Rest
P (P ₁ , P ₂ ...)	„peptide“; beschreibt des Aminosäurereste des Peptidsubstrates bzw. -inhibitors, die mit den Bindungsstellen der Protease wechselwirken
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pI	pH-Wert, bei dem die Summe aller Ladungen eines Moleküls gleich Null ist
PMSF	Phenylmethylen-sulfonylfluorid
POP	Prolyl-oligopeptidase
θ	Elliptizität
R	Rest
RP	„reversed phase“, Umkehrphase
s	Sekunde
S	Entropie
S ₁ , S ₂ ...	Sekundärbindungsstelle; beschreibt die Bindungsregion der Protease, die mit den Aminosäureresten des Peptidsubstrates bzw. -inhibitors wechselwirkt
[S], [S ₀]	Substratkonzentration, Substratanfangskonzentration
Subtilisin C.	Subtilisin Carlsberg
Suc-	Succinyl-
t	Zeit
T	Temperatur
TFA	Trifluoressigsäure
TI	tetraedrisches Intermediat
TRIS	Tris-Hydroxymethyl-aminomethan
UV	Ultraviolett
ÜZ	Übergangszustand
v	Geschwindigkeit
VIS	„visible“, sichtbar
V _{max}	Maximalgeschwindigkeit der enzymkatalysierten Reaktion
Vol.	Volumen
Xaa	symbolisiert einen variablen Aminosäurerest
ψ	kennzeichnet eine Substitution innerhalb einer Peptidsequenz
Yaa	symbolisiert einen variablen Aminosäurerest
Z-	Benzyloxycarbonyl-

1. Einleitung

Die Peptidbindung als chemisches Bindeglied zwischen den Aminosäureresten in Peptiden und Proteinen spielt eine zentrale Rolle in der Biochemie. Sie ist durch eine Reihe spezifischer Eigenschaften gekennzeichnet, wie z.B. der Coplanarität der am Stickstoffatom gebundenen Gruppen, der charakteristischen Rotationsbarriere um die C-N Bindung, der verkürzten C-N Bindungslänge und einer definierten Stabilität bezüglich nucleophilem Angriff und Hydrolyse (Lauvergnat & Hiberty, 1997). Diese Eigenschaften beruhen weitgehend auf der Amidbindungsresonanz, die aus der Delokalisation des freien Elektronenpaares am Stickstoff über das gesamte CNO- π -Elektronensystem resultiert, und die durch eine Reihe von Resonanzstrukturen dargestellt werden kann (vgl. Abb.1). Neben den klassischen Formen 1 und 2 wurden, basierend auf Valenzbindungsberechnungen, weitere Resonanzstrukturen (vgl. 3 und 4 in Abb.1) beschrieben.

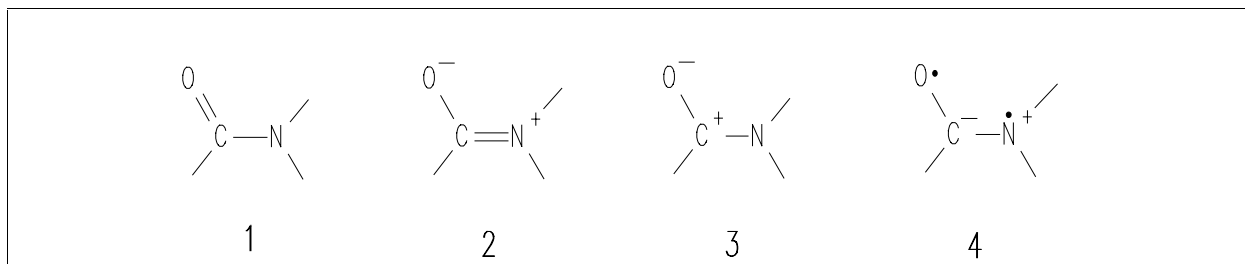


Abb.1: Resonanzformen der Peptidbindung nach (Lauvergnat & Hiberty, 1997).

Neben der kovalenten Verknüpfung der Aminosäurereste einer Peptidkette durch die Peptidbindung fungiert diese auch als Donor bzw. Akzeptor von Wasserstoffbrückenbindungen (im Folgenden: HB), und ist somit maßgeblich an der Ausbildung und Stabilisierung dreidimensionaler Peptidstrukturen beteiligt. Die Modifizierung der Peptidbindung, z.B. durch Austausch des Carbonylsauerstoffes durch ein Schwefelatom, verändert deren chemische Eigenschaften, und erlaubt somit Untersuchungen zu Struktur-Funktions-Wechselwirkungen. Eine derartige Substitution, im Folgenden als Thioxylierung bezeichnet, führt zur Bildung von Thioxozeptiden, die modifizierten Peptidbindungen werden analog als Thioxozeptidbindungen bezeichnet. Der Vorteil der Thioxylierung besteht darin, daß es sich hier um eine weitgehend isostere Ein-Atom-Substitution direkt im Peptidrückgrad handelt, die Auswirkungen auf die physikalisch-chemischen Eigenschaften der modifizierten Peptidbindung hat, und, in Fortsetzung dessen, auch ein verändertes Verhalten im biologischen System erwarten läßt.

Thioxozeptidbindungen nehmen, wie gewöhnliche Peptidbindungen auch, eine Z-planare Konformation ein (Bardi et al., 1988; Kajtar et al., 1986; Hollosi et al., 1988), jedoch ist die C=S Bindung mit einer Bindungslänge von 1.64 Angström im Vergleich zur C=O Bindung

um 0.4 Angström gestreckt (Bardi et al., 1988). Wegen des größeren kovalenten (Walter & Voss, 1970) und van der Waals Radius (Biondi; 1964) des Schwefelatoms sind die erlaubten ϕ und ψ Winkel in der Nachbarschaft des Thioxocarbonyls stärker limitiert (La Cour; 1987). Thiopeptide zeigen veränderte Eigenschaften bei der Ausprägung von HB. Einerseits sind sie stärkere Säuren (Dudeck & Dudeck, 1967), und somit bessere Donoren für HB, andererseits ist die verminderte Basizität des Schwefels für schlechtere Akzeptoreigenschaften verantwortlich (Abboud et al., 1988, 1993; Laurence et al., 1995).

Die Beschreibung der elektronischen Eigenschaften der Peptidbindung und deren Vergleich mit den Charakteristika der Thiopeptidbindung ist schwierig, da die Elektronenverteilung innerhalb dieser Bindungen durch verschiedene Faktoren beeinflusst wird, die bei den Oxo- und Thioformen entsprechender Derivate unterschiedlich stark ausgeprägt sind und sich in ihrer Wirkung überlagern. Diese Faktoren beruhen einerseits auf den Unterschieden der Elektronegativitätswerte zwischen dem Carbonylkohlenstoff und dessen Substituenten, die durch Ladungstransfer mehr oder minder kompensiert werden, und zu Differenzen hinsichtlich Basizität, Nucleophilie und Stärke elektrostatischer Wechselwirkungen einzelner Komponenten führen. Andererseits sind Resonanzeffekte zwischen dem freien Elektronenpaar des Substituenten und den π -Elektronen der Carbonylfunktion an der Stabilisierung der Peptidbindung beteiligt.

Wenngleich das Resonanzmodell von der Mehrzahl der Autoren als das geeignetste betrachtet wird, gibt es auch alternative Modelle zur Erklärung der elektronischen Eigenschaften und des daraus resultierenden chemischen Verhaltens von Oxo- und Thiopeptiden. Konträr zum Resonanzmodell stehen Ergebnisse theoretischer Berechnungen (Wiberg & Breneman, 1992; Laidig & Cameron, 1996), die eine höhere Elektronendichte (geringere Delokalisation) am Stickstoff in der planaren als in der tetraedrischen Form zum Ergebnis haben, und die erhöhte Rotationsbarriere (von 66.1 kJ/mol im Formamid auf 85.9 kJ/mol im Thioformamid) über einen größeren ionischen Charakter der planaren C-N Bindung erklären. Deren Bindungslänge verringert sich in der planaren Konformation und die Bindungsstärke nimmt zu (Prasad et al., 1997). Diese Berechnungen beruhen auf einer Theorie, die eine Überlagerung von π -Effekten (Konjugation) und σ -Effekten (Polarisation) beschreibt, wobei deren Einflüsse in Abhängigkeit vom Substituenten und der untersuchten Konformation verschieden sind. So wird, diesem Modell folgend, im planaren Thioformamid mehr Ladung vom Stickstoff auf den Schwefel (und bei Rotation der C-N Bindung wieder zurück) transferiert als im Formamid vom Stickstoff auf den Sauerstoff, dessen Ladungsdichte sich bei Rotation der Amidgruppe kaum ändert (Wiberg & Rablen, 1995; Ou et al., 1994).

Nach (Abboud et al., 1993) sind Thioxocarbonyl-Derivate im Allgemeinen stärkere Basen als entsprechende Carbonyl-Derivate, wie an Hand von FTICR-spektroskopischen Messungen

und *ab initio* Berechnungen der Gasphasen-Basizitäten für Thioformaldehyd und Formaldehyd gezeigt werden konnte. Als Ursache dafür wird die höhere Polarisierbarkeit des Schwefels angesehen, die dessen geringere Elektronegativität gegenüber dem Sauerstoff überkompensieren kann. Hingegen verläuft die Basizitätserhöhung durch Substituenteneinflüsse in Carbonylverbindungen effektiver als in Thioxocarbonylverbindungen, weshalb der Schwefel der Thiopeptidbindung letztlich weniger basisch ist als der Sauerstoff der gewöhnlichen Peptidbindung. Ursachen für diesen Effekt sind einerseits die größere Energiedifferenz zwischen dem Orbital des freien Elektronenpaares des Stickstoffes und dem C=S- π -Orbital, verglichen zur Energiedifferenz zwischen dem freien Elektronenpaar des Stickstoffes und dem C=O- π -Orbital, andererseits die, durch die Elektronegativität des Stickstoffes bedingte, erhöhte Polarität der C ^{$\delta+$} -O ^{$\delta-$} und C ^{$\delta+$} -S ^{$\delta-$} Bindungen, die bei Carbonylverbindungen bereits im unsubstituierten Zustand vorhanden und nach der Substitution stärker ausgeprägt ist als bei entsprechenden Thioxocarbonylverbindungen (Abboud et al., 1993). Nach anderen, auf dem Resonanzmodell aufbauenden Befunden ist das Dipolmoment der Thioxocarbonylgruppe jedoch höher als das der Carbonylgruppe (Lumbrosco et al., 1998; Glendening & Hrabal, 1997). Trotz der geringeren Elektronegativität des Schwefels akkumuliert dieser in stärkerem Maße negative Ladung als Sauerstoff, was auf die bessere Polarisierbarkeit des Schwefelatoms zurückgeführt wird.

Ab initio Valenzbindungsberechnungen sowohl für die planare als auch für die um 90° gedrehte Konformation des Formamids bzw. Thioformamids zeigen jedoch eindeutig, daß die Resonanz zwischen den π -Elektronen der Carbonylgruppe und dem einsamen Elektronenpaar des Amidstickstoffs ein charakteristisches Merkmal der elektronischen Struktur der Amide und Thioamide ist (Lauvergnat & Hiberty, 1997). Die für die Rotation um die C-N Bindung benötigte Energie resultiert neben der Konjugation auch aus anderen Wechselwirkungseffekten, die letztlich auf der bevorzugten Orientierung des freien Elektronenpaares am Stickstoffatom senkrecht zur Molekülebene beruhen. Während die Resonanzstabilisierung beim Formamid ca. 50% des Energiebetrages der Rotationsbarriere ausmacht, sind es beim Thioformamid ca. $\frac{2}{3}$. Die höhere Rotationsbarriere um die C-N Bindung im Thioformamid beruht somit auf dem größeren Einfluß von Konjugationseffekten (Lauvergnat & Hiberty, 1997).

Unabhängig vom betrachteten Modell kann allgemein gesagt werden, daß die Ladungsverschiebung im Formamid vorwiegend zwischen dem Stickstoff und dem Carbonylkohlenstoff stattfindet, was durch die Resonanzstrukturen 1 bis 3 in Abb.1 dargestellt werden kann, hingegen wird der Ladungstransfer zwischen Stickstoff und Schwefel im Thioformamid allein durch die Resonanzstrukturen 1 und 2 (vgl. Abb.1) hinreichend beschrieben (Wiberg & Rablen, 1995; Lauvergnat & Hiberty, 1997).

Der erste Teil der Arbeit befaßt sich mit Untersuchungen zu den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Thiopeptidbindung, die aus deren spezifischen elektronischen Eigenschaften resultieren.

Ein Kapitel widmet sich Untersuchungen zu Konformationsänderungen an Thiopeptiden, und deren Verfolgung mittels spektroskopischer Methoden, basierend auf den spezifischen spektroskopischen Eigenschaften von Thiopeptidbindungen, die eine charakteristische Bande im Bereich von 260 - 280 nm im UV/VIS und CD-Spektrum liefern.

Aus der Literatur ist bekannt, daß die Thioxylierung von Peptiden gute Möglichkeiten zur Untersuchung von Zusammenhängen zwischen Konformation und biologischer Aktivität eröffnet (Angyal et al., 1985; Michel et al., 1990; Seebach et al., 1991; Lankiewicz et al., 1992; Hitotsuyanagi et al., 1996; Morita et al., 1995a,b, 1997). Eine Substitution des Sauerstoffes einer Peptidbindung durch Schwefel kann auch dann die Konformation des betreffenden Peptids ändern, wenn der substituierte Sauerstoff in der nativen Konformation nicht an der Ausprägung von HB beteiligt war. (Kessler et al., 1992).

In den hier durchgeführten Messungen wurde untersucht, inwiefern UV/VIS- und CD-Messungen im Absorptionsbereich des Thioxoamid-Chromophors zur Verfolgung dynamischer Prozesse, wie z.B. der *cis/trans* Isomerisierung in Peptiden, verwendet werden können. In Erweiterung dessen wurden Experimente zur Verschiebung des *cis/trans*-Gleichgewichtes in Peptiden nach Anregung des Thioxochromophors mit UV-Licht durchgeführt.

Der Schwerpunkt im zweiten Kapitel war darauf gerichtet, Erkenntnisse über die Stabilität und das chemische Verhalten von Thiopeptiden in wäßrigen Lösungen zu gewinnen. Es wird gezeigt, daß die Thioxosubstitution am ersten bzw. zweiten Aminosäurerest eines Peptids die Reaktivität der terminalen Aminogruppe beeinflusst. Die Thioxylierung der 4-Nitroanilidbindung in Thioxoarylamiden bzw. der dieser vorausgehenden Peptidbindung in Thiopeptid-4-Nitroaniliden beeinflusst deren Empfindlichkeit gegenüber einer basisch katalysierten Hydrolyse.

Einen zentralen Schwerpunkt der biochemischen Forschung stellt die Aufklärung von Struktur-Funktionsbeziehungen in Proteinen und Protein-Ligand-Komplexen dar, wie sie z.B. im Rahmen von Protease-Substrat und Protease-Inhibitor Wechselwirkungen gefunden werden. Proteasen sind seit vielen Jahren Gegenstand intensiver wissenschaftlicher Untersuchungen. Dies beruht hauptsächlich auf ihrer großen Bedeutung bei der Regulation biologischer Prozesse, und damit einhergehend, ihrer Einbindung in viele medizinisch relevante Problemstellungen. Neben den seit vielen Jahren bekannten Funktionen bei extrazellulären Prozessen wie der Verdauung, der Immunreaktion und der Blutgerinnung

(Übersichten: Neurath, 1984, 1989; Davie et al., 1991) sind zahlreiche weitere, vor allem membrangebundene und im intrazellulären Bereich ablaufende Prozesse entdeckt und beschrieben worden (Bond & Butler, 1987). Einige Proteasen sind in der Lage, durch definierte Hydrolyseschritte membranständige Rezeptoren der G-Protein Kaskade (proteinase activated receptors, PARs) zu aktivieren (Dery et al., 1998). Caspasen umfassen eine Gruppe von Cystein-Proteasen, welche die Apoptose von Zellen auslösen können (Cohen, 1997; Schulzeosthoff et al., 1998; Mignotte & Vayssiere, 1998; Kidd, 1998). Calpaine sind Calcium-abhängige Proteasen, die an vielfältigen intrazellulären Prozessen beteiligt sind (Suzuki et al., 1995; Sorimachi et al., 1997; Carafoli & Molinari, 1998). Multikatalytische Proteinkomplexe, Proteasomen genannt, sind hauptsächlich für den intrazellulären Proteinabbau verantwortlich (Coux et al., 1996; Goldberg et al., 1997; Tanaka, 1998). Das Processing von Prä-Pro-Proteinen, das mit Transport und Reifungsprozessen verbunden ist, wird von intrazellulären Proteasen wie z.B. dem Furin und den Proprotein Convertasen (PC) vorgenommen (Rouille et al., 1995; Nakayama, 1997; Steiner, 1998). Andere Proteasen sind an der Freisetzung und Modulation der Aktivität von Peptidhormonen beteiligt, wie z.B. die Prolyl oligopeptidase und das „Angiotensin converting enzyme“ (Yaron & Naider, 1993; Cunningham & Oconnor, 1997). Eine Beteiligung proteolytischer Enzyme bei der Ausprägung ventraler und lateraler Muster bei der Ontogenese von *Drosophila* wurde von (Chasan & Anderson, 1989) beschrieben. Mit der in Antikörpern gefundenen Esteraseaktivität, deren Funktion an eine, der katalytischen Triade der Serinproteasen ähnliche, Ser-His Diade gekoppelt ist, wurde das Spektrum *in vivo* bedeutsamer proteolytischer Prozesse nochmals erweitert (Benkovic, 1992, 1996; Zhou et al., 1994; Schultz & Lerner, 1995).

Neben der Identifikation der zahlreichen *in vivo* ablaufenden Proteolyseprozesse, besteht ein weiterer Schwerpunkt der Proteasenforschung in der Aufklärung der Substratspezifität der Proteasen (Perona & Craik, 1995; Turk et al., 1998) und der dem Katalyseprozeß zugrunde liegenden Katalysemechanismen (Bender & Kezdy, 1967; Kraut, 1977; Fischer & Barth, 1981; Warshel et al., 1989; Menard & Storer, 1992; Storer & Menard, 1994; Whiting & Peticolas, 1994; Cleland & Kreevoy, 1994; Frey et al., 1994; Pinitglang et al., 1997; Paetzel & Dalbey, 1997). Zum einen sollten die aus kinetischen Daten und Kristallstrukturanalysen nativer und gentechnologisch veränderter Proteasen (Craik et al., 1987; Carter & Wells, 1988) erhaltenen Ergebnisse ein Verständnis der prinzipiellen Prozesse der enzymkatalysierten Peptidbindungshydrolyse ermöglichen, andererseits sind diese Kenntnisse Grundlage für die Erzeugung künstlicher Modulatoren spezifischer Enzymaktivitäten, die wiederum für medizinische Belange von großem Interesse sind (Laskowski & Kato, 1980; Travis & Salvesen, 1983; Shaw, 1994; Storer & Menard, 1996; Rasnick, 1996; Turk et al., 1997;

Dahlen et al., 1997; Katz et al., 1998; Whisstock et al., 1998; Lenarcic & Bevec, 1998; Estrada et al., 1998).

Ein dritter Schwerpunkt der Proteaseforschung besteht in deren Anwendung für industriell-technische Zwecke. Vor allem die enzymkatalysierte Peptidsynthese mit z.T. chemisch oder gentechnologisch modifizierten Proteasen, durchgeführt in Gegenwart organischer Lösungsmittel (Kuhl et al., 1981,1982; Kise et al., 1990; Sears et al., 1994; Cerovsky & Jakubke, 1994a-c, 1996) oder unter Kryobedingungen (Jakubke, 1987; Gerisch et al., 1994; Hänslér et al., 1995; Hänslér & Jakubke, 1996a, b), eröffnet ein weites Feld für die Herstellung biologisch aktiver Peptide durch selektive, racemisierungsfreie Peptidbindungsknüpfung (Übersichten: Jakubke, 1987; Kuhl & Jakubke, 1990; Heiduschka et al., 1990; Schellenberger & Jakubke, 1991; Bongers & Heimer, 1994; Hänslér & Jakubke, 1996a, b; Jakubke et al., 1996).

Da Protein-Ligand-Interaktionen sehr komplex sind, müssen Möglichkeiten gefunden werden, die funktionellen und energetischen Beiträge einzelner Teilkomponenten getrennt zu bewerten. Zu diesem Zweck wurde ein breites Arsenal an Methoden entwickelt, wobei zwischen Verfahren zur Modifikation des Peptidrückgrates bzw. der Seitenketten unterschieden werden kann. Letzteres kann durch definierte Aminosäureaustausche innerhalb einer Polypeptidsequenz mittels ortsspezifischer Mutation (Fersht et al., 1985; Alber et al., 1987) erreicht werden. Durch Substitution mit Cys an definierten Stellen und dessen chemischer Modifikation, z.B. mit Thiolverbindungen, können unter Bildung von Disulfiden Seitenketten verändert werden (Berglund et al., 1998). Die Untersuchung des Einflusses solcher Substitutionen auf die enzymatischen Eigenschaften derart erzeugter Mutantenzyme ermöglichte es, die funktionellen Aminosäurereste von Proteasen, unabhängig von Röntgenkristallstrukturdaten, eindeutig zu bestimmen (Craik et al., 1987; Carter & Wells, 1988; Vernet et al., 1995; Brömme et al., 1996; Liang et al., 1998). Auch die Seitenketten-Wechselwirkungen zwischen Protein und Ligand können durch ortsspezifische Mutation einzelner Aminosäurereste moduliert werden, wobei, je nach Art der Substitution, zwischen sterischen, hydrophoben, ionischen und auf HB-Wechselwirkungen basierenden Interaktionen unterschieden werden kann (Heinz et al., 1992; Menard & Storer, 1992; Kurth et al., 1997; Qasim et al., 1997; Shinde & Inouye, 1997; Estrada et al., 1998).

Große Bedeutung im Bereich der nichtkovalenten Wechselwirkungen zwischen den Amid- und Carbonylgruppen verschiedener Aminosäurereste des gebundenen Peptids einerseits und dem Proteinrückgrat andererseits kommen den HB zu. Zur Bewertung der energetischen Einzelbeiträge definierter HB ist es notwendig, diese selektiv auszuschalten oder abzuschwächen. Auch hierzu wurden einige Verfahren entwickelt. Mittels chemischer Peptid- bzw. Proteinsynthese (Schneider & Kent, 1988; Liu et al., 1996) können einzelne

Peptidbindungen selektiv durch Ester- (Lu et al., 1997) bzw. Thiolesterbindungen (Schnolzer & Kent, 1992; Baca & Kent, 1993; Miller et al., 1998) ersetzt werden. Mit neueren Techniken wie z.B. der *in vitro* Translation (Mendel et al., 1995) können ausgewählte Aminosäurereste durch Prolin oder nichtnative N-Alkyl-Aminosäurereste (Rajarithnam et al., 1994; Cornish et al., 1995) ausgetauscht werden.

Eine weitere Möglichkeit HB-Wechselwirkungen zu modulieren besteht darin, den Sauerstoff der Peptidbindung durch ein Schwefelatom zu ersetzen. Die damit verbundenen Änderungen der chemischen Eigenschaften der Peptidbindung machen Thioxylierungen für die Untersuchung von Enzym-Substrat Wechselwirkungen bei der Katalyse der Peptidbindungshydrolyse durch Proteasen interessant. Bislang liegen Untersuchungen für die Metalloproteasen Aminopeptidase P (Schutkowski et al., 1994), Angiotensin Converting Enzyme (Maziak et al., 1986), Carboxypeptidase A (Mock et al., 1981; Bartlett et al., 1982; Campbell & Nashed, 1982), Leucin-Aminopeptidase (Beattie et al., 1987; Thompson et al., 1986), für die Serinproteasen Chymotrypsin (Thompson et al., 1986; Asboth & Polgar, 1983; Unverzagt et al., 1992), Subtilisin (Asboth & Polgar, 1983, Unverzagt et al., 1992), Dipeptidylpeptidase IV (Schutkowski et al., 1994), Prolyl oligopeptidase (Polgar et al., 1993; Schutkowski et al., 1997) und die Cysteinproteasen Papaya Peptidase A, Chymopapain (beide Asboth et al., 1988) und Papain (Asboth & Polgar, 1983; Thompson et al., 1986; Asboth et al., 1988; Foje & Hanzlick, 1994) vor. Kürzlich wurden die Ergebnisse von Monothioxoamid-Substitutionen in einem Peptid, welches ein Substrat der HIV-1 Protease darstellt, publiziert (Yao et al., 1998).

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die proteolytische Stabilität von Thiopeptiden bezüglich der Hydrolyse durch Serin- und Cysteinproteasen untersucht. Dabei wurden die Serinproteasen α -Chymotrypsin als Vertreter der Pankreasproteasen, Subtilisin Carlsberg als Vertreter der bakteriellen Subtilisine und die zwei, einer neuen Klasse von Serinproteasen (Rawlings et al., 1991) zugerechneten, Prolyl-spezifischen Proteasen Dipeptidylpeptidase IV (im Folgenden: DP IV) und Prolyl oligopeptidase (im Folgenden: POP) verwendet. Die zwei erstgenannten sekretorischen Proteasen, die sowohl Endo- als auch Carboxypeptidase-Aktivität aufweisen, wurden als Vertreter der Serinprotease-Klassen I (α -Chymotrypsin) und II (Subtilisin Carlsberg) (Neurath, 1984) gewählt, sie stellen vielfach verwendete Modelle der Proteaseforschung dar. Um zu prüfen, ob die dort erhaltenen Ergebnisse auch für komplexer strukturierte Proteasen gelten, wurden die unmittelbar zellgebundenen Proteaseaktivitäten der Exoprotease DP IV und der Endopeptidase POP untersucht. Die Suche nach spezifischen Aktivitätsmodulatoren ist auch wegen der großen medizinischen Bedeutung der zwei letztgenannten Proteasen von großem Interesse. Die für

die Serinproteasen erzielten Ergebnisse wurden mit denen, die für Papain als Vertreter der Cysteinproteasen erhalten wurden, verglichen.

Die in der Literatur beschriebenen Untersuchungen beschränken sich weitgehend auf Derivate, deren zu hydrolysierende Bindung thioxyliert ist. Als Abgangsgruppe diente in der Regel ein Ester oder chromogenes Amid (4-Nitroanilid, Naphtylamid). Derartige Abgangsgruppen sind wegen der elektronenziehenden Wirkung des Sauerstoffes der Ester bzw. wegen der konjugierten π -Elektronensysteme der chromogenen Amide aktiviert (Foje & Hanzlick, 1994), und widerspiegeln nicht die Situation einer „echten“, d.h. zwei native Aminosäurereste verbindenden, thioxylierten Peptidbindung.

In den hier durchgeführten kinetischen Untersuchungen wurde der Einfluß der Thioxylierung sowohl für Verbindungen, deren zu hydrolysierende Bindung modifiziert war, als auch für solche mit thioxylierten Sekundärbindungsstellen unter Verwendung von Standardsubstraten und deren monothioxylierten Derivaten untersucht.

Die untersuchten Sekundärbindungsstellen reichten, je nach Protease und Substrat, von den Positionen P_2 bis P_4 , im Falle der Prolyloligopeptidase wurde auch P_1 untersucht. Bei der Bewertung des Einflusses der Thioxylierung der P_1 -Position wurde zwischen Verbindungen mit einer aktivierten Abgangsgruppe und nichtaktivierten Derivaten unterschieden. Für Erstere wurden Thioxoarylamide mit dem 4-Nitroanilidrest in P_1 -Position gewählt, letztere trugen dort einen proteinogenen Aminosäurerest.

Die Verwendbarkeit der dabei erhaltenen Ergebnisse für eine kinetisch kontrollierte enzymatische Thioxo-peptidsynthese wurde in einem weiteren Kapitel untersucht.

Neben den Wechselwirkungen von Thioxo-peptiden mit Proteasen wurde auch deren Verhalten gegenüber der (rekombinat gewonnenen) cytosolischen Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerase Cyclophilin 18 (im Folgenden: rhCyp18) untersucht. Die Rotationsbarriere um die C-N Bindung ist, im Vergleich zur Oxo-Peptidbindung, in der Thioxo-Peptidbindung um ca. 12 kJ/mol erhöht (Piccini-Leopardi et al., 1977; Schutkowski et al., 1994; 1995). Die Isomerisierung der -Xaa- ψ [CS-N]-Pro- Bindung kann durch rhCyp18 nicht beschleunigt werden, obwohl dieses Thioxo-peptide mit den entsprechender Oxo-Peptide vergleichbaren Affinitäten bindet (Schutkowski et al., 1995). Die in Folge der Thioxylierung veränderten chemischen Eigenschaften von Peptidyl-Prolyl-Peptidbindungen waren Anlaß für Untersuchungen zum Katalysemechanismus des rhCyp18.

2. Physikalisch-Chemische Eigenschaften von Thiopeptidderivaten

2.1. UV/VIS und CD-spektroskopische Untersuchungen an Thiopeptiden

Die Peptidbindung stellt in der UV/VIS Spektroskopie einen Chromophor dar, der hauptsächlich auf π - π^* Übergänge zurückzuführen ist (Galla, 1988). Voraussetzung für den Erhalt eines CD-Signals von Aminosäurederivaten und Peptiden ist das Vorhandensein asymmetrischer C_α -Substituenten auf beiden Seiten der an sich planaren und somit nicht CD-aktiven Peptidbindung (Übersicht: Johnson, 1995). Untersuchungen an N-Acetyl-alanin-N'-methylamid und Dipeptid-Diketopiperazinen zeigten, daß Banden im Bereich um 195 nm π - π^* Übergängen zuzuordnen sind, während Banden zwischen 210 und 220 nm n - π^* Übergänge repräsentieren. CD-Banden unterhalb von 190 nm werden auf σ - σ^* bzw. n - σ^* Übergänge zurückgeführt.

Die Substitution des Sauerstoffes der Carbonylgruppe durch Schwefel bewirkt eine bathochrome Verschiebung der Absorptionsmaxima (Brown et al., 1982, Maciejewski & Steer, 1993). Thioxoamidbindungen besitzen ein Absorptionsmaximum im Bereich zwischen 250 und 280 nm, das auf π - π^* Übergänge des Thioxoamidchromophors zurückzuführen ist (Sugawara et al., 1977; Milewska et al., 1997). N-Methyl-thioxoacetamid, ein einfaches Modell für eine Thioxoamid-Bindung, besitzt in wäßriger Lösung neben der Hauptbande bei 256 nm (ϵ : 12 400 M⁻¹ cm⁻¹) noch eine Schulter bei 315 nm (ϵ : 60 M⁻¹ cm⁻¹), die, in Analogie zu Untersuchungen am Thioxoacetamid (Barrett & Dehaidy, 1975), auf einen n_s - π^* Übergang zurückgeführt wird, wobei n_s die nichtbindenden Orbitale des Schwefelatoms bezeichnet (Ataka et al., 1984; Kato et al., 1984). Keine klare Zuordnung existiert für das Maximum bei 204 nm, ein möglicher n - σ^* Übergang wird diskutiert (Kajtar et al., 1986).

In den hier durchgeführten Untersuchungen wurde zunächst das Dipeptid Ala-Pro mit dem entsprechenden Thioxodipeptid Ala- ψ [CS-N]-Pro verglichen. Letzteres besitzt als potentiell chromogene Gruppe nur die thioxylierte Peptidbindung, so daß gemessene Effekte eindeutig zugeordnet werden können. Außerdem ist der Extinktionskoeffizient der Thioxoamidgruppe im Vergleich zu den Extinktionswerten im Bereich zwischen 200 und 220 nm bei dieser Verbindung sehr hoch (vgl. Abb. 2 und 3, Tab. 1), so daß sowohl bei UV/VIS- als auch CD-Messungen gute Meßsignale erhalten werden. Bei längeren Peptiden kommt hier die Absorption der nichtthioxylierten Peptidbindungen (und eventuell vorhandener aromatischer Seitenketten) noch hinzu, so daß sich das Absorptionsverhältnis zu Ungunsten der Thioxoamidbande verschiebt (vgl. Abb.5).

Xaa-Pro Dipeptide besitzen in wäßriger Lösung einen definierten Anteil des *cis*-Isomers, der in Abhängigkeit vom Protonierungszustand des Carboxylsäurerestes variiert. Der erhöhte *cis*-Gehalt des C-terminal deprotonierten Ala-Pro ist auf eine elektrostatische Abstoßung zwischen dem Carboxylatsauerstoff und dem Carbonylsauerstoff des Ala zurückzuführen (Grathwohl &

Wütrich, 1976a). Die Isomerisierung der Peptidbindung kann mittels NMR (Grathwohl & Wütrich, 1976a, b 1981) und über Isomerentrennung mittels Tieftemperatur-Kapillarelektrophorese (Thuncke et al., 1996) verfolgt werden.

In den hier durchgeführten Messungen wurden nicht nur differente Spektren für die *cis* und *trans* Formen gefunden, die einzelnen Isomere zeigten auch in Abhängigkeit vom Protonierungszustand ihrer Carboxylgruppe unterschiedliche Eigenschaften sowohl in UV/VIS als auch CD-spektroskopischen Messungen (vgl. Abb.2). Während die UV/VIS-Spektren beider Verbindungen und das CD-Spektrum von Ala-ψ[CS-N]-Pro vor und nach einem definierten pH-Sprung wegen der niedrigen Isomerisierungsgeschwindigkeit bei 10°C direkt gemessen werden konnten, mußte für die CD-Messungen am Ala-Pro eine andere Methode gewählt werden, da der Zeitaufwand für die Datenaufnahme hier größer ist, und die beginnende Isomerisierung die Spektren verfälschen würde. Durch kinetische Messung der zeitabhängigen Isomerisierung bei einer definierten Wellenlänge und Beginn der Datenaufnahme zum Zeitpunkt t kann aus der I. Ordnungsregression der Meßdaten der Wert für t₀ berechnet werden. Durch Auftragung mehrerer t₀-Werte gegen die entsprechenden Wellenlängen kann durch Interpolation das Spektrum von Ala-Pro, das dessen Eigenschaften nach dem pH-Sprung aber vor der Isomerisierung widerspiegelt, ermittelt werden. Aus den bei einem bestimmten pH-Wert gemessenen Mischspektren von Lösungen mit verschiedenem und genau bekanntem *cis/trans* Verhältnis können die Spektren der reinen Isomere über ein Gleichungssystem gemäß

$$0.9 \times trans + 0.1 \times cis = \text{Spektrum I}$$

$$0.55 \times trans + 0.45 \times cis = \text{Spektrum II}$$

berechnet werden (vgl. Abb.3). Aus den rechnerisch ermittelten Spektren wurden die Absorptionsmaxima und Extinktionskoeffizienten ermittelt (vgl. Tab.1).

Das UV/VIS Absorptionsspektrum des Ala-Pro zeigt die erwarteten π-π* Übergänge bei 201 nm (pH 2) bzw. 203 nm (pH 7.5). Neben der bathochromen Verschiebung der Spektren des Zwitterions um 2 nm findet man unabhängig vom pH-Wert um ca. 10% erhöhte Extinktionskoeffizienten der *cis*-Isomere gegenüber den *trans*-Isomeren. Die *cis*- und *trans*-UV/VIS-Spektren bei pH 7.5 weisen zusätzlich ein lokales Minimum bei 191 nm auf, das in den CD-Messungen am Ala-Pro als Maximum bei 194 (*trans*) bzw. 195 nm (*cis*) erscheint.

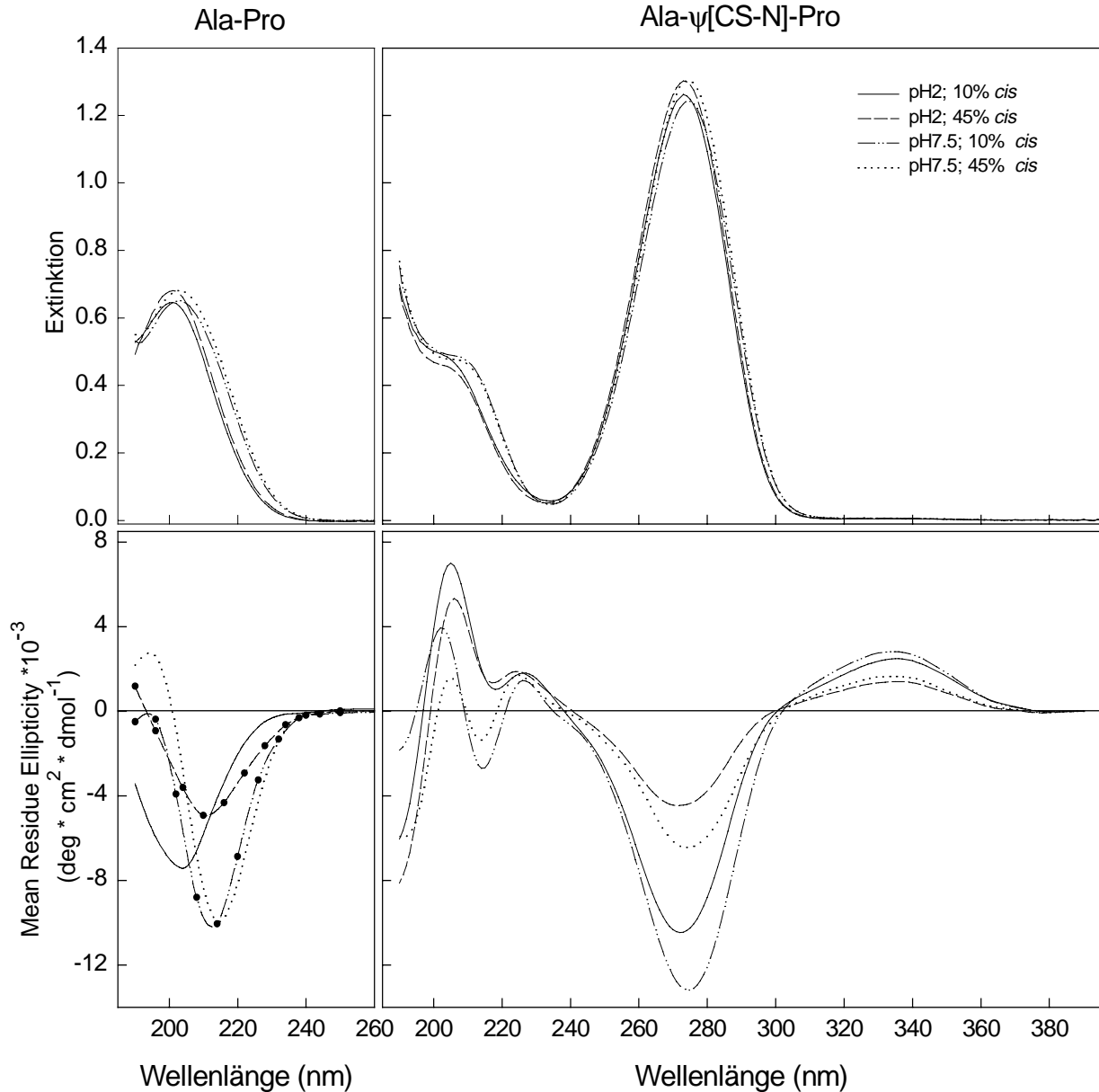


Abb.2: Gemessene UV/VIS- (oben) und CD-Spektren (unten) des Dipeptids Ala-Pro (links) und des Thioxodipeptids Ala- ψ [CS-N]-Pro (rechts). Die Messungen erfolgten in 10 mM Natriumphosphat-Puffer pH 2 bzw. pH 7.5. 20 mM Stammlösungen (im Isomerisierungsgleichgewicht) beider Verbindungen im jeweiligen Puffer (pH korrigiert) wurden 1:20 in den Meßansatz verdünnt. Bei Messung der Spektren im Isomerisierungsgleichgewicht wurde in den gleichen Puffer verdünnt, in dem sich die Stammlösung befand, bei den pH-Sprung Experimenten wurde in den jeweils anderen Puffer verdünnt. Die CD-Spektren für Ala-Pro im Isomerisierungsungleichgewicht wurden durch Interpolation einzelner Meßpunkte ermittelt, die aus kinetischen Daten der zeitabhängigen Isomerisierung abgeleitet wurden (Erläuterungen im Text). Folgende Meßbedingungen wurden gewählt: T: 10°C, d = 1 mm, c: 1 mM. CD: scan speed: 200 nm/min, response: 0.5 s, 12 Akkumulationen, Rauschunterdrückung durch Fourier-Transformation, zeitabhängige CD-Messungen: Datenintervall 5s, response: 1s.

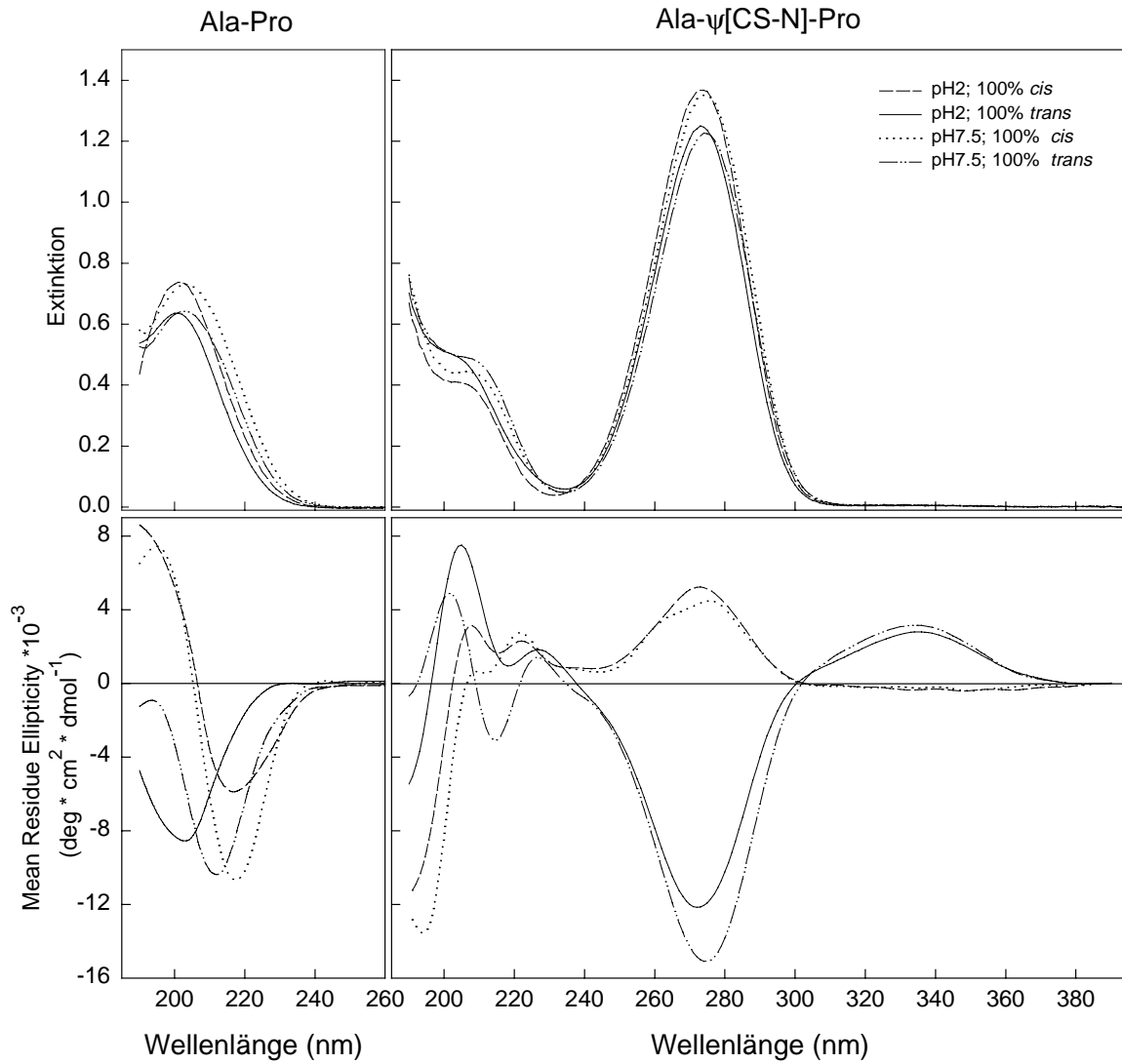


Abb.3: Berechnete UV/VIS- (oben) und CD-Spektren (unten) des Dipeptids Ala-Pro (links) und des Thioxodipeptids Ala- ψ [CS-N]-Pro (rechts). Erläuterungen im Text.

Isomer		UV/VIS λ (nm), ϵ (cm ² /mmol)		CD λ (nm), ϵ (cm ² /mmol)					
<i>trans</i> , pH 2	O	201 ₆₃₆₁		203 ₋₈₅₁₀					
	T	^a 208 ₄₄₉₀	273 ₁₂₅₀₅	208 ₆₃₃₂	218 ₉₃₆	227 ₁₈₁₇	272 ₋₁₂₇₁	335 ₂₇₈₉	
<i>cis</i> , pH 2	O	201 ₇₃₇₄		216 ₋₅₈₈₀					
	T	^a 208 ₃₉₂₈	273 ₁₃₆₆₆	208 ₃₁₂₇	215 ₁₆₄₂	222 ₂₂₉₀	273 ₅₂₁₉	335 ₋₃₆₈	
<i>trans</i> , pH 7.5	O	191 ₅₂₀₉	203 ₆₄₂₆	194 ₋₉₆₀	212 ₋₁₀₃₈₀				
	T	^a 213 ₄₃₅₁	274 ₁₂₂₆₄	202 ₄₈₈₅	215 ₋₃₀₉	227 ₁₃₉₅	275 ₋₁₅₁₀₅	334 ₃₁₄₇	
<i>cis</i> , pH 7.5	O	191 ₅₆₄₁	203 ₇₃₀₈	195 ₇₄₄₀	217 ₋₁₀₆₈₀				
	T	^a 213 ₃₉₇₅	274 ₁₃₅₀₉	194 ₋₁₃₅₈₈	209 ₆₃₉	212 ₅₆₀	222 ₂₇₂₈	276 ₄₄₆₁	334 ₋₂₅₈

Tab.1: Berechnete Extrema der UV/VIS- und CD Spektren des Dipeptids Ala-Pro (O) und des Thioxodipeptids Ala- ψ [CS-N]-Pro (T). ^a kennzeichnet eine Schulter.

Die π - π^* Übergänge hingegen erscheinen im CD-Spektrum als Minima, auch hier sind die *cis*-Isomere gegenüber den *trans*-Isomeren (bei gleichem pH-Wert) bathochrom verschoben.

Im UV/VIS-Spektrum von Ala- ψ [CS-N]-Pro beobachtet man im Bereich zwischen 190 und 230 nm die Flanke einer Bande, die bei 208 nm (pH 2) bzw. 213 nm (pH 7.5) eine Schulter aufweist. Es handelt sich hier wahrscheinlich um bathochrom verschobene σ - σ^* bzw. n - σ^* Übergänge, deren Absorptionsmaxima beim unsubstituierten Dipeptid unterhalb von 180 nm liegen (Johnson, 1995). Der gleiche Wellenlängenbereich weist im CD-Spektrum drei, im Falle des zwitterionischen *cis*-Isomers von Ala- ψ [CS-N]-Pro sogar 4 unterschiedlich stark ausgeprägte und sich überlagernde Extrema auf. Korrelationen zwischen Lage und Intensität der Banden, Protonierungszustand und Isomerenstatus können hier nicht getroffen werden.

Die Hauptabsorption des π - π^* Überganges des Thioxodipeptids liegt im Bereich von 272 bis 276 nm, im CD-Spektrum bilden nur die beiden *trans*-Formen, analog zum Ala-Pro, Minima, die berechneten Spektren der *cis*-Isomere erscheinen als Maxima (vgl. Abb.3). Im UV/VIS Spektrum sind die zwitterionischen Isomere (pH 7.5) gegenüber der kationischen Form (pH 2) um 1 nm bathochrom verschoben. Bei gleichem pH-Wert zeigen die *cis*-Isomere um ca. 9 % höhere Extinktionskoeffizienten als die entsprechenden *trans*-Formen. Sehr viel größere Differenzen der Extinktionskoeffizienten findet man bei Vergleich der CD-Signale der Isomere von Ala- ψ [CS-N]-Pro. Unter Beachtung der Umkehrung des Vorzeichens von ϵ ergibt sich rechnerisch eine Signaländerung für die *cis* \rightarrow *trans* Isomerisierung von 330 % (pH 2) bzw. 440 % (pH 7.5) und von 140 % (pH 2) bzw. 130 % (pH 7.5) bei Isomerisierung in der entgegengesetzten Richtung. Die CD-Signale der Hauptbande des Thioxodipeptids sind bei der zwitterionischen Form gegenüber dem Signal bei pH 2 um 3 nm bathochrom verschoben, des weiteren wird eine zusätzliche bathochrome Verschiebung der Absorptionsmaxima der *cis*-Isomere gegenüber den *trans*-Isomeren (bei gleichem pH-Wert) um 1 nm gefunden. Das dem n - π^* Übergang zugeordnete Maximum des CD-Spektrums bei 335 nm (pH 2) bzw. 334 nm (pH 7.5) wird im UV/VIS-Spektrum nicht gefunden.

Für Thiopeptide ist bekannt, daß sie in wäßrigen Lösungen ca. 100-fach langsamer isomerisieren als die entsprechenden Oxo-Peptide (Schutkowski et al., 1995). Für das Thioxodipeptid Ala- ψ [CS-N]-Pro konnte eine sehr langsame Isomerisierung (vgl. Tab.2) nach einem pH-Sprung von pH 2 (10 % *cis*) auf pH 7.5 (45 % *cis*) mittels NMR und durch Isomerentrennung mittels Kapillarelektrophorese gemessen werden. Die Halbwertszeit (HWZ) der Isomerisierung der Thioxoamid-Bindung von Ala- ψ [CS-N]-Pro in wäßriger Lösung beträgt bei 20°C ca. 16 Stunden. Um diese in einem vernünftigen Zeitrahmen messen zu können, wurde die *cis/trans* Isomerisierung in wäßrigen Lösungen bei Temperaturen zwischen 40 und 60°C

verfolgt. An dieser Stelle sei angemerkt, daß das verwendete Ala- ψ [CS-N]-Pro bei Inkubationstemperaturen bis 60°C keine Zersetzungsreaktionen zeigte. Die in Analogie zu der bei Dipeptid-Derivaten häufig beobachteten Bildung von Diketopiperazin-Derivaten möglicherweise stattfindende Bildung von Thioxo-keto-piperazin-Derivaten wurde bei massespektrometrischer Analyse der zuvor bis auf 60°C erhitzten Proben nicht gefunden.

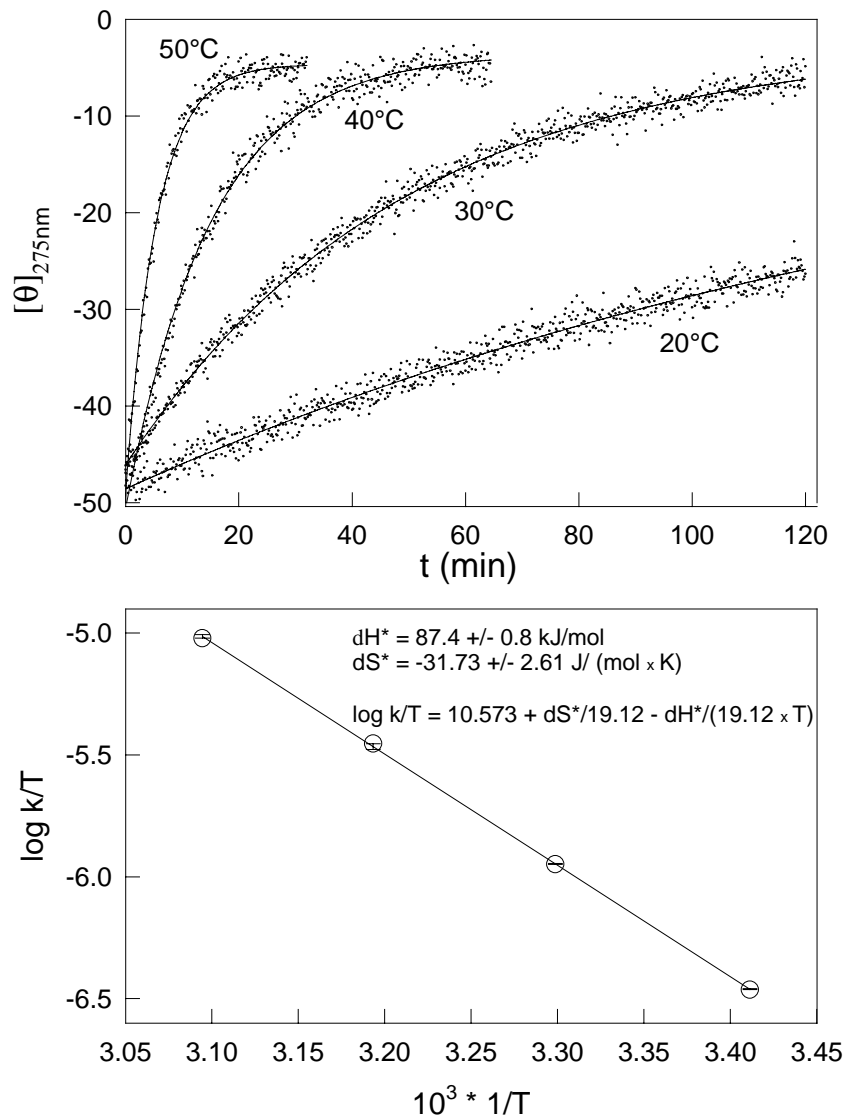


Abb.4: oben: Zeitabhängigkeit der Isomerisierung von Ala- ψ [CS-N]-Pro nach einem kombinierten pH- und Lösungsmittelsprung. Dazu wurde 1 Volumen Ala- ψ [CS-N]-Pro (20 mM in Natriumphosphatpuffer, pH 2) mit 1 Volumen 100 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7.5 und 8 Volumen Trifluorethanol (TFE) verdünnt. Die Endkonzentration Ala- ψ [CS-N]-Pro betrug 2 mM. Die Daten wurden bei 275 nm und Temperaturen von 20, 30, 40 und 50°C aufgenommen. unten: Eyring-Diagramm der I.Ordnungskonstanten $k_{\text{trans} \rightarrow \text{cis}}$, die aus k_{obs} abgeleitet wurden (s.Text).

Wie hier erstmals gezeigt, kann der durch einen pH-Sprung bzw. kombinierten pH- und Lösungsmittelsprung ausgelöste *cis/trans* Isomerisierungsprozeß des Thioxodipeptids Ala-ψ[CS-N]-Pro durch CD-spektroskopische Messungen direkt verfolgt werden, die Verschiebung des *cis*-Gehaltes korreliert mit definierten Änderungen der CD-Signale der π - π^* bzw. n_s - π^* Übergänge (vgl. Abb.4). Letztere reflektieren bei kinetischen Messungen in gleichem Maße die *cis/trans* Isomerisierung wie das Hauptsignal der Thiopeptidbindung. Die im Zuge des Isomerisierungsprozesses meßbaren Änderungen der CD-Signale sind reversibel, bei Rückstellen des pH-Wertes wird der Anfangswert wiedererreicht. Durch parallele NMR-Analyse und kapillarelektrophoretische Messungen entsprechender Proben wurde sichergestellt, daß die Ergebnisse der CD-spektroskopischen Untersuchungen tatsächlich den jeweiligen Isomerisierungsprozeß widerspiegeln (G.Scherer, nichtpublizierte Daten). Die Isomerisierung kann in einer zeitabhängigen Messung bei einer Wellenlänge von 272 nm (pH 2) bzw. 275 nm (pH 7.5) verfolgt werden, man erhält einen Kurvenverlauf, der dem einer I.Ordnungsreaktion folgt. Die daraus berechnete Geschwindigkeitskonstante, im Folgenden als k_{obs} bezeichnet, setzt sich additiv aus den Geschwindigkeitskonstanten $k_{\text{cis} \rightarrow \text{trans}}$ und $k_{\text{trans} \rightarrow \text{cis}}$ zusammen. Im Gleichgewicht der Isomerisierung gilt weiterhin:

$$k_{\text{cis} \rightarrow \text{trans}} \times [\text{cis}] = k_{\text{trans} \rightarrow \text{cis}} \times [\text{trans}]. \quad (\text{I})$$

Da die Konzentrationen der [*cis*] und [*trans*]-Konformere von Ala-ψ[CS-N]-Pro mittels Kapillarelektrophorese oder NMR-Messungen getrennt ermittelt werden können, kann Gleichung (I) umgestellt und in Gleichung (II)

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{cis} \rightarrow \text{trans}} + k_{\text{trans} \rightarrow \text{cis}} \quad (\text{II})$$

eingesetzt werden, wodurch eine der zwei Teilkonstanten substituiert, und die jeweils andere über k_{obs} berechnet werden kann. Die Durchführung der Messungen bei verschiedenen Temperaturen lieferte verschiedene Geschwindigkeitskonstanten der I.Ordnungsreaktion (vgl. Abb.4). Um die Relevanz der so ermittelten Daten zu prüfen, wurden die CD-spektroskopisch bestimmten Geschwindigkeitskonstanten mit den aus NMR-Messungen und der zeitabhängigen kapillarelektrophoretischen Isomerentrennung abgeleiteten k_{obs} -Werten verglichen. Die Meßwerte waren innerhalb der Fehlergrenze identisch.

Die Auftragung dieser Konstanten im Eyring-Diagramm ermöglicht eine lineare Regression der Meßdaten, und somit die Ermittlung der Aktivierungsenthalpie und der Aktivierungsentropie der Isomerisierungsreaktion. Die freie Aktivierungsenthalpie ist über die Gibbs-Helmholtz-Gleichung gemäß $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \Delta S^\ddagger$ zugänglich.

Isomerisierung (Medium)	<i>cis</i> (%) (final)	$k_{I,Ordnung}$ (40°C) (s ⁻¹)	ΔH^\ddagger [kJ/mol]	ΔS^\ddagger [J/(mol*K)]	ΔG^\ddagger (40°C) [kJ/mol]
<i>cis</i> → <i>trans</i> 10 mM P _i ; pH2 ^a	9.8	$2.70 \cdot 10^{-4}$	89.56 ± 1.53	-32.2 ± 2.75	99.64
<i>trans</i> → <i>cis</i> 10 mM P _i ; pH7.5 ^b	44.3	$0.67 \cdot 10^{-4}$	91.05 ± 0.84	-38.88 ± 2.60	103.23
<i>trans</i> → <i>cis</i> P _i +TFE; pH7.5 ^c	60.6	$6.67 \cdot 10^{-4}$	87.40 ± 0.80	-31.73 ± 2.61	97.34

Tab.2: *cis*-Gehalte, Geschwindigkeitskonstanten und berechnete Aktivierungsparameter der Isomerisierungsreaktionen von Ala-ψ[CS-N]-Pro nach einem pH-Sprung bzw. kombiniertem pH- und Lösungsmittelsprung. ^apH-Sprung aus 10 mM Natriumphosphat-Puffer (P_i), pH 7.5 auf pH 2 durch Zugabe von 1 M Phosphorsäure. ^bpH-Sprung aus 10 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 2 auf pH 7.5 durch Zugabe von 1 M NaOH. ^c1 Volumen Ala-ψ[CS-N]-Pro (20 mM in H₂O/Trifluoressigsäure, pH 2) wurde mit 1 Volumen 100 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7.5 und 8 Volumen Trifluoethanol (TFE) verdünnt. Die Endkonzentration Ala-ψ[CS-N]-Pro betrug in allen Meßansätzen 2 mM. Die *cis*-Gehalte wurden durch kapillarelektrophoretische Isomerentrennung und Integration der Peakflächen bestimmt. Die Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} wurden durch CD-Messungen bei λ :275 nm und Temperaturen von 40, 50 und 60°C (^{a,b}) bzw. 20, 30, 40 und 50°C (^c) ermittelt, und in die jeweiligen Einzelkonstanten $k_{cis \rightarrow trans}$ bzw. $k_{trans \rightarrow cis}$ umgerechnet (s.Text).

	Isomerisierung (Medium)	ΔH^\ddagger [kJ/mol]	ΔS^\ddagger [J/(mol*K)]	ΔG^\ddagger (40°C) [kJ/mol]	$\Delta\Delta G^\ddagger$ (40°C) [kJ/mol]
Ala-Pro*	<i>cis</i> → <i>trans</i>	83.00 ± 1.17	-2.00 ± 0.01	83.63	
Ala-ψ[CS-N]-Pro	10 mM P _i ; pH2 ^a	89.56 ± 1.53	-32.20 ± 2.75	99.64	16.01
Ala-Pro*	<i>trans</i> → <i>cis</i>	90.90 ± 1.40	16.00 ± 0.40	85.89	
Ala-ψ[CS-N]-Pro	10 mM P _i ; pH7.5 ^b	91.05 ± 0.84	-38.88 ± 2.60	103.23	17.34

Tab.3: Aktivierungsparameter der Isomerisierungsreaktionen von Ala-Pro und Ala-ψ[CS-N]-Pro nach einem pH-Sprung. ^apH-Sprung aus 10 mM Natriumphosphat-Puffer (P_i), pH 7.5 auf pH 2 durch Zugabe von 1 M Phosphorsäure. ^bpH-Sprung aus 10 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 2 auf pH 7.5 durch Zugabe von 1 M NaOH. Die Berechnung der Daten erfolgte wie im Text beschrieben. *Meßdaten übernommen von S. Füssel (nichtpublizierte Daten).

Weiterhin wurden die für die *trans*→*cis* Isomerisierung von Ala-ψ[CS-N]-Pro erhaltenen Werte für ΔG^\ddagger mit denen, die mittels NMR (G.Scherer, nichtpublizierte Daten) für das Dipeptid Ala-Pro ermittelt wurden, verglichen (vgl.Tab.3). Es zeigt sich, daß die Erhöhung der Rotationsbarriere um die Thioxoamidbindung weitgehend auf die negativen Werte für die

Aktivierungsentropie ΔS^\ddagger zurückzuführen ist. Dies deckt sich mit Ergebnissen, die bei der Untersuchung anderer Thioxo-peptid-Derivate erzielt wurden (Schutkowski et al., 1994, 1995). Die Differenzen der freien Aktivierungsenthalpien zwischen Thioxo- und Oxo-Dipeptid sind mit $\Delta\Delta G^\ddagger$ -Werten von 16-17 kJ/mol um ca. 4 kJ/mol höher als die aus den Aktivierungsparametern für die Paare Ala-Pro-NH-Np / Ala- ψ [CS-N]-Pro-NH-Np ($\Delta\Delta G^\ddagger_{40^\circ\text{C}} = 12.9$ kJ/mol) und Ala-Ala-Pro-Phe-NH-Np / Ala-Ala- ψ [CS-N]-Pro-Phe-NH-Np ($\Delta\Delta G^\ddagger_{40^\circ\text{C}} = 12.2$ kJ/mol) abgeleiteten Werte (Schutkowski et al., 1994, 1995). Die zum Vergleich herangezogenen Derivate besitzen, im Gegensatz zu den hier untersuchten Dipeptiden, keine freie Carboxylgruppe, deren Protonierung und Deprotonierung die pH-abhängige Verschiebung des *cis/trans*-Gleichgewichtes bedingt, und die wahrscheinlich auch die Höhe der Rotationsbarriere um die Thioxoamidbindung beeinflusst.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Tetrapeptid-4-nitroanilid Derivate besitzen charakteristische UV/VIS Absorptionsspektren (vgl. Abb.5). Einerseits liefert die gebundene 4-Nitroanilidgruppe einen charakteristischen Chromophor im Bereich um 315 nm (Abb.5a), im Falle thioxylierter Derivate kommt die Absorption der Thioxo-peptidbindung noch hinzu.

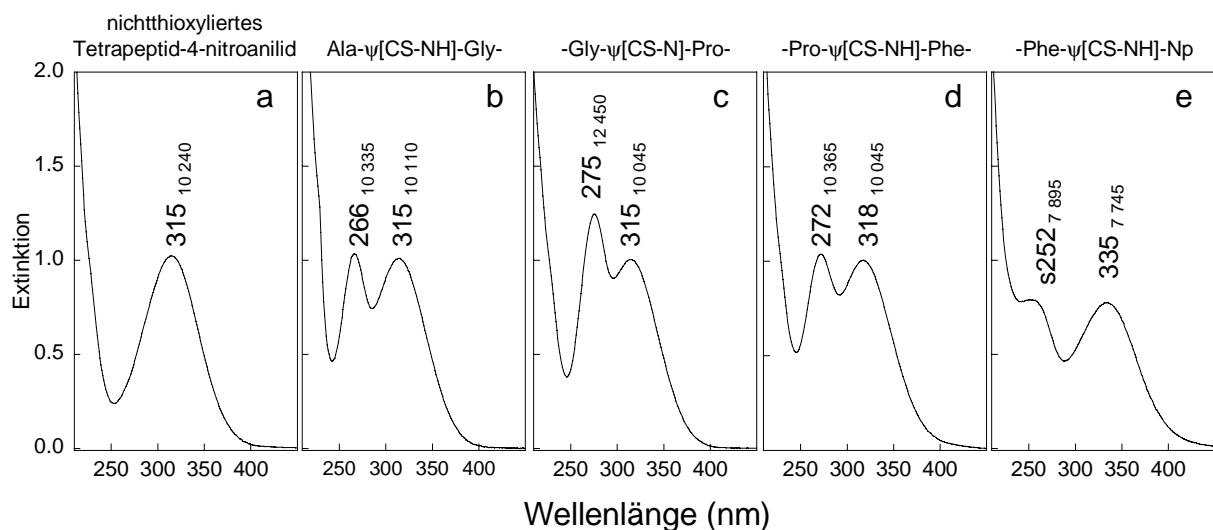


Abb.5: UV/VIS-Spektren von Ala-Gly-Pro-Phe-NH-Np (a) und dessen vier monothioxylierten Derivaten (b-e). Die Zahlenwerte geben das Absorptionsmaximum der jeweiligen Bande an, die tiefgestellten Zahlen den Extinktionskoeffizienten. s kennzeichnet eine Schulter im Spektrum des Thioxoarylamides Ala-Gly-Pro-Phe- ψ [CS-NH]-Np (e). Die Meßdaten wurden in 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7.5 bei 10°C (c: 0.1 mM, d = 1 cm) im Wellenlängenbereich von 210 bis 450 nm aufgenommen.

Sind die beiden Chromophore durch mindestens eine Peptidbindung getrennt, überlagern sich die einzelnen spektralen Komponenten weitgehend unabhängig voneinander im Gesamtspektrum

(Abb. 5b –5d). Die Einbindung einer tertiären Aminogruppe im Derivat Ala-Gly- ψ [CS-N]-Pro-Phe-NH-Np, bewirkt eine Erhöhung des Extinktionskoeffizienten der Thiooxopeptidbindung um ca. 20 %. Die direkte Verknüpfung der Thiooxopeptidbindung mit dem 4-Nitroanilidrest im Thioxoarylamid Ala-Gly-Pro-Phe- ψ [CS-NH]-Np führt zu einer bathochromen Verschiebung des 4-Nitroanid-Chromophors, während das Signal der Thiooxopeptidbindung nur noch als Schulter bei 252 nm erscheint (Abb.5e).

Im nächsten Schritt wurden die Untersuchungen zur CD-spektroskopischen Meßbarkeit der *cis/trans* Isomerisierung der Peptidyl-Prolyl-Peptidbindung auf die Verbindung Ala-Gly- ψ [CS-N]-Pro-Phe-NH-Np ausgedehnt. Diese besitzt in Abhängigkeit vom Lösungsmittel unterschiedliche *cis*-Gehalte (33% in DMSO, 14% in 10 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7.5), die *cis/trans* Isomerisierung der Thiooxopeptidbindung verläuft ca. 100-fach langsamer als beim nichtthioxylierten Derivat ($k_{10^\circ\text{C}}$: $7 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$; HWZ: 2.75 h) (Schutkowski et al., 1995), und kann mit einem proteasegekoppelten Test (Fischer et al., 1984) direkt verfolgt werden.

Das CD-Spektrum von Ala-Gly- ψ [CS-N]-Pro-Phe-NH-Np (vgl. Abb.6) ist dem des zuvor untersuchten Thioxodipeptids Ala- ψ [CS-N]-Pro vergleichbar, der im UV/VIS-Spektrum eine charakteristische Absorptionsbande liefernde 4-Nitroanilidrest zeigt kein CD-Signal. Die in Natriumphosphatpuffer, pH 7.5 gemessene Probe (14 % *cis*) liefert wiederum intensivere Banden im Bereich der π - π^* (274 nm) und n_s - π^* (346 nm) Übergänge als die Probe, die unmittelbar nach 1:100 Verdünnung aus DMSO in Natriumphosphatpuffer, pH 7.5 gemessen wurde und noch das *cis/trans* Verhältnis der DMSO-Lösung aufweist (33 % *cis*). Aus den gemessenen Mischspektren können die Spektren der reinen Isomere berechnet werden. Auch hier besitzt das Absorptionsspektrum des *cis*-Isomers umgekehrte Vorzeichen im Bereich der π - π^* (277 nm) und n_s - π^* Übergänge, verglichen zum Spektrum des *trans*-Isomers. Das berechnete Signal bei 334 nm ist nur sehr schwach ausgeprägt.

Die *cis/trans* Isomerisierung kann bei 1:100 Verdünnung von Ala-Gly- ψ [CS-N]-Pro-Phe-NH-Np aus einer DMSO-Stammlösung in Natriumphosphatpuffer in einer zeitabhängigen Messung bei 274 nm verfolgt werden (vgl. Abb.6). Der aus k_{obs} abgeleitete Wert für $k_{\text{cis} \rightarrow \text{trans}}$ war innerhalb der Fehlergrenze identisch dem unter gleichen Meßbedingungen im proteasegekoppelten Test parallel bestimmten Wert für $k_{\text{cis} \rightarrow \text{trans}}$.

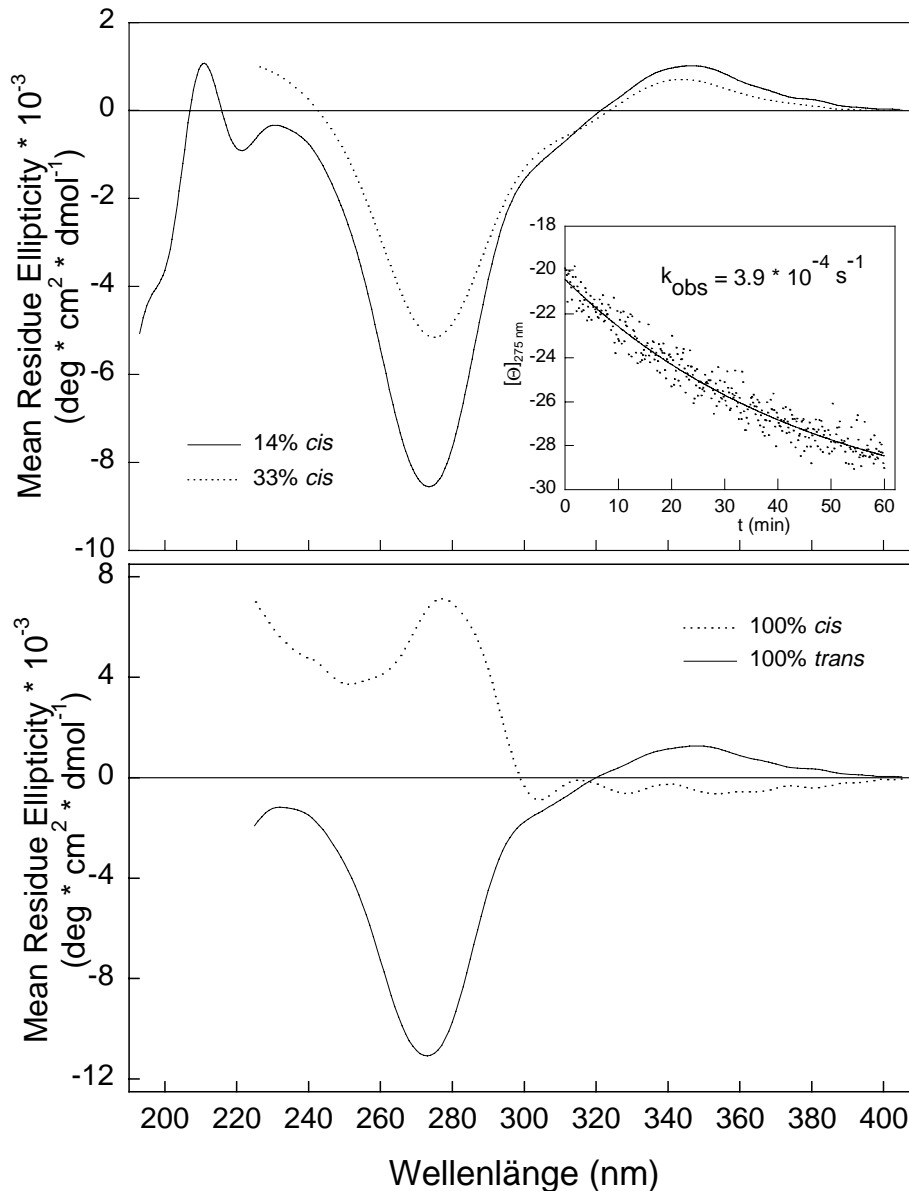


Abb.6: oben: CD-Spektren von Ala-Gly- ψ [CS-N]-Pro-Phe-NH-Np in 10 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7.5 (—) im Gleichgewicht der Isomerisierung (14 % *cis*; 3 Maxima: λ_{ϵ} : 211₁₀₇₀, 230₃₄₀ und 346₁₀₁₅ nm; 2 Minima: λ : 221₋₉₁₀, 274₋₈₅₀ nm) und unmittelbar nach 1:100 Verdünnung einer DMSO-Stammlösung in Natriumphosphat-Puffer, pH 7.5 (•••••), diese Probe besitzt noch den *cis*-Gehalt der DMSO-Stammlösung (33 % *cis*; Maximum: λ_{ϵ} : 344₇₆₀, Minimum: 275₋₅₁₆₀ nm). Meßbedingungen: 20°C, c: 0.5 mM, d: 1 mm. Meßbedingungen: Datenintervall: 190-390 nm, DMSO-haltige Lösungen: 220-390 nm, CD: scan speed: 100 nm/min, response: 0.5 s, 16 Akkumulationen, Rauschunterdrückung durch Fourier-Transformation. eingefügte Abb.: Zeitabhängigkeit der Isomerisierung von Ala-Gly- ψ [CS-N]-Pro-Phe-NH-Np unmittelbar nach 1:100 Verdünnung einer DMSO-Stammlösung (33 % *cis*) in 10 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7.5 (14 % *cis*), aufgenommen bei λ :274 nm (Datenintervall 5s, response: 1s) und 20°C. Die Punkte repräsentieren die einzelnen Meßwerte, die Linie stellt deren Anpassung an eine Reaktion 1.Ordnung dar, welche k_{obs} der Isomerisierung liefert. Die Geschwindigkeitskonstante $k_{\text{cis} \rightarrow \text{trans}}$ kann aus k_{obs} berechnet werden (s.Text).

unten: Berechnete Spektren für das *trans*- (—) Isomer (Maximum: λ_{ϵ} : 348₁₂₆₀, Minimum: 273₋₁₁₀₈₀ nm) bzw. *cis*- (•••••) Isomer (Maximum: λ_{ϵ} : 277₇₁₃₀, Minimum: nicht eindeutig zuweisbar) von Ala-Gly- ψ [CS-N]-Pro-Phe-NH-Np.

In den UV/VIS-Spektren wässriger Lösungen von N-Methyl-thioacetamid wurde nach Bestrahlung mit UV-Licht einer Hg-Lampe (λ :253.7 nm) eine bathochrome Verschiebung der Absorptionsmaxima um 5 nm, verbunden mit einer Abnahme des Extinktionskoeffizienten um ca. 10 % beobachtet (Kato et al., 1984). Nach Ausschalten des UV-Lichtes wurde eine Relaxation hin zum Ausgangsspektrum gefunden, die durch die Bestrahlung ausgelösten spektralen Änderungen konnten auf eine Erhöhung des *cis*-Gehaltes zurückgeführt werden.

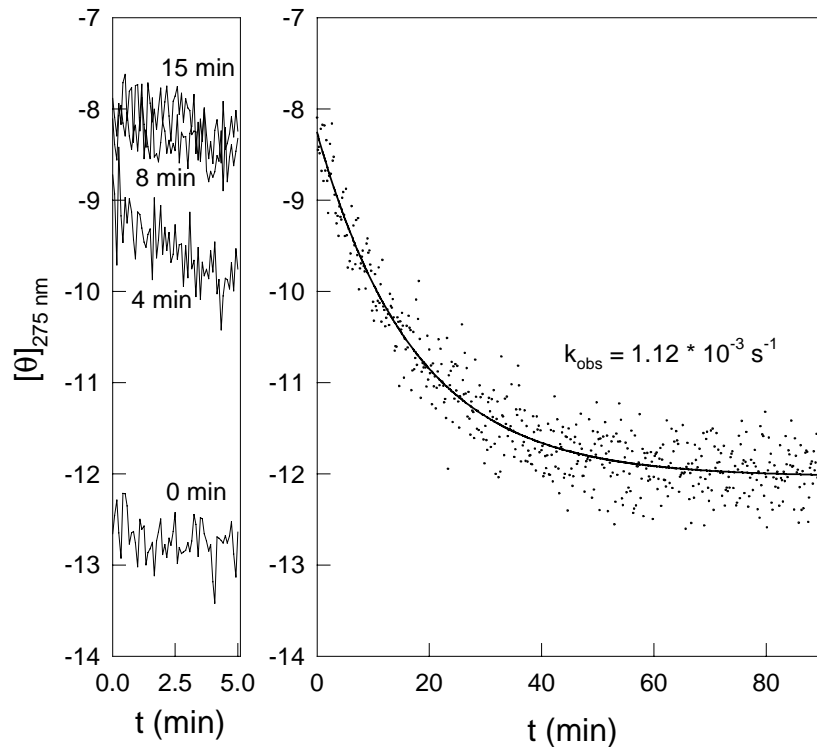


Abb.7: links: Zeitabhängige Messung der CD-Signale von Ala-Gly- ψ [CS-N]-Pro-Phe-NH-Np in 10 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7.5 bei 274 nm (Datenintervall 5s, response: 1s) und 30°C. Der Wert bei 0 min wurde im Zustand des Gleichgewichtes der Isomerisierung (14 % *cis*) gemessen. Danach wurde die Probe für 4 min mit UV-Licht im Wellenlängenbereich zwischen 260 und 280 nm bestrahlt und anschließend wiederum das CD-Signal bei 274 nm gemessen. Eine Vergrößerung des Meßsignals (von -12.7 auf -9 mdeg) wird beobachtet, gleichzeitig wird eine beginnende Relaxation in Richtung des Ausgangswertes sichtbar. Die Unterbrechung des Relaxationsprozesses nach 5 min, Fortsetzung der Bestrahlung mit UV-Licht für weitere 4 min (Σ 8 min) und erneute CD-Messung führte zu einer weiteren Vergrößerung des Signals (-8 mdeg). Eine nochmalige Exposition im UV-Licht für 7 min (Σ 15 min) bewirkte keine weitere Vergrößerung des CD-Signals, verglichen zu dem nach 8 min Bestrahlung erhaltenen Wert.

rechts: Zeitabhängige Messung einer nahezu vollständigen Relaxation der 15 min mit UV-Licht bestrahlten Probe, bei 274 nm und 30°C. Die Anregung mit UV-Licht bewirkt eine Erhöhung des *cis*-Gehaltes von 14 auf 24 %, was die Vergrößerung des Meßsignals erklärt. Die Relaxation stellt eine *cis/trans* Isomerisierung dar, die Anpassung der Meßwerte an eine I.Ordnungsreaktion liefert k_{obs} , aus dem $k_{\text{cis} \rightarrow \text{trans}}$ berechnet werden kann (s.Text).

Gleiches wurde für das Derivat Ala-Gly- ψ [CS-N]-Pro-Phe-NH-Np gefunden. Nach Anregung mit UV-Licht im Wellenlängenbereich zwischen 260 und 280 nm konnte in einer zeitabhängigen Messung eine Vergrößerung der CD-Meßwerte bei 274 nm (von -12.5 auf -8 mdeg) gefunden

werden (vgl. Abb. 7). Verglichen mit den Literaturdaten und den zuvor am Ala- ψ [CS-N]-Pro erhaltenen Ergebnissen, deutete dies auf eine Erhöhung des *cis*-Gehaltes infolge der Bestrahlung hin. Unter den gewählten Bedingungen erreichte die Verschiebung des Meßsignals nach 8 min einen Endwert (vgl. Abb. 7). Die anschließende zeitabhängige CD-Messung zeigte eine Relaxation hin zum Ausgangswert. Durch zweifach wiederholte Exposition der relaxierten Probe im UV-Licht konnte der Vorgang wiederholt werden, was zeigt, daß der beobachtete Prozeß einen reversiblen Gleichgewichtsvorgang beschreibt. Durch parallele Bestimmung des *cis*-Gehaltes eines Aliquots der UV-bestrahlten Probe in einem proteasegekoppelten Test (Fischer et al., 1984) wurde nachgewiesen, daß dieser von 14 auf 24 % erhöht war. Es muß angemerkt werden, daß die hier praktizierte unspezifische Anregung auch einen gewissen Grad an Photozersetzung bewirkte, so daß die Relaxation nach jedem Anregungszyklus nur 85 bis 90% des Ausgangswertes erreichte. Durch eine spezifischere Anregung des Thioxocarbonyls mit Laserlicht entsprechender Wellenlänge und Intensität sollte die Photozersetzung reduziert werden können.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Thioxosubstitution im Peptid eine wertvolle Sonde zur Verfolgung dynamischer Prozesse, die mit der Änderung spektroskopischer Eigenschaften einhergehen, darstellt. Die besondere Bedeutung dieser Ein-Atom-Substitution besteht darin, daß sie eine weitgehend isostere Substitution im Peptidrückgrat ermöglicht, gekoppelt mit der Möglichkeit der spezifischen Anregung nur einer, nämlich der thioxylierten Peptidbindung mit UV-Licht definierter Wellenlänge. Wie hier erstmals gezeigt wurde, eröffnet dies eine neue Möglichkeit der direkten Messung der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung. Der Vorteil besteht darin, daß mittels dieser Methode auch in Gegenwart anderer Effektoren, z.B. Proteinen, gemessen werden kann, weil (i) in CD-Messungen der Absorptionsbereich des Thioxochromophors außerhalb des Fern-UV-Absorptionsbereiches von Sekundärstrukturelementen liegt, und (ii), keine Hilfsprotease benötigt wird, welche Proteine und Peptide hydrolysieren könnte. In Erweiterung dessen wurde nachgewiesen, daß durch spezifische Anregung der thioxylierten Peptidyl-Prolyl-Bindung deren *cis*-Gehalt innerhalb einer relativ kurzen Anregungsphase (< 10 min) erhöht, und die anschließende Relaxation CD-spektroskopisch gemessen werden kann. Somit wird eine prinzipielle Möglichkeit geschaffen, eine „Schalter“-Funktion direkt in ein Polypeptidrückgrat einzubauen, ohne die Struktur des modifizierten Peptides zu beeinflussen.

Die potentielle biologische Relevanz thioxylierter Peptidbindungen wird durch eine kürzlich erstmals beschriebene Thioxosubstitution in einem nativen Protein unterstrichen (Ermler et al., 1997). Für das mittels Röntgenkristallstrukturanalyse untersuchte Enzym Methyl-Coenzym M aus dem thermophilen Archaeobakterium *Methanobacterium thermoautotrophicum* wurde eine Thioxylierung des Gly445, die möglicherweise für den Katalysemechanismus des Enzyms bedeutsam ist, aus den berechneten Daten abgeleitet.

2.2. Nichtenzymatische Reaktionen von Thioxozeptid-Derivaten

2.2.1. Reaktion der N-terminalen Aminogruppe mit Formaldehyd

Es wurde beobachtet, daß bei thioxylierten Tetrapeptid-4-nitroaniliden der Struktur Ala-ψ[CS-NH]-Xaa-Pro-Phe-NH-Np (Xaa: Gly, Ala) in 100 mM TRIS / 1 mM DTT eine Umwandlung zu noch thioxylierten, in der HPLC hydrophoberen Produkten stattfindet, die ein um 12 g/mol höheres Molekulargewicht besitzen. Die massespektrometrische und NMR-Analyse des mittels präparativer HPLC isolierten Umwandlungsproduktes aus Ala-ψ[CS-NH]-Ala-Pro-Phe-NH-Np zeigte, daß es sich hierbei um die entsprechende, durch Umsatz mit stöchiometrischen Mengen Formaldehyd entsprechend Gleichung



gebildete, Schiff'sche Base handelt. Die in den Positionen 2 bis 4 thioxylierten Tetrapeptid-4-nitroanilide bzw. die entsprechenden Oxo-Verbindungen Ala-Xaa-Pro-Phe-NH-Np zeigten unter vergleichbaren Bedingungen diese Reaktion nicht. Bei letzteren beobachtet man erst in Anwesenheit einer 1000-fachen Formaldehydkonzentration (10 Vol.% im Ansatz) im schwach alkalischen Milieu (35 mM Hepes, pH 7.8 oder 10 mM KOH, pH 12) eine vergleichbare Umwandlung, die jedoch mit der Bildung von mehreren Nebenprodukten einhergeht.

Das Absorptionsmaximum der Thioxozeptidbande des Azomethins ist um 5 nm bathochrom verschoben, der Extinktionskoeffizient im Maximum ist ca. 10% höher im Vergleich zur Ausgangsverbindung (vgl. Abb.8). Trotz der geringen Molekulargewichtsdifferenz von 12 g/mol sind beide Verbindungen in der HPCE voneinander trennbar.

Die Umwandlungsgeschwindigkeit ist temperaturabhängig. Bei in destilliertem Wasser gelöstem Ala-ψ[CS-NH]-Xaa-Pro-Phe-NH-Np (Xaa: Gly, Ala; pH 4-5, wegen des Trifluoracetats) tritt diese Umwandlung nicht auf, läßt sich aber durch Zusatz von Methanol (40 Vol.% im Ansatz) bzw. durch Formaldehyd (0.01 Vol.% im Ansatz) erreichen. Sowohl die Synthese von TRIS-Puffer als auch die von Methanol verlaufen über Vorstufen, an denen Formaldehyd beteiligt ist. Verbleibende Spuren desselben könnten die beschriebenen Effekte bedingen. Bei Verwendung anderer Puffer (Hepes, Morpholinethansulfonsäure, Piperazin, Natriumcarbonat, Natriumphosphat; alle pH 7.5) bzw. Zusatz anderer Alkohole (Ethanol, Propanol) traten diese Umwandlungen nicht auf. Sättigt man TRIS-Puffer vor dem Lösen des Thioxozeptids mit dem Formaldehyd bindenden Dimedon ab (Löslichkeit in Wasser bei 25°C: 4,16 g/l; = 29,67 mM), wird die Umwandlung zur Schiff'schen Base fast vollständig unterdrückt. Andererseits reichen wiederum Spuren von Formaldehyd in Wasser (0.01 Vol.%)

aus, um das Thioxoarylamid Phe- ψ [CS-NH]-Np in das Azomethin N-Methyliden-Phe- ψ [CS-NH]-Np zu überführen.

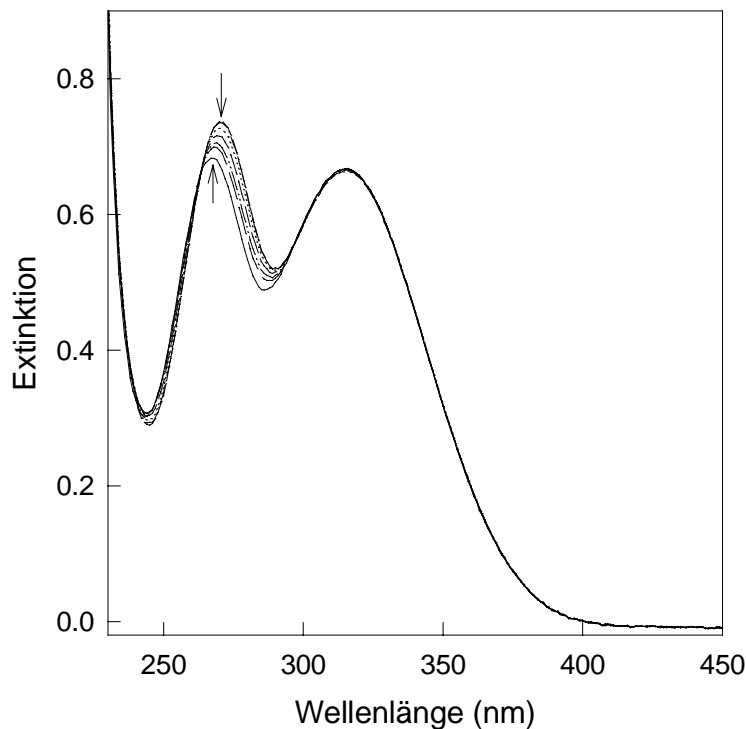
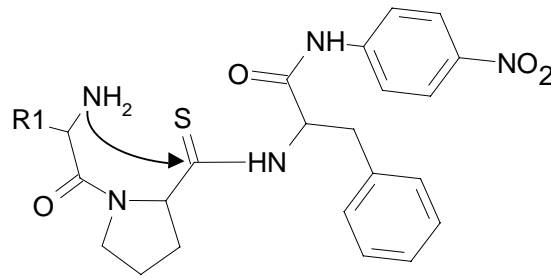


Abb.8: Veränderung des UV/VIS-Spektrums von Ala- ψ [CS-NH]-Ala-Pro-Phe-NH-Np (in H₂O, pH 4.5, c: 70 μ M, d: 1 cm) nach Reaktion mit 3 μ l (35%; 0.1% im Ansatz) Formaldehyd unter Bildung der Schiff'schen Base N-Methyliden-Ala- ψ [CS-NH]-Ala-Pro-Phe-NH-Np. Es wurden 7 Spektren im Abstand von 3 Minuten aufgenommen. Die Messungen erfolgten bei 20°C. Die Thioxocarbonyl-Bande wird bathochrom vom 267 nm (\uparrow) zu 270 nm (\downarrow) verschoben, der Extinktionskoeffizient erhöht sich von $\epsilon_{264}=10\ 375$ auf $\epsilon_{269}=11\ 410$. Die Bande des 4-Nitroanilid-Restes bei 318 nm bleibt unverändert.

2.2.2. Intramolekular nucleophile Reaktion der N-terminalen Aminogruppe

Ausgangspunkt dieser Beobachtungen waren Untersuchungen von Zellhomogenaten aus *E.coli*, *S.cerevisiae* und Schweineniere auf Thioxopeptidbindungen hydrolysierende enzymatische Aktivitäten. Eine Hydrolyse der Thioxopeptidbindung bei Inkubation mit Homogenat sollte spektrophotometrisch durch die damit einhergehende Verringerung der Absorption bei 270 nm detektierbar sein. Im Fall von Thioxotetrapeptid-4-nitroaniliden der Struktur Ala-Xaa-Pro- ψ [CS-NH]-Phe-NH-Np (Xaa: Gly, Ala, Val) wurde eine Absorptionsabnahme der -C=S Bande gefunden. Nachfolgende Analysen ergaben jedoch, daß dies auf eine nichtenzymatische Umwandlung zurückzuführen war. Diese fand nach der enzymatischen, wahrscheinlich durch eine Aminopeptidase des Zellhomogenates katalysierten, Abspaltung des N-terminalen Alanins an den verbleibenden Thioxotripeptid-4-

nitroaniliden Xaa-Pro-ψ[CS-NH]-Phe-NH-Np statt. Dabei erfolgt ein nucleophiler Angriff der Aminogruppe auf den Carbonylkohlenstoff der zweiten (thioxylierten) Aminosäure (s. Abb.9).



R ₁	Xaa ₁	HWZ (min)
-H	Gly	5
-CH ₃	Ala	71
-CH(CH ₃) ₂	Val	180

Abb.9: Nucleophiler Angriff der N-terminalen Aminogruppe auf den Thioxocarbonyl-Kohlenstoff der zweiten Aminosäure unter Abspaltung von H₂S und Bildung eines 2-Keto-5-amino-4,5-Dehydropiperazin-Derivates. Die Reaktionen fanden in 35 mM Hepes, pH 7.8 bei 25°C statt. Die Tabelle gibt die Halbwertszeiten der Zyklisierung in Abhängigkeit von der Seitenkette der vor Pro stehenden Aminosäure an.

Unter Abspaltung von H₂S bildet sich ein zyklisches, durch Tautomerie stabilisiertes 2-Keto-5-amino-4,5-Dehydropiperazin-Derivat (s.Abb.10).

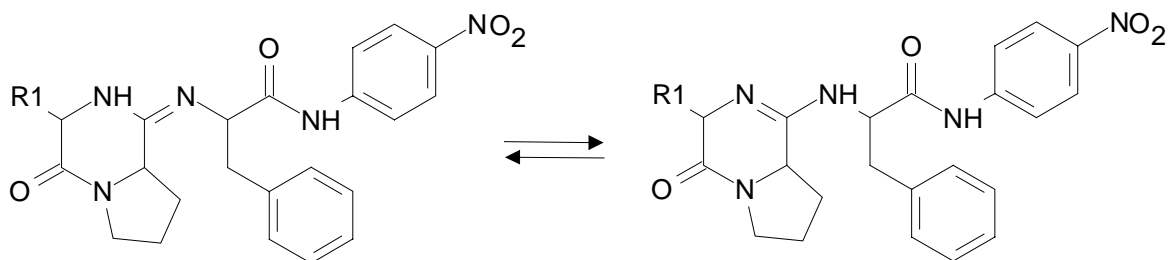


Abb.10: Tautomerie-Stabilisierung der zyklischen 2-Keto-5-amino-4,5-Dehydropiperazin-Umwandlungsprodukte von Xaa-Pro-ψ[CS-NH]-Phe-NH-Np (Xaa: Gly, Ala, Val).

Der nucleophile Angriff muß über das *cis*-Konformere verlaufen, damit die Ringbildung sterisch möglich wird. Der *cis*-Anteil in Xaa-Pro Bindungen ist wahrscheinlich der Grund, weshalb diese Reaktion vorwiegend bei Thioxopeptid-Derivaten mit einem thioxylierten Pro in Position 2 der Aminosäuresequenz (Xaa-Pro-ψ[CS-NH]-R) beobachtet wird. Derivate mit Xaa = Gly zyklisieren mit einer HWZ von 5 min sehr viel schneller als solche mit Ala oder Val in dieser Position (vgl.Abb.9). Dies kann sowohl auf den vergleichsweise höheren *cis*-

Gehalt der Gly-Pro Bindung als auch auf deren größere Flexibilität zurückgeführt werden. Der Verlust des Thioxochromophors im Zuge der Zyklisierungsreaktion kann spektrophotometrisch verfolgt und die Geschwindigkeitskonstante der Umwandlung bestimmt werden (s. Abb. 11). Die zeitabhängige Abnahme des Meßsignals im Maximum der Thioxocarbonyl-Bande folgt einer Reaktion I. Ordnung, was den postulierten intramolekularen Reaktionsmechanismus stützt.

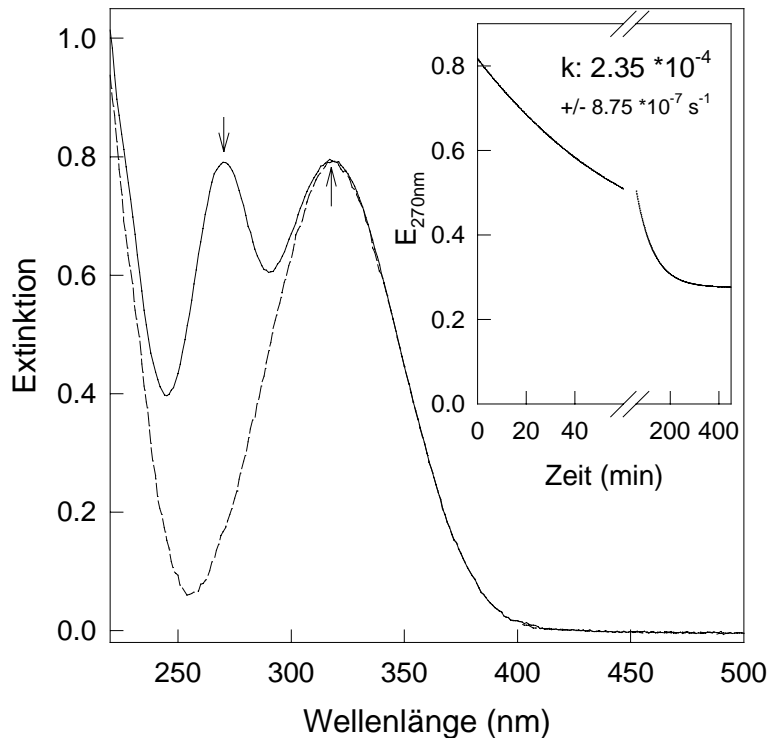


Abb. 11: Spektren von Ala-Pro- ψ [CS-NH]-Phe-NH-Np (—) und dessen zyklischen Umwandlungsproduktes (---) in 35 mM Hepes, pH 7.8 bei 25°C. Der Thioxochromophor bei 270 nm (\downarrow) verschwindet mit der Bildung der 2-Keto-5-amino-4,5-Dehydropiperazin-Derivate, die Bande des 4-Nitroanilid-Restes bei 318 nm (\uparrow) bleibt unverändert. Die eingefügte Abbildung zeigt, daß die Messung der Extinktionsabnahme des Thioxochromophors über die Zeit eine direkte Verfolgung der Reaktion ermöglicht, der Kurvenverlauf folgt einer I. Ordnung-Reaktion und ermöglicht so die Berechnung der Geschwindigkeitskonstante.

Bei Thioxotetrapeptid-Derivaten, die in Position 2 eine andere thioxylierte Aminosäure als Pro enthalten, z.B. Ala-Gly- ψ [CS-N]-Pro-Phe-NH-Np und Ala-Ala- ψ [CS-N]-Pro-Phe-NH-Np, wurde bei Langzeitinkubation in Puffer (100 mM TRIS, 1 mM DTT; pH 7.5) die Ringbildung ebenfalls beobachtet. Sie verläuft jedoch mit einer um mindestens 2 Größenordnungen langsameren Geschwindigkeitskonstante als bei den Xaa-Pro- ψ [CS-NH]-R-Derivaten ab, am thioxylierten Glycin jedoch fünffach schneller als am thioxylierten Ala. Die entstehende C=N Bindung ist wegen des folgenden Prolins nicht durch Tautomerie stabilisierbar (vgl. Abb. 12).

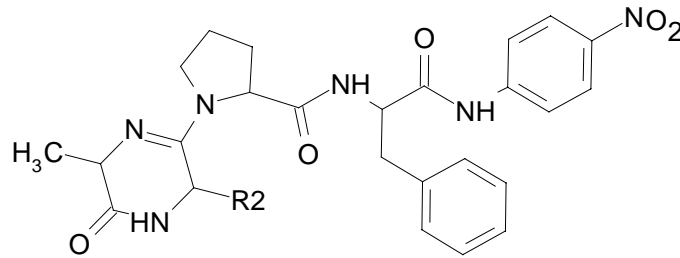


Abb.12: Die Zyklisierungsreaktion der zwei N-terminalen Aminosäurereste, unter H_2S -Abspaltung und Bildung eines zyklischen Derivates, wird auch bei Thioxotetrapeptid-4-nitroaniliden der Struktur Ala-Xaa- ψ [CS-N]-Pro-Phe-NH-Np (Xaa: Gly, Ala) beobachtet, jedoch verläuft die Reaktion hier mit HWZ von 30 Stunden (Xaa = Gly) bzw. ca. 6 Tagen (Xaa = Ala) hundertfach langsamer als bei den voranstehend beschriebenen Verbindungen. Die Reaktionen fanden in 100 mM TRIS, 1 mM DTT, pH 7.5 bei 25°C statt.

Eine hohe Tendenz zur Zyklisierung zeigte das Dipeptid-Thioxyarylamid Ala-Pro- ψ [CS-NH]-Np (vgl. Abb.13). Während das Thioxotripeptid-Derivat Ala-Pro- ψ [CS-NH]-Phe-NH-Np als 0.5 mM wässrige Lösung (pH 3.5, wegen des Trifluoracetats) und in 100 mM Natriumcitrat; pH 5.5 stabil war, und die Umwandlung erst im schwach alkalischen Puffer (35 mM Hepes, pH 7.8) beobachtet wurde, findet diese beim Ala-Pro- ψ [CS-NH]-Np schon unter leicht sauren Bedingungen (100 mM Natriumcitrat; pH 4.5) zu einem 34 g/mol leichteren Produkt statt (vgl. Abb.13). Die HWZ unter diesen Bedingungen beträgt 21 min. Stabil ist das Thioxyarylamid nur in einer Acetonitril/Wasser/Trifluoracetat-Mischung, pH 3. Die Ursachen für diesen Effekt liegen in der Elektronen ziehenden Wirkung des 4-Nitroanilidrestes auf den Carbonylkohlenstoff des Prolins und im Einfluß des Thioxy-Substituenten begründet, die den nucleophilen Angriff der N-terminalen Aminogruppe auf den Carbonylkohlenstoff erleichtern.

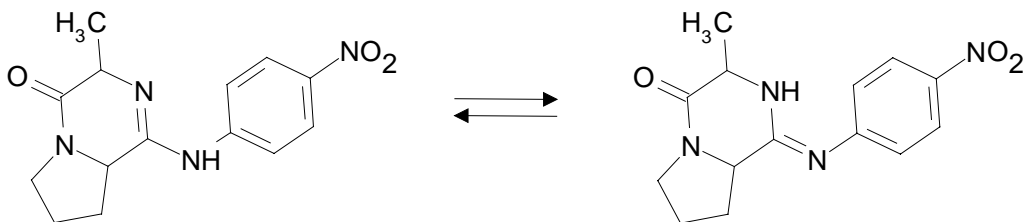


Abb.13: Zyklisches Umwandlungsprodukt des Thioxyarylamids Ala-Pro- ψ [CS-NH]-Np unter Abspaltung von H_2S und Bildung eines 2-Keto-5-amino-4,5-Dehydropiperazin-Derivates. Die Reaktionen fanden in 35 mM Hepes, pH 7.8 bei 25°C statt. Die Abbildung zeigt die bei pH 3 zu findende protonierte Form der Verbindung, bei $\text{pH} > 7$ ist die Amidinofunktion deprotoniert.

Das Umwandlungsprodukt wurde isoliert und durch NMR-Untersuchung als das entsprechende 2-Keto-5-amino-4,5-Dehydropiperazin-Derivat (Abb.13) identifiziert. Es zeigt in Abhängigkeit vom pH-Wert sich unterscheidende UV/VIS Spektren. Während im leicht

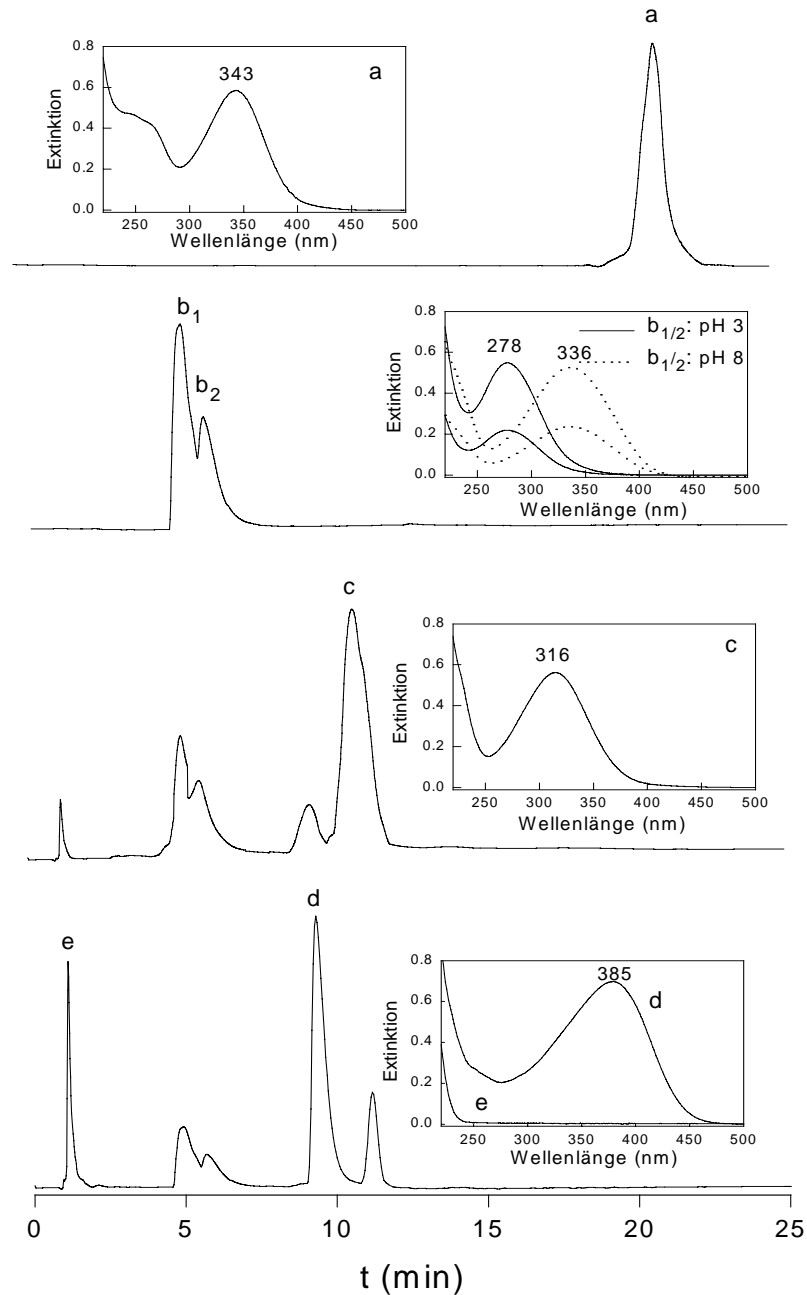


Abb.14: HPLC-Chromatogramme und UV/VIS Spektren von Ala-Pro- ψ [CS-NH]-Np (**a**) und dessen Umwandlungsprodukten (**b-e**): (**a**) 50 μ M (d: 1cm) des Thiooxoarylamides in Acetonitril-Wasser-TFA, pH 3; (**b**) intermediäres 2-Keto-5-amino-4,5-Dehydropiperazin-Derivat in 35 mM Hepes, pH 7.8 (----) bzw. H₂O-HCl, pH 2 (—), Spektrenform und Molekulargewicht von b_1 und b_2 sind identisch, sie repräsentieren wahrscheinlich D- und L-Konformere; (**c**) Hydrolyse des Intermediates zu D,L-Ala-Pro-NH-Np (in H₂O, pH 5); (**d**) DP IV katalysierte Proteolyse von L-Ala-Pro-NH-Np zu Ala-Pro (**e**) und 4-Nitroanilin (in 35 mM Hepes, pH 7.8), der hypothetische Anteil D-Ala-Pro-NH-Np wird nicht hydrolysiert. HPLC-Bedingungen: Gradient aus ACN-Wasser-TFA, pH 3; 10-35 % ACN, 1%/min; Fluß: 1ml/min; λ :220 nm; Säule: Merck-LiChrospher RP 8, 125*4 mm, 5 μ m.

basischen Milieu (35 mM Hepes; pH 7.8) und auch bei pH 12 (10 mM KOH) das Absorptionsmaximum bei 336 nm liegt, verschiebt es sich bei einem Sprung auf pH 2 (HCl) zu 278 nm (vgl. Abb. 14). Die bathochrome Spektrenverschiebung im basischen Milieu beruht wahrscheinlich auf der Deprotonierung der Amidino-Gruppe, das freie Elektronenpaar kann über die benachbarten konjugierten π -Elektronen delokalisiert werden. Durch wiederholte pH-Sprünge sind diese beiden Formen reversibel ineinander überführbar. Die Form des Intermediat-Spektrums im basischen ähnelt sehr dem der Ausgangsverbindung ($\lambda_{\text{max.}}$: 244 und 343 nm), die Schulter der Thioxo-Bande ist jedoch nicht mehr zu sehen.

In einer HPLC-Analyse des Umwandlungsproduktes eluierten unmittelbar aufeinanderfolgend zwei Fraktionen (vgl. Abb. 14), die Analyse der Peaks zeigte identische Spektren, und auch das Molekulargewicht beider Fraktionen war identisch, es entsprach dem des 2-Keto-5-amino-4,5-Dehydropiperazin-Derivates. Das Konzentrationsverhältnis dieser zwei Fraktionen war im Verhältnis von ca. 70 : 30 zu der HPLC-hydrophileren Form hin verschoben.

Der gebildete Zyklus ist in DMSO stabil, im wäßrigen Puffer hydrolysiert er sehr langsam, mit einer HWZ von ca. 3 Tagen bei 25°C in 35 mM Hepes, pH 7.8. Dabei wird der Ring wieder geöffnet, die Bindung zum 4-Nitroanilid bleibt bestehen. Aus der Ringöffnung resultiert letztlich das nicht mehr thioxylierte Analoge Ala-Pro-NH-Np (vgl. Abb. 14). Letzteres zeigt im schwach alkalisch wäßrigen Puffer ebenfalls Hydrolyse und Diketopiperazin-Bildung, im Vergleich zum Ala-Pro- ψ [CS-NH]-Np jedoch mit mehr als 4 Größenordnungen reduzierten Geschwindigkeitskonstanten.

Ala-Pro-NH-Np ist ein Substrat für die Exoprotease DP IV, eine Analyse des Ala-Pro- ψ [CS-NH]-Np hinsichtlich Substrateigenschaften war wegen der beschriebenen Instabilität in neutral-wäßrigen Puffern nicht möglich, auch das zyklische Intermediat wird nicht als Substrat erkannt. Das nach Ringöffnung resultierende Ala-Pro-NH-Np ist ein Substrat der DP IV, jedoch erfolgte die enzymatische Hydrolyse nicht vollständig (vgl. Abb. 14). Bei einer Langzeitinkubation wurde gefunden, daß beide HPLC-Fraktionen des 2-Keto-5-amino-4,5-Dehydropiperazin-Derivates zu Ala-Pro-NH-Np hydrolysieren, dieses eluiert in der HPLC-Analyse jedoch in Form nur einer Fraktion. Diese wurde auf Substrateigenschaften für die DP IV untersucht. Es zeigte sich, daß nur ca. 70% des so gebildeten Ala-Pro-NH-Np hydrolysiert wurden, während der verbleibende Rest auch bei Langzeitinkubation hydrolyseresistent war.

Aus diesen Ergebnissen wurde die Hypothese abgeleitet, daß eine Racemisierung im Zuge der zwei Umwandlungsreaktionen erfolgt sein muß. Es ist anzunehmen, daß die Amidino-Funktion des zyklischen Intermediates (vgl. Abb. 13) eine elektronenziehende Wirkung auf die C_{α} -H Gruppe des benachbarten Prolins ausübt, was zu einer Erhöhung von deren C-H Acidität, und in Folge dessen, zu einer Racemisierung führt. Somit würde ein Teil des gebildeten Ala-Pro-NH-Np ein D-Pro in P₁-Position enthalten. Derivate mit P₁-D-Pro sind

keine Substrate der DP IV, deshalb wird nur eine teilweise DP IV katalysierte Hydrolyse beobachtet.

2.2.3. Hohe Basenstabilität von Peptidderivaten der Struktur R-ψ[CS-NH]-Phe-NH-Np und R-Phe-ψ[CS-NH]-Np

Die Thioxoarylamidbindungen in Derivaten wie z.B. Ala-Xaa-Pro-Phe-ψ[CS-NH]-Np (Xaa: Gly, Ala) und Ala-Phe-Gly-ψ[CS-NH]-Np, sind einer basischen Hydrolyse kaum oder gar nicht zugänglich, während nichtthioxylierte Arylamidbindungen leicht hydrolysierbar sind (vgl.Tab. zu Abb.16). Die elektronenziehende Wirkung der 4-Nitroanilid-Gruppe und die Fähigkeit des Schwefels der Thioxocarbonyl-Gruppe, Ladungen zu delokalisieren, bewirken eine erleichterte Deprotonierung des Stickstoffs der Thioxoamidbindung unter basischen Bedingungen, indem sie die anionische Struktur stabilisieren (vgl.Abb.15). Die negative Ladung des Anions unterbindet den nucleophilen Angriff eines Hydroxid-Ions auf den Thioxocarbonyl-Kohlenstoff, und verhindert somit die Hydrolyse der Thioxoarylamid-Bindung.

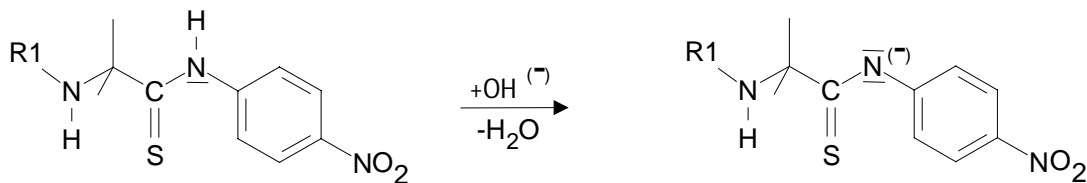
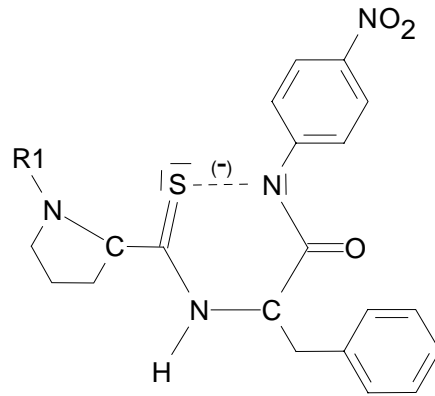


Abb.15: Die hohe Basenstabilität der Thioxoarylamid-Bindung ist auf die Deprotonierung des Amidstickstoffs zurückzuführen. Der Carbonylkohlenstoff der anionischen Thioxoarylamid-Bindung kann nicht mehr nucleophil durch ein Hydroxid-Ion angegriffen werden.

Überraschend war hingegen die ebenfalls deutlich erhöhte Basenstabilität von Thioxoamid-Derivaten der Struktur Ala-Xaa-Pro-ψ[CS-NH]-Phe-NH-Np (Xaa: Gly, Ala, Val). In 100 mM KOH zeigten sie keine Hydrolyse des 4-Nitroanilid-Restes, in Gegenwart von 2M KOH im Reaktionsansatz verlief diese nur sehr langsam (vgl.Abb.16) mit HWZ zwischen 27 und 95 Minuten. Nach der schnellen Deprotonierung des Arylamid-Stickstoffes, die sich in einem bathochrom verschobenen UV/VIS-Spektrum des Anions widerspiegelt, und die bei der zeitabhängigen Messung im Maximum des freien 4-Nitroanilins bei 385 nm einen Absorptionssprung bewirkt, geht die eigentliche Hydrolyse nur sehr langsam weiter, die beiden Phasen sind deutlich voneinander unterscheidbar. Die langsame Phase kann an eine Reaktion I. Ordnung angepaßt, und die Geschwindigkeitskonstante berechnet werden. Dies weist darauf hin, daß die langsame Phase tatsächlich die Hydrolyse der Arylamidbindung, die einer pseudo-I.-Ordnungsreaktion folgt, darstellt.



Peptid-Derivat	Hydrolyse der Arylamidbindung Halbwertszeiten (min)	
	100 mM KOH	2 M KOH
Ala-Ala-Pro-Phe-NH-Np	48	<< 1
Ala-ψ[CS-NH]-Ala-Pro-Phe-NH-Np	63	<< 1
Ala-Ala-ψ[CS-N]-Pro-Phe-NH-Np	39	<< 1
Ala-Ala-Pro-ψ[CS-NH]-Phe-NH-Np	n.m.	95
Ala-Gly-Pro-ψ[CS-NH]-Phe-NH-Np	n.m.	27
Ala-Val-Pro-ψ[CS-NH]-Phe-NH-Np	n.m.	86
Ala-Ala-Pro-Phe-ψ[CS-NH]-Np	n.m.	> 180

Abb.16: Postulierte Stabilisierung der anionischen Form von Thiopeptid-4-nitroaniliden der Struktur Ala-Xaa-Pro-ψ[CS-NH]-Phe-NH-Np (Xaa: Gly, Ala, Val), die eine erhöhte Resistenz der Arylamidbindung gegenüber basischer Hydrolyse bewirkt. Die Tabelle gibt die Halbwertszeiten für die basische Hydrolyse des 4-Nitroanilid-Restes an verschiedenen Positionen thioxylierter Tetrapeptid-4-nitroaniliden an. Die spektroskopischen Messungen erfolgten über 30 min bei 25°C und λ: 385 nm. n.m.: Hydrolyse war nicht meßbar, s. Text.

Die erhöhte Basenstabilität ist eindeutig an die Thioxylierung der Peptidbindung, die der Arylamidbindung unmittelbar vorausgeht, gebunden (vgl.Tab. zu Abb.15). Die entsprechenden in den Positionen 1 und 2 der Aminosäuresequenz thioxylierten Tetrapeptid-4-Nitroanilide bzw. das Oxo-Derivat Ala-Ala-Pro-Phe-NH-Np zeigen diese Eigenschaft nicht, bei einer Konzentrationen von 2M KOH erfolgt eine sehr schnelle (HWZ < 1s) vollständige Abspaltung des 4-Nitroanilides. Eine erleichterte Deprotonierung der Arylamidbindung, möglicherweise begünstigt durch eine transannulare, über eine zyklische Struktur führende, Delokalisation der negativen Ladung des Stickstoffes auf freie d-Orbitale des Schwefels, und somit eine Stabilisierung des Anions der Derivate Ala-Xaa-Pro-ψ[CS-NH]-Phe-NH-Np wäre zu diskutieren (vgl.Abb.16). Alternativ käme eine, durch die Basizität der Thioxocarbonylgruppe ausgelöste, Fortpflanzung induktiver Effekte, die allerdings über drei kovalente Bindungen hinweg verlaufen müßte, in Frage.

3. Untersuchungen zum Einfluß der Thioxosubstitution im Peptidrückgrat auf die proteasekatalysierte Peptidbindungshydrolyse

Im voranstehenden Kapitel wurde gezeigt, daß die Thioxylierung der Peptidbindung deren physikalisch-chemische Eigenschaften verändert. Im Folgenden sollen diese Untersuchungen auf ein biologisches System ausgedehnt, und konkret am Beispiel der Protease-Substrat bzw. Protease-Inhibitor Wechselwirkungen untersucht werden.

In der proteasekatalysierten Peptidbindungshydrolyse erfolgt der nucleophile Angriff auf den Carbonylkohlenstoff der Peptidbindung nach zwei grundlegenden Mechanismen. In den Gruppen der Serin-, Cystein- und Carboxylat- (sauren) Proteasen greift ein Alkoholat-, Thiolat- bzw. carboxylaktiviertes Hydroxid-Ion am Carbonylkohlenstoff an, in der Gruppe der Metalloproteasen hingegen ist es ein Metall-Ion, das als Lewis-Säure elektrophil am Carbonylsauerstoff angreift, somit die Elektrophilie des Carbonylkohlenstoffes erhöht und den nucleophilen Angriff durch einen funktionellen Glu-Rest des Enzyms erleichtert (Übersicht: Schellenberger, 1989). Variationen zum Motiv der katalytischen Triade der Serinproteasen in Form katalytischer Ser/Thr-Lys Diaden werden in bakteriellen Proteasen gefunden (Übersicht: Paetzel & Dalbey, 1997). Proteasomen sind ATP-abhängige intrazelluläre Proteasen, die für den Proteinabbau in der Zelle verantwortlich sind. Sie besitzen eine oligomere Struktur, große Molekulargewichte (bis 2000 KD) und weisen multiple Peptidaseaktivitäten, die auf mehreren katalytisch aktiven Untereinheiten lokalisiert sind, auf. Diese Untereinheiten besitzen an ihrem N-Terminus einen katalytisch aktiven Thr-Rest, dessen freie Aminogruppe gleichzeitig die Funktion der Base der katalytischen Diade übernimmt. (Coux et al., 1996; Goldberg et al., 1997; Tanaka, 1998). Calpaine sind Calcium-abhängige Cystein-Proteinasen, sie liegen in der Zelle in oligomerer Form vor, Ca^{++} -Ionen verursachen deren Dissoziation in katalytisch aktive 80 kD Untereinheiten. (Übersichten: Bond & Butler, 1987; Suzuki et al., 1995; Sorimachi et al., 1997; Carafoli & Molinari, 1998).

Obwohl der prinzipielle Ablauf der enzymkatalysierten Peptidbindungshydrolyse der hier näher untersuchten Serin- und Cysteinproteasen weitgehend geklärt ist, sind die mechanistischen Details des Katalyseprozesses noch immer Gegenstand intensiver Forschungen. Vor allem ist die Bewertung der energetischen Beiträge einzelner Komponenten des Katalyseapparates zur Hydrolyse einer Peptidbindung schwierig, da dessen Elemente funktionell miteinander verknüpft sind und konzertiert agieren. Eine Möglichkeit, spezifische Komponenten gezielt zu beeinflussen, besteht darin, einzelne funktionelle Aminosäurereste

des Proteins durch ortsspezifische Mutagenese auszutauschen, und deren Auswirkungen zu untersuchen. So konnten z.B. die energetischen Beiträge der Aminosäurereste der katalytischen Triade zur Katalyse des Subtilisins ermittelt werden (Carter & Wells, 1988). Die Beiträge der Asn155 Seitenkette des Subtilisin BPN bzw. der Gln19 Seitenkette des Papains als Donoren von HB für die Oxyanionenhöhle wurden auf gleiche Weise ermittelt (Übersicht: Menard & Storer, 1992). Die Komponenten des katalytischen Apparates der Serin- und Cysteinproteasen sind im folgenden zusammengefaßt:

- Wechselwirkungen der Aminosäurereste des Substrates bzw. Inhibitors mit den entsprechenden Sekundärbindungsstellen der Bindungsfurche der Protease, für deren Bezeichnung die von (Schechter & Berger, 1967) vorgeschlagene Nomenklatur verwendet wurde (vgl. Abb.17). Neben den zahlreichen HB von Amid- und Carbonylresten des Peptidrückgrates zum Protein treten auch Interaktionen zwischen den Seitenketten des Peptids und der Proteinmatrix der Protease auf, so z.B. zwischen der hydrophoben S₄-Bindungstasche im Subtilisin und aromatischen Aminosäureresten des Substrates.

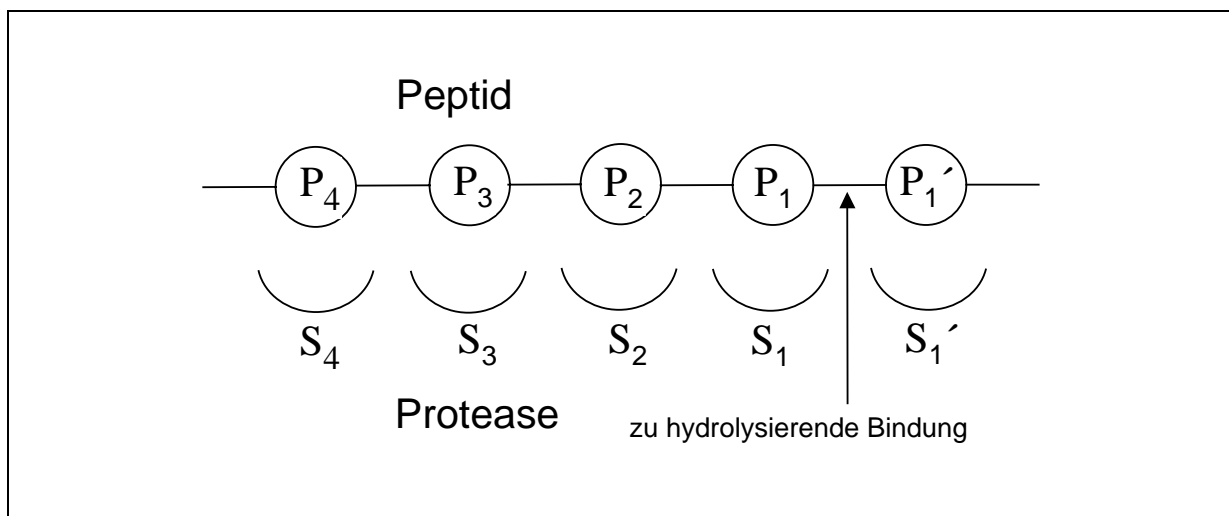


Abb.17: Schematische Darstellung der Enzym-Substrat Wechselwirkungsbereiche entsprechend der Nomenklatur von (Schechter & Berger, 1967). Mit „P“ werden die einzelnen Aminosäurereste des gebundenen Peptids bezeichnet, „S“ kennzeichnet die entsprechenden Bindungsregionen (Sekundärbindungsstellen) im Protein.

- Von entscheidender Bedeutung für die Spezifität sind die P₁-S₁ Wechselwirkungen, so z.B. die ionischen Interaktionen zwischen P₁ Arg/Lys und Asp189 am Boden der S₁-Bindungstasche des Trypsins. Weiterhin existiert in Serinproteasen vom Chymotrypsin- bzw. Subtilisin-Typ eine HB zwischen dem P₁-NH und dem Carbonylsauerstoff des reaktiven Serylrestes.

- Die Bildung des Michaelis-Komplexes bewirkt eine Desolvatation des His und Ser der katalytischen Triade der Serinproteasen. Konzertiert mit der Substratbindung wird eine Verkürzung des Asp-His Abstandes der katalytischen Triade postuliert, wodurch möglicherweise die HB vom Asp zum His-NH_{δ1} in eine LBHB¹ umgewandelt wird (Cleland & Kreevoy, 1994, 1995; Frey et al., 1994; Frey, 1995; Cassidy et al., 1997) (vgl. Abb.18).
- Im Zuge dieser LBHB Bildung bzw. der alternativ diskutierten, rein elektrostatischen Komplementation von Ladungen zwischen Enzym und Substrat (Warshel et al., 1989; 1995), wird die Basizität des katalytisch aktiven His um bis zu fünf pH-Einheiten erhöht. In einer wiederum konzertierten Aktion abstrahiert dieses vom Ser ein Proton, das Seryl-Alkoholat-Anion greift nucleophil den P₁ Carbonylkohlenstoff des Substrates an. Im Falle der Cysteinproteasen liegen die katalytisch aktiven Seitenketten der His159-Cys25 Diade (Papain-Nomenklatur) bereits im Grundzustand als Imidazolium-Thiolat Ionenpaar vor.

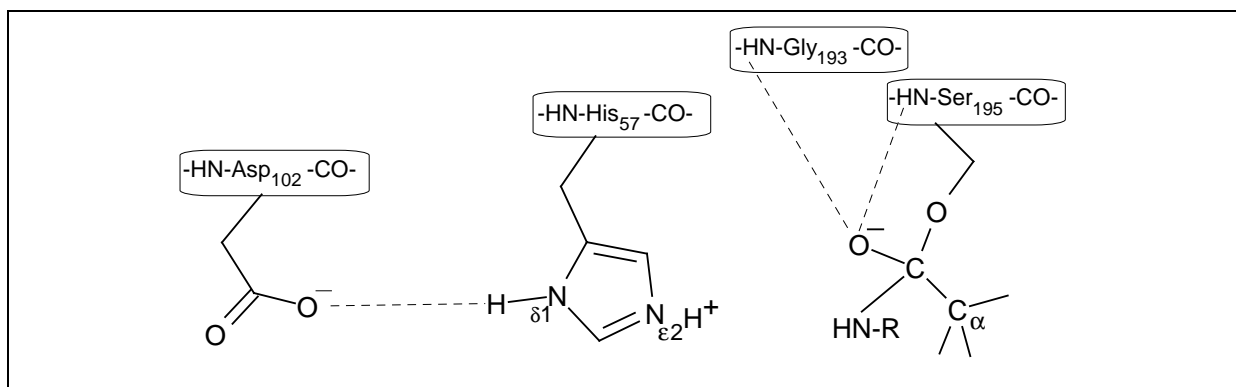


Abb.18: Schematische Darstellung der katalytischen Triade und der Wechselwirkung des Oxyanions mit den Elementen der Oxyanionenhöhle am Beispiel der Serinprotease α -Chymotrypsin. Die gepunkteten Linien markieren Wasserstoffbrückenbindungen.

- Der im tetrahedralen Intermediat als Oxyanion vorliegende Carbonylsauerstoff wird durch zwei HB in der Oxyanionenhöhle stabilisiert (vgl. Abb.18). Die HB kommen vom Amidstickstoff des katalytisch aktiven Ser und vom Seitenkettenamid des Asn155 (Subtilisin) bzw. dem Peptidrückgrat-Amid des Gly193 (Chymotrypsin). Beim Papain sind es HB vom Peptidrückgrat-Amid des Cys25 und von der Seitenkette von Gln19. Zum

¹LBHB: low barrier hydrogen bond: Eine LBHB kennzeichnet eine kurze, starke Wasserstoffbrückenbindung, die mit 12-24 kJ/mol einen höheren energetischen Beitrag zur Bindungsstabilisierung leistet als eine gewöhnliche Wasserstoffbrückenbindung mit 2.4-12 kJ/mol. Eine LBHB entsteht, wenn der Abstand zwischen den Heteroatomen kleiner als die Summe der van der Waals Radien, und die Differenz der pKa-Werte der Hetero-Atome annähernd Null ist (Cleland & Kreevoy, 1994; Frey et al., 1994).

gegenwärtigen Zeitpunkt ist nicht geklärt, ob es sich hierbei um einfache HB handelt (Henderson, 1970; Robertus et al., 1972 b), oder ob möglicherweise eine Protonierung des tetrahedralen Intermediates (im Folgenden: TI) in der Oxyanionenhöhle durch ein Amidproton des Proteinrückgrates stattfindet, die gleichzeitig einen Konformationswechsel des TI von der für die Substratbindung günstigen zu einer für die Produktabspaltung optimalen Konformation bewirkt (Übersicht: Fischer & Barth, 1981).

- Durch Rotation der zu hydrolysierenden C-N Bindung in eine Position, die antiperiplanar zu je einem Elektronenpaar der beiden beteiligten Hetero-Atome ist, wird unter Protonierung durch das His die Aminogruppe ausgestoßen und ein intermediäres Acylenzym gebildet (Deslongchamps et al., 1975; Kuo et al., 1983). Unter der Annahme, daß das TI protoniert vorliegt, wäre parallel dazu eine allgemein basenkatalysierte Deprotonierung des Carbonylsauerstoffes notwendig (Fischer & Barth, 1981). Auch die Deacylierung verläuft über ein TI, wobei ein Hydroxid-Ion oder, wie im Falle der proteasekatalysierten Peptidsynthese, ein Amin als Nucleophil dient.
- Wegen der Resonanzstabilisierung der Säureamidbindung ist bei Peptidsubstraten der Serinproteasen vom Chymotrypsin- und Subtilisin-Typ die Acylierung geschwindigkeitsbestimmend. Bei Estern und aktivierten Amidien, wie z.B. 4-Nitroaniliden, ist hingegen die Deacylierung limitierend (Christensen & Ipsen, 1979). Im Falle der Cysteinprotease Papain ist für alle bislang untersuchten Substrate die Deacylierung geschwindigkeitsbestimmend.

Weitere Faktoren sind am Katalyseprozeß beteiligt. So werden für den Asp-Rest der katalytischen Triade weitere HB in die Proteinmatrix gefunden, die dessen anionische Struktur stabilisieren (Warshel & Russell, 1986). Asn155, der HB-Donor der Oxyanionenhöhle im Subtilisin, wird durch HB zu Thr220 stabilisiert (Rao et al., 1987; Braxton & Wells, 1991). Im Grundzustand wird bei Serinproteasen eine HB zwischen dem katalytisch aktiven Ser und His-N_{ε2} beobachtet. Dipolwechselwirkungen mit Elementen der α-Helix, welche die Elemente der katalytischen Triade umgibt, tragen zur Stabilisierung ionischer Intermediate bei (Carey et al., 1978). Auch „long range“ elektrostatische Interaktionen sind an der Stabilisierung des Übergangszustandes beteiligt (Jackson & Fersht, 1993). Stabilisierende Effekte durch eine HB vom His-C_{ε1}H zu einer benachbarten Carbonylgruppe, die sich wiederum auf das Verhalten des His-N_{ε2}H⁺ bei der Protonierung des Amids auswirken, wurden von (Derewenda et al., 1994) beschrieben.

Die Eignung thioxosubstituierter Peptidderivate zur Untersuchung von Enzym-Substrat Wechselwirkungen, sowohl im aktiven Zentrum als auch an Sekundärbindungsstellen der Protease, soll in diesem Kapitel untersucht werden.

3.1. α -Chymotrypsin

3.1.1. Vorkommen, Eigenschaften und biologische Funktion

Die Serinprotease α -Chymotrypsin wird in den Zellen des Pankreas als enzymkatalytisch inaktives Chymotrypsinogen A produziert und im Duodenum durch Trypsin und autokatalytische Prozesse aktiviert (Freer et al., 1970; Übersicht: Kraut, 1971a). Dort dient sie dem Abbau von Nahrungsproteinen. Das aktive α -Chymotrypsin, erstmals von (Hartley, 1964) sequenziert (241 Aminosäurereste, M_R : 25 170, pI: 9.4), besteht aus drei Aminosäureketten, die durch zwei der insgesamt fünf Disulfidbrücken zusammengehalten werden. Das Enzym wurde 1967 von (Matthews et al., 1967) als Tosyl- α -Chymotrypsin kristallisiert und in seiner Struktur aufgeklärt. Die katalytische Triade umfaßt die Aminosäurereste His57-Asp102-Ser195. Der reaktive Serylrest ist in die Konsensus-Sequenz Asp-Ser-Gly eingebettet, und kann mit DFP (Jansen et al., 1949) gehemmt werden. Die Konzentration der katalytisch aktiven Zentren kann durch Titration mit 4-Nitrophenylacetat bestimmt werden (Hartley & Kilby, 1954). Das für Röntgenkristallstrukturanalysen oft verwendete Chymotrypsin γ besitzt die gleiche Aminosäuresequenz wie α -Chymotrypsin, und steht mit diesem in einem reversiblen pH-abhängigen Gleichgewicht (Blow, 1971).

3.1.2. Bedeutung des Enzyms

α -Chymotrypsin und das strukturell eng verwandte Trypsin sind gut geeignete und vielfach genutzte Objekte zur Untersuchung von Katalysemechanismen (Übersicht: Perona & Craik, 1995). Neben der Aufklärung von Enzym-Ligand Wechselwirkungen durch Röntgenkristallstrukturanalyse wurden zahlreiche Untersuchungen zur Bestimmung und gentechnologischen Modulation der Spezifitätsdeterminanten im Enzymmolekül durchgeführt. Durch Substitution der S_1 -Bindungstasche und zweier Oberflächenloops des Trypsins mit den entsprechenden Sequenzen des Chymotrypsins konnte die Spezifität der Trypsin-Mutante in Richtung des Chymotrypsins verschoben werden (Hedstrom et al., 1992; Schellenberger et al., 1993). Eine Verschiebung der Nucleophilspezifität des Trypsins unter Erhalt der P_1 -Spezifität gelang durch ausschließliche Substitution zweier Oberflächenloops des Trypsins durch die analogen Sequenzen des Chymotrypsins (Kurth et al., 1997).

Die hohe Reaktivität des α -Chymotrypsins für Estersubstrate, die in definierten Grenzen vorhandene Stabilität gegenüber organischen Lösungsmitteln (Kuhl et al., 1981, 1982, 1990; Kuhl & Jakubke, 1990; Unverzagt et al., 1992; Paradkar & Dordick, 1994; Sasaki & Kise, 1994; Khmelnitsky et al., 1994; Cerovsky & Jakubke, 1994a-c, 1996) sowie die Möglichkeit einer effizienten Immobilisierung des Enzyms (Jakubke & Konnecke, 1987; Rollandfulcrand et al., 1994; Hänslers et al., 1997) bzw. der Substrate (Fischer et al., 1978; Jakubke et al., 1996; Eichhorn et al., 1997) auf polymeren Trägern, eröffneten ein weites Anwendungsspektrum für

technische Prozesse, so z.B. für die enzymkatalysierte Peptidsynthese (Moriyama & Oka, 1977; Übersichten: Jakubke, 1987; Kuhl & Jakubke, 1990; Schellenberger & Jakubke, 1991; Bongers & Heimer, 1994; Hänsler & Jakubke, 1996a, b; Jakubke et al., 1996).

3.1.3. Substrate und Inhibitoren

Chymotrypsin katalysiert die Hydrolyse von Amidbindungen in Peptiden und Proteinen und bevorzugt dabei aromatische L-Aminosäuren in P₁-Position (Bergmann & Fruton, 1938). Eine Esterase- (Jones et al., 1965) und Amidaseaktivität (Bauer et al., 1976a, b). wurden ebenfalls gefunden, wobei letztere gegenüber der ersteren um mehr als 3 Größenordnungen geringer ist. Die Hydrolyse von Thiolestern geschieht effizienter als die entsprechender Sauerstoffester. Der P₁-Rest muß nicht notwendigerweise aromatisch sein, auch ein Cyclohexylrest wird in dieser Position akzeptiert. Dennoch ist die S₁-Bindungstasche des Enzyms sehr genau dimensioniert, Derivate mit O-alkyliertem Tyr (Peterson et al., 1963) oder 4-Jod-Phe (Kezdy et al., 1964) werden mit mehr als 3 Größenordnungen schlechteren katalytischen Effizienzen hydrolysiert als die nicht am Ring substituierten Verbindungen. Die Methylierung des P₁-C_α-Kohlenstoffes reduziert die Aktivität entsprechender Substrate um 5 Größenordnungen (Almond et al., 1962).

Die Messungen zur Substratspezifität des Chymotrypsins können in Untersuchungen zur Primär- und Sekundärspezifität unterteilt werden. Erstere, vorwiegend in den sechziger Jahren getätigt, umfassen die an vielfältig substituierten Acylaminosäureestern durchgeführten Experimente, bei denen die vier am C_α-Kohlenstoff gebundenen Substituenten systematisch variiert und deren Effekte analysiert wurden (Übersicht: Blow, 1971). Als Sekundärspezifität werden hingegen die Effekte der anderen Sekundärbindungsstellen im Substratbindungsbereich betrachtet, bei deren Untersuchung der P₁-Substituent unverändert sein sollte.

Eine Bewertung der Spezifität einzelner Sekundärbindungsstellen der α-Chymotrypsin katalysierten Peptidbindungshydrolyse, basierend auf Berechnungen zu „Quantitativen Struktur-Aktivitäts-Beziehungen“ für eine Vielzahl kinetischer Daten, ergab produktive Bindungen vorwiegend im Bereich P₃ bis P₂, wobei die energetische Gesamtstabilisierung mit guter Näherung als Summe der Einzelbeiträge einzelner Sekundärbindungsstellen betrachtet werden kann (Schellenberger et al., 1991c). Die Ergebnisse wurden wie folgt zusammengefaßt:

- P₃: kaum Seitenkettenspezifität bei Aminosäuren; auch D-Aminosäurereste wie z.B. D-Arg werden effektiv gebunden; Derivate mit P₃-Pro bzw. einem P₃-Acylrest sind wegen des Fehlens der HB der P₃-Amidgruppe zum Gly216-CO mehr als 100-fach schlechtere Substrate

- P₂: Peptide mit großen Aminosäureresten in dieser Position werden effizienter hydrolysiert als solche mit kleinen, letztere werden jedoch mit höherer Affinität gebunden (Tozser et al., 1986); auch P₂-Pro wird akzeptiert; P₂-Leu kann vorteilhafte van der Waals Wechselwirkungen mit Trp215 und Ile99 eingehen (Bauer, 1980)
- P₁: vorwiegend aromatische Aminosäurereste mit den Präferenzen: Tyr > Phe > Trp (Tozser et al., 1986); keine substituierten Reste, deren sterische Dimensionen die Größe der S₁-Bindungstasche übersteigen; keine D-Aminosäurereste; kaum hydrolysiert werden Aminosäurereste mit geladener oder β-verzweigter Seitenkette.

Die Aminosäurespezifität der Positionen P₁` bis P₃` von Chymotrypsin und Trypsin wurde an Hand der Effizienz des Acyltransfers auf verschiedene Nucleophile bei der enzymatischen Peptidsynthese ermittelt (Schellenberger et al., 1990, 1993, 1994).

- P₁`: Bezüglich P₁`-Aminosäureresten wird eine klare Präferenz für Arg und Lys in P₁`-Position gefunden, die sich über ionische Wechselwirkungen mit zwei Asp-Resten in S`-Position erklären läßt. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Bewertung der P₁` Spezifität von Chymotrypsin mit Aminosäureamiden als Nucleophil erzielt (Gololobov et al., 1992a, b). Letztere zeigen eine höhere Nucleophilie von aromatischen Aminosäureamiden, die bei länger-kettigen Nucleophilen nicht gefunden wird, und über die größeren konformativen Freiheitsgrade kleiner Nucleophile bei der Wechselwirkung mit S` erklärt werden kann (Schellenberger et al., 1993). Ester als Abgangsgruppe werden besser hydrolysiert als Amide; aromatische Ester besser als aliphatische.
- P₂`: schlechte Hydrolyse von Derivaten ohne P₂`-Amidproton, da dieses eine HB zum Phe41-CO eingeht (Bizzozero et al., 1982).
- P₃`: Die C-terminale Extension von Peptidyl-fluormethylketon-Inhibitoren lieferte bei Derivaten mit Arg in P₃`-Position eine 15-fache Verbesserung der Inhibierung des Chymotrypsins (Imperiali & Abeles, 1987).

3.1.4. Ergebnisse der Untersuchungen

Der Einfluß einer Peptidrückgrat-Modifizierung durch selektive Thioxylierung einzelner Peptidbindungen auf die proteasekatalysierte Hydrolyse wurde an Hand zweier Modellsubstratreihen der Sequenz Ala-Xaa-Pro-Phe-NH-Np (Xaa: Gly, Ala) untersucht (vgl. Abb.19). Zur Interpretation der Ergebnisse wurden als Vergleichsgrundlage die in Komplexen aus Chymotrypsin und Peptidyl-Chlormethylketon-Inhibitoren durch Röntgenkristallstrukturanalyse gefundenen HB und Seitenkettenwechselwirkungen herangezogen (Segal et al., 1971).

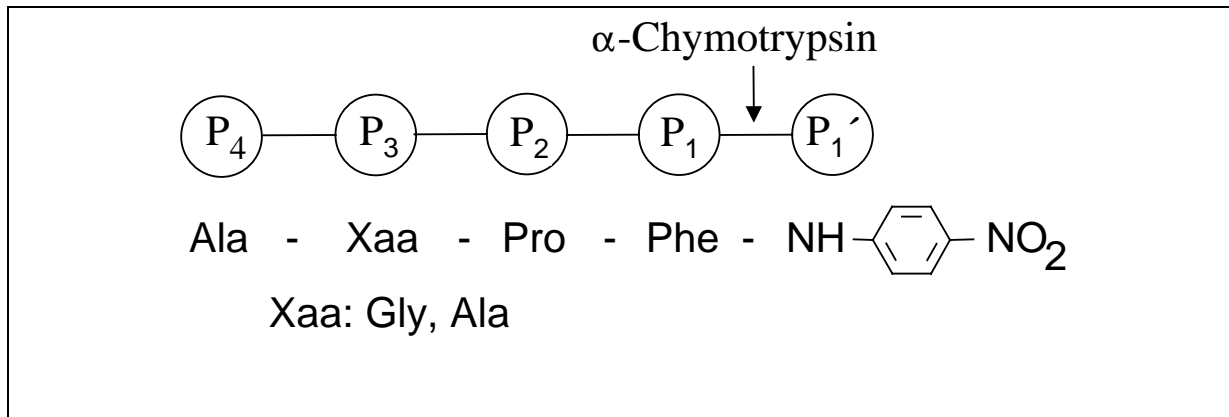


Abb.19: Schematische Darstellung der Substratspezifität des α -Chymotrypsins für die untersuchten Modellsubstrate. Der Pfeil kennzeichnet die zu hydrolysierende Bindung.

3.1.4.1. Hydrolyse von P₄, P₃ und P₂-thioxylierten Tetrapeptid-4-Nitroaniliden

Die Untersuchung der zwei Peptidderivat-Reihen ergab, daß die Belegung der Position Xaa mit Ala einen höheren Beitrag zur Katalyse liefert als Gly in der gleichen Position. Dies deckt sich mit Ergebnissen statistischer Analysen einer Vielzahl kinetischer Daten, die einen höheren Beitrag von P₃-Ala als P₃-Gly zur Katalyse belegen (Schellenberger et al., 1991c).

Vergleicht man Oxo- und Thioxo-Derivate, so hat eine Thioxylierung der Peptidbindungen der P₄, P₃ und P₂-Positionen (entsprechend der Nomenklatur von Schechter & Berger, 1967) in der α -Chymotrypsin katalysierten Hydrolyse der Arylamidbindung nur geringfügige Auswirkungen auf die kinetischen Konstanten (vgl. Tab.4).

Die Thioxylierung des N-terminalen Alanins in der P₄-Position führt in beiden Substratreihen zu einer Verkleinerung der k_{cat} -Werte ungefähr um den Faktor 3, der sich quantitativ in den $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ Werten widerspiegelt. Die Affinitäten der Substrate zum Enzym bleiben unverändert. Der gleiche Effekt auf k_{cat} wird bei Thioxylierung der P₃ Position (Xaa) gefunden. In der Substratreihe mit Xaa = Ala wird dies durch einen niedrigeren K_{m} -Wert kompensiert, was in praktisch unveränderten $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ -Werten resultiert. Beim Derivat mit Xaa = Gly findet man einen zweifach höheren K_{m} -Wert, was zu fünffach verminderten $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ Werten führt.

Der für die in P₄- und P₃-Position thioxylierten Derivate beschriebene Abfall der k_{cat} -Werte wird bei den in P₂-Position (Pro) modifizierten Verbindungen nicht gefunden. Einem praktisch unveränderten k_{cat} -Wert in der Substratreihe mit Xaa = Ala steht eine Vergrößerung des Wertes um den Faktor 2.5 in der Reihe mit Xaa = Gly gegenüber. Bei beiden Derivaten wird eine leichte Erhöhung der K_{m} -Werte beobachtet.

Röntgenkristallografische Untersuchungen an Chymotrypsin γ , komplexiert mit Peptidyl-Chlormethylketon-Inhibitoren (Segal et al., 1971), zeigten die Existenz eines antiparallelen β -Faltblattes zwischen der gebundenen Aminosäurekette und einer Peptidkette der Bindungsfurche des Enzyms. Wegen der β -Faltblattstruktur werden HB zwischen P₁-S₁ und

P₃-S₃, nicht jedoch zwischen P₂-S₂ und P₄-S₄, gebildet, deren Einfluß sich in den Ergebnissen kinetischer Untersuchungen widerspiegeln sollte (vgl. Abb.20).

Peptid-Derivat	K _m (mM)	k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _m (M ⁻¹ s ⁻¹)
Ala-Gly-Pro-Phe-NH-Np	0.28 ± 0.04	4.3 ± 0.1	15 200 ^a
Ala-ψ[CS-NH]-Gly-Pro-Phe-NH-Np	0.34 ± 0.02	1.6 ± 0.1	4 680
Ala-Gly-ψ[CS-N]-Pro-Phe-NH-Np	0.53 ± 0.04	1.7 ± 0.1	3 200 ^a
Ala-Gly-Pro-ψ[CS-NH]-Phe-NH-Np	0.51 ± 0.08	11.1 ± 0.1	21 840
Ala-Gly-Pro-Phe-ψ[CS-NH]-Np	0.99 ± 0.23	0.011 ± 0.001	10
Ala-Ala-Pro-Phe-NH-Np	0.45 ± 0.06	28.1 ± 3.0	62 400 ^a
Ala-ψ[CS-NH]-Ala-Pro-Phe-NH-Np	0.38 ± 0.02	8.7 ± 0.2	22 950
Ala-Ala-ψ[CS-N]-Pro-Phe-NH-Np	0.13 ± 0.01	9.0 ± 0.9	69 200 ^a
Ala-Ala-Pro-ψ[CS-NH]-Phe-NH-Np	0.64 ± 0.10	21.6 ± 1.9	33 750
Ala-Ala-Pro-Phe-ψ[CS-NH]-Np	0.48 ± 0.07	0.015 ± 0.001	30

Tab.4: Kinetische Konstanten der α-Chymotrypsin katalysierten Hydrolyse von Oxo- und Thioxo-peptid-Derivaten in 35 mM Hepes-Puffer, pH 7.8, der 2Vol.% DMSO enthielt, bei 25°C. ^aDaten übernommen von (Schutkowski et al., 1995).

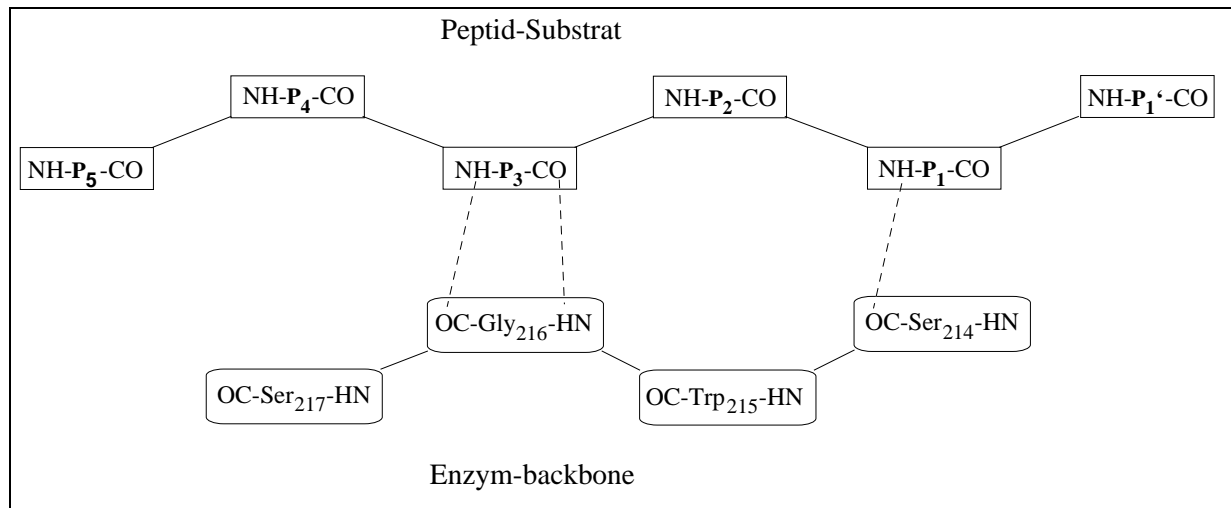


Abb.20: Schematische Darstellung der antiparallelen β-Faltblattstruktur zwischen der Aminosäurekette des Substrates (bzw. Inhibitors) und der Peptidkette des Enzyms. Die im Rahmen der Sekundärbindungsstellen-Wechselwirkungen zwischen Enzym und Substrat ausgebildeten HB sind durch gepunktete Linien gekennzeichnet. Modifiziert nach (Hill & Tomalin, 1981).

Um dies zu prüfen, wurden die kinetischen Konstanten von Substraten der Struktur Ac-(Gly)_n-Phe-OMe ermittelt (Hill & Tomalin, 1981). Die aus der Kettenverlängerung resultierenden energetischen Beiträge zur Hydrolyse können hier auf HB zwischen Enzym und Substrat

zurückgeführt werden, da bei diesen Derivaten keine über die P₁-Position hinausgehenden Seitenkettenwechselwirkungen möglich sind. Der Aufbau nur einer P₃-S₃ HB (P₃-CO zu Gly216-NH) durch das Substrat Ac-Gly-Phe-OMe erbrachte annähernd eine Verdopplung des $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ -Wertes, verglichen mit Ac-Phe-OMe (vgl. Abb. 20). Die Etablierung einer zweiten P₃-S₃ HB (P₃-NH zu Gly216-CO) im Substrat Ac-(Gly)₂-Phe-OMe bewirkte eine nochmalige Verfünffachung der katalytischen Effizienz.

Eine mehr als hundertfach erhöhte katalytische Effizienz bewirkt die Belegung der zweiten Sekundärbindungsstellen-HB (P₃-NH zu S₃-CO) bei Messungen mit Substraten der Struktur Ac-(Ala)_n-Tyr-Gly-NH₂, wobei die Tyr-Gly Bindung hydrolysiert wird (Baumann et al., 1973). Die Aufhebung der P₃-NH HB zum Gly216-CO bei einem Substrat mit Pro in dieser Position führte zu ca. 50-fach schlechteren $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ -Werten, verglichen mit einem P₃-Ala Substrat (Bauer et al., 1976 b).

Die vom P₃-Amid ausgehende, für den Katalyseprozeß bedeutsamere HB, sollte in den hier untersuchten Oxo- und Thiooxopeptid-4-nitroaniliden nicht gestört sein. Die Thioxylierung der P₃-Carbonylgruppe (Xaa) würde aber die weniger einflußreiche HB vom Gly216-NH zum P₃-CS stören, und somit die Katalyse beeinträchtigen. In den von uns durchgeführten Experimenten wurde eine Verringerung von k_{cat} um den Faktor 3 beobachtet, die Auswirkungen auf K_{m} waren verschieden.

Die Verkleinerung von k_{cat} wird auch für die in P₄-Position (Ala) thioxylierten Derivate gefunden. Hier sollten nach dem β -Faltblatt-Modell keine HB auftreten, jedoch wird durch die P₄-P₃ Thiooxopeptidbindung möglicherweise die HB vom P₃-NH zum Gly216-CO beeinträchtigt.

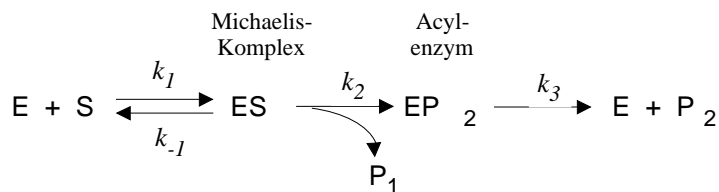
Die sich ohnehin nur geringfügig voneinander unterscheidenden kinetischen Daten der Oxo-, P₄- und P₃-thioxylierten Derivate resultieren wahrscheinlich aus mehreren, sich überlagernden und in ihren Auswirkungen konträr verlaufenden Einflüssen auf die enzymatische Hydrolyse. Neben den erwähnten HB können auch aus den chemischen Eigenschaften des Schwefels resultierende hydrophobe Wechselwirkungen und sterische Restriktionen eine Rolle spielen.

Bei der P₂-S₂ Wechselwirkung lassen sich aus den beschriebenen Röntgenkristallstrukturen hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem P₂-Pro und der Seitenkette von Ile99 ableiten (Segal et al., 1971). Außerdem kann die sterische Restriktion des Pyrrolidinringes die Bildung eines höheren Anteils produktiver Enzym-Substrat Komplexe bewirken (Segal, 1972). Da in dieser Position keine HB existieren, die durch eine Thioxosubstitution gestört werden könnten, bewirken möglicherweise die hydrophoben Wechselwirkungen den beobachteten Anstieg der k_{cat} -Werte auf (Xaa = Ala) bzw. über (Xaa = Gly) das Niveau der Oxo-Substrate. Die durch die P₂-Pro Thioxylierung bedingte höhere Acidität der P₂-P₁-Thiooxopeptidbindung könnte auch zu einer Verstärkung der vom P₁-NH ausgehenden HB zum Enzym führen.

3.1.4.2. Derivate mit P₁-thioxylierter Peptidbindung

3.1.4.2.1. Hydrolyse P₁-thioxylierter Tetrapeptid-4-Nitroanilide (Thioxoarylamide)

Die Thioxoarylamidbindung der Derivate Ala-Xaa-Pro-Phe-ψ[CS-NH]-Np (Xaa: Gly, Ala) kann durch α-Chymotrypsin hydrolysiert werden, jedoch nur mit mehr als drei Größenordnungen reduzierter katalytischer Effizienz (vgl.Tab.6). Die Ursache dafür liegt hauptsächlich in den stark verringerten k_{cat} -Werten, K_m ist im Falle des Derivates mit Xaa = Gly um den Faktor 4 erhöht, beim Derivat mit Xaa = Ala bleibt er unverändert. Für die Hydrolyse des Thioxoesters Ac-Phe-ψ[CS-O]-CH₃ durch α-Chymotrypsin wird eine mehr als 4 Größenordnungen schlechtere Hydrolyse, verglichen zum Oxo-Ester, gefunden (Asboth & Polgar, 1983). Auch hier ist die Verschlechterung der katalytischen Konstanten auf die reduzierten k_{cat} -Werte rückführbar. Die Affinität von Ac-Phe-ψ[CS-O]-CH₃ zum Enzym ist mit 4 mM sogar noch etwas höher als die des Oxo-Esters mit 7.4 mM (Zerner et al., 1964). Der K_m -Wert stellt die Affinität des Enzyms zum Substrat im quasi-stationären Zustand (steady state) dar (Briggs & Haldane, 1925). Bei der Substrathydrolyse entsprechend der Gleichung



resultieren k_{cat} und K_m gemäß
$$k_{cat} = \frac{k_2 \times k_3}{k_2 + k_3}$$

und
$$K_m = \frac{k_{-1}}{k_1} \times \frac{k_3}{k_2 + k_3}$$

als komplexe Größen (Gutfreund & Sturtevant, 1956). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion liegt nicht in k_3 begründet, da bei Inkubation nahezu äquimolarer Mengen Enzym und Substrat (20 μM α-Chymotrypsin mit 50 μM Ala-Ala-Pro-Phe-ψ[CS-NH]-Np) keine Akkumulation des Thioxoacylenzyms (EP₂), die mit einer Zweiphasenkinetik der 4-Nitroanilin-Freisetzung (P₁) verbunden wäre, beobachtet wird. Da offensichtlich $k_3 \gg k_2$ gilt, kann geschlußfolgert werden, daß k_{cat} ungefähr der Acylierungskonstante k_2 entspricht, während die Michaelis-Konstante der Dissoziationskonstante des Enzym-Substrat-Komplexes vergleichbar ist.

Aus Untersuchungen zur chemischen Reaktivität von Oxo- und Thioxoestern geht hervor, daß diese etwa gleich reaktiv in der alkalischen Hydrolyse sind (Bruice & Mautner, 1973; Asboth & Polgar, 1983) und die Reaktion ebenfalls über ein tetraedrisches Intermediat verläuft (Smith & O'Leary, 1963; Satterthwait & Jencks, 1974). Demzufolge muß die verminderte Proteolyse der Thioxoester und Thioxoarylamide im Katalysemechanismus der Protease begründet liegen. Die Bildung des Michaelis-Komplexes sollte durch die Ein-Atom-Substitution der Thioxoderivate nicht gestört sein (Asboth & Polgar, 1983). Dies wird durch die Meßergebnisse bestätigt, die hier untersuchten Thioxoarylamide haben den entsprechenden Oxo-Derivaten vergleichbare K_m -Werte (vgl. Tab.4). Folglich wird die stark verminderte Hydrolyse der Thioxoester und Thioxoarylamide auf reduzierte k_{cat} -Werte zurückgeführt, d.h. der Übergangszustand (im Folgenden: ÜZ) der Acylierungsreaktion muß bei diesen Derivaten im Vergleich zum Michaelis-Komplex destabilisiert sein. Als Ursache dafür wird eine gestörte Ausbildung des tetraedrischen Intermediates in der Oxyanionenhöhle angenommen, die in den besonderen chemischen Eigenschaften des Schwefels begründet liegt. In Ermangelung röntgenkristallografischer Daten von Protease-Thioxopeptidinhibitor Komplexen können über die genauen Ursachen dieser Störung nur Hypothesen aufgestellt werden. Folgende mögliche Effekte der Thioxosubstitution, die einzeln oder kombiniert auftreten können, werden in diesem Zusammenhang diskutiert (Asboth & Polgar, 1983):

- eine sterische Hinderung wegen des größeren kovalenten und van der Waals Radius des Schwefels, der sich nicht in die Oxyanionenhöhle einpassen läßt und deshalb keine HB bilden kann
- der Schwefel kann zwar in die Oxyanionenhöhle eingepaßt werden, ist wegen seiner verringerten Basizität aber nicht (oder nur sehr viel weniger als Sauerstoff) in der Lage, als Protonen-Akzeptor aufzutreten
- werden die HB doch in vergleichbarer Stärke wie bei den Oxo-Derivaten ausgebildet (Krueger, 1970; Lautie & Novak, 1980), könnten diese in ihrer Ausrichtung gestört sein
- eine veränderte sterische Ausrichtung des Oxyanions könnte den Protonentransfer vom His- $N_{\epsilon_2}H^+$ auf die austretende Amidgruppe stören.

Die enzymatische Freisetzung des 4-Nitroanilins kann spektrometrisch leicht verfolgt werden, die Existenz des zweiten zu erwartenden Hydrolyseproduktes, der Thioxosäure Ala-Xaa-Pro-Phe-C(=S)OH bzw. deren Thiolform Ala-Xaa-Pro-Phe-C(=O)SH konnten nicht nachgewiesen werden. Es ist anzunehmen, daß das Gleichgewicht zwischen beiden Formen in wäßrigen Medien weit auf der Seite der Thiolform liegt (Scheithauer & Mayer, 1979). Resonanz-Raman-spektroskopische Untersuchungen an Thiolessigsäure zeigten, daß diese wahrscheinlich nur bei Temperaturen über 70°C einen geringen Anteil der Thioxoform ausbildet (Scheithauer & Mayer, 1979). Über die Stabilität von Thiolsäuren in wäßrigen

Medien existieren keine allgemeingültigen Erkenntnisse. Durch (Foje & Hanzlick, 1994) wurde im Zuge der Papain-katalysierten Hydrolyse des Substrates Ac-Phe-Gly- ψ [CS-NH]-Np die Bildung der Peptid-Thiolsäure Ac-Phe-Gly-CO-SH nachgewiesen, diese hydrolysiert jedoch über einen Zeitraum von 1-2 Stunden zur Carbonsäure Ac-Phe-Gly-CO-OH. Untersuchungen an Aminosäure-Dithioestern ergaben, daß diese nur dann stabil sind, wenn sie N-terminal eine Schutzgruppe tragen (Hartke, 1991).

Demzufolge war zu klären, ob es sich bei der beobachteten Hydrolyse der Thioxoarylamide wirklich um eine enzymkatalysierte Spaltung der Thioxopeptidbindung handelt, oder ob die zu hydrolysierende Bindung im Zuge der Enzym-Substrat Wechselwirkung in einem, wie auch immer gearteten, vorgelagerten geschwindigkeitsbestimmenden Schritt „entschwefelt“ wird, gefolgt von einer „normalen“ Hydrolyse des resultierenden Oxo-Substrates.

Die Existenz eines intermediären Thioxoacylenzyms und entsprechender tetraedrischer Thiohemiketale wurde indirekt durch enzymkatalysierte Thioxopeptidsynthese nachgewiesen. Durch Thioxoacyltransfer auf geeignete Nucleophile konnten Thioxopeptide hergestellt werden, die eine „echte“ Thioxopeptidbindung, d.h. eine Thioxopeptidbindung zwischen zwei proteinogenen Aminosäureresten, enthielten (vgl. Tab.6). Überraschenderweise waren die Thioxopeptidbindungen der so generierten Derivate resistent gegenüber der Hydrolyse durch α -Chymotrypsin und Subtilisin C.

Dies zeigt zunächst, daß der Schwefel in allen Stadien des Hydrolyseprozesses kovalent am Carbonylkohlenstoff gebunden bleibt. Die Stabilisierung des Oxyanions im tetrahedralen Intermediat geschieht bei Serinproteasen weitgehend über die Wechselwirkungen mit dem Oxyanionen-Bindungszentrum. Ob eine Fixierung des Schwefels im ÜZ als Thiolatanion in der Oxyanionen-Bindungshöhle oder eine andere Form der Stabilisierung des tetrahedralen Intermediates, z.B. über eine durch ein Wassermolekül vermittelte HB zum protonierten N_2H^+ des His, stattfindet, kann an Hand dieser Ergebnisse nicht entschieden werden.

Zum Vergleich, bei Cysteinproteasen mit ihrer schwächeren Stabilisierung des Oxyanions kommen zusätzlich noch Wechselwirkungen mit Dipolen der α -Helix, in die das Thiolat-Imidazolium Ionenpaar eingebettet ist, hinzu. Auch für α -Chymotrypsin sind solche polaren Wechselwirkungen beschrieben. IR-spektroskopische Untersuchungen an ^{13}C Carbonylmarkierten Zimtsäure-Chymotrypsin Komplexen zeigten eine deutliche Polarisierung im Grundzustand durch HB in der Oxyanionenhöhle. Dabei werden zwei Banden für die Carbonylregion beobachtet, die als differente Formen von HB betrachtet werden. Die bei niedriger Frequenz zu findende schmalere Bande wird als produktive Bindung, bei der der Carbonylsauerstoff die Oxyanionenhöhle besetzt, angesehen. Die bei höherer Frequenz liegende breitere Bande wird auf eine nichtproduktive Bindung vom Carbonylsauerstoff über ein Wassermolekül zum His57 betrachtet (White et al., 1990, 1992). Möglicherweise ist die

Hydrolyse des nichtproduktiv gebundenen Komplexes dann möglich, wenn eine Protonentransfer auf die Abgangsgruppe nicht notwendig ist.

In Modelluntersuchungen wurde gefunden, daß der Sauerstoff des katalytisch aktiven Serylrestes im Chymotrypsin zwei verschiedene Positionen einnehmen und dementsprechend zwei verschiedene tetraedrische Intermediate bilden kann (Polgar & Asboth, 1974; Bizzozero & Dutler, 1981). Während in der „nativen“ Struktur die HB korrekt orientiert sind, ist in der alternativen Struktur die HB vom Peptidrückgrat-Amid des Serylrestes in ihrer Orientierung gestört. Eine mögliche sterische Kompatibilität des Thioxosubstrates mit der alternativen Struktur wäre als Ursache für deren Hydrolysierbarkeit zu diskutieren (Asboth & Polgar, 1983).

3.1.4.2.2. P₁-thioxylierte Peptidderivate ohne aktivierte Abgangsgruppe

Peptide, deren zu hydrolysierende Bindung thioxyliert ist und die keine aktivierte Abgangsgruppe in P₁-Position besitzen, werden durch α -Chymotrypsin nicht hydrolysiert, jedoch hemmen sie die Hydrolyse des Substrates Ala-Ala-Pro-Phe-NH-Np reversibel. Für das chemisch hergestellte Thioxopentapeptid Ala-Ala-Pro-Phe- ψ [CS-NH]-Ala wurden der genaue K_i-Wert und Hemmtyp bestimmt. Die Dixon-Auftragung der gemessenen Umsatzgeschwindigkeiten in Gegenwart verschiedener Substrat- und Inhibitorkonzentrationen lieferte das Bild einer rein kompetitiven Hemmung. Die Hemmkonstanten bewegen sich in der gleichen Größenordnung wie die K_m-Werte der entsprechenden Oxo-Substrate (vgl. Tab.5). Zu einer leichten Verschlechterung der Inhibitorbindung führte die Thioxylierung des P₁-Aminosäurerestes im Inhibitor Ac-Phe-NH₂ (K_i: 13.9 mM) mit K_i: 23 mM für Ac-Phe- ψ [CS-NH]-H (Thompson et al., 1986).

Eine mögliche HB zwischen dem Schwefel und His-N₂H⁺ (Asboth & Polgar, 1983) würde die für den Ausstoß der Abgangsgruppe notwendige Protonierung der Aminkomponente durch His57 beeinträchtigen. Der 4-Nitroanilidrest ist jedoch in der Lage, wie bei Untersuchungen am Trypsin gezeigt wurde, den tetrahedralen Komplex als resonanzstabilisiertes Anion zu verlassen und erst anschließend ein Proton im Reaktionsmedium aufzunehmen (Christensen & Ipsen, 1979). Untersuchungen an Phosphonat-Derivaten zur Inhibierung von Trypsin zeigten, daß Phosphonat-4-nitroanilide keine Inhibitoren sind, da sie vom Enzym hydrolysiert werden (Bertrand et al., 1996; Zhao et al., 1994). Dies könnte erklären, weshalb Thiooxyarylamide mit der 4-Nitroanilid-Abgangsgruppe hydrolysiert werden, während nichtaktivierte Thiooxypeptide hydrolyseresistent sind.

Die Ergebnisse in Tab.5 zeigen, daß bereits die entsprechenden Oxo-Derivate kaum Substrate für α -Chymotrypsin sind. Ein C-terminal freier Ala-Rest in P₁-Position wird 30 000-fach schlechter hydrolysiert als der 4-Nitroanilidrest an gleicher Stelle. Zu einem großen Teil beruht dies auf der freien negativen Ladung der Carboxylgruppe, im entsprechenden Ester

verläuft die Hydrolyse schon wieder um nahezu 2 Größenordnungen schneller. Jedoch wird bei hohen Proteasekonzentrationen (4 μM) und Verwendung des Esters als Substrat eine zusätzliche Esteraseaktivität beobachtet, die aber 100-fach geringer als die Peptidhydrolaseaktivität ist.

Peptid-Derivat	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
Ala-Ala-Pro-Phe-Ala- \downarrow -OMe ^a	4.40 \pm 0.89	< 2
Ala-Ala-Pro-Phe- \downarrow -Ala-OMe ^b		150
Ala-Ala-Pro-Phe- \downarrow -Ala		2
Ala-Ala-Pro-Phe- ψ [CS-NH]-Ala	Ki: 5.8 ^c	

Tab.5: Kinetische Konstanten der Hydrolyse bzw. Inhibierung von Oxo- und Thiopeptidderivaten mit einer nativen Aminosäure in P₁'-Position, gemessen in 35 mM HEPES, pH 7.8 bei 25°C. ^aEsteraseaktivität; ^bPeptidaseaktivität; ^ckompetitive Inhibierung

Eine Verschlechterung der Substrateigenschaften von Ala-Ala-Pro-Phe- ψ [CS-NH]-Ala in der gleichen Größenordnung wie sie beim Wechsel von den nichtthioxylierten 4-Nitroaniliden zu den entsprechenden Thioxyarylamiden gefunden wird, wäre trotz der ohnehin schon geringen Hydrolyse von Ala-Ala-Pro-Phe-Ala noch sicher detektierbar gewesen. Aus den Ergebnissen einer Langzeitinkubation kann geschlossen werden, daß Ala-Ala-Pro-Phe- ψ [CS-NH]-Ala, insofern überhaupt eine Hydrolyse stattfindet, auch ein mindestens 10^3 -fach schlechteres Substrat als Ala-Ala-Pro-Phe-Ala ist.

Die Untersuchung der enzymkatalytisch hergestellten Thiopeptide (vgl. Tab.6) unter gleichen Bedingungen erbrachte ebenfalls keine Hinweise auf Hydrolyse. Geht man davon aus, daß deren Oxo-Peptide k_{cat}/K_m -Werte in der Größenordnung $> 1000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ haben, ließe sich eine Reduktion der katalytischen Konstanten der thioxylierten Peptide von mehr als 6 Größenordnungen abschätzen. Damit kommt man jedoch in einen Bereich, in dem evtl. beobachtbare Hydrolyseereignisse nicht mehr zweifelsfrei dem Wirken des katalytischen Apparates an sich zugeordnet werden können. Vielmehr könnte es sich hier auch um eine, durch die Destabilisierung des gebundenen Thiopeptids im Michaelis-Komplex bedingte, „unspezifische enzymkatalysierte Hydrolyse“ handeln, an der die katalytisch aktiven Reste des Hydrolyseapparates nicht beteiligt sind.

Vergleichbare Beobachtungen wurden bei Untersuchungen an Subtilisin-Varianten gemacht (Carter & Wells, 1988). Die Substitution aller drei Aminosäurereste der katalytischen Triade mit Ala ergab eine Protease-Mutante, die das Substrat Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-NH-Np zwar 10^7 -fach schlechter hydrolysierte als das Wildtyp-Enzym, die Geschwindigkeitskonstante war aber noch 1000-fach größer als die der Spontanhydrolyse in Abwesenheit des Enzyms. Auch

hier wurde die Nutzung von Bindungsenergie zur Stabilisierung des ÜZ, unabhängig von einer katalytischen Triade, diskutiert (Carter & Wells, 1988).

Thiopeptid-Inhibitor	IC ₅₀ : [mM]
Ala-Ala-Pro-Phe-ψ[CS-NH]-Met-Ala	9.10 ± 0.70
Ala-Ala-Pro-Phe-ψ[CS-NH]-Ala-Tyr	0.54 ± 0.03
Ala-Ala-Pro-Phe-ψ[CS-NH]-Leu-NH ₂	6.10 ± 1.80
Ala-Ala-Pro-Phe-ψ[CS-NH]-Phe-Leu-N(CH ₃) ₂	10.2 ± 0.90
Ala-Ala-Pro-Phe-ψ[CS-NH]-Ala-Ala-Pro-Phe	1.57 ± 0.08

Tab.6: Inhibierung von α-Chymotrypsin durch verschiedene, enzymkatalytisch aus Ala-Ala-Pro-Phe-ψ[CS-NH]-Np und dem entsprechenden Nucleophil hergestellte Thiopeptide, gemessen in 35 mM Hepes, pH 7.8 bei 25°C. Die Berechnung der IC₅₀-Werte erfolgte mittels nichtlinearer Regression gemäß der Gleichung $k_i = k_e / (1 + I_0 / IC_{50})$, wobei k_e und k_i die Initialgeschwindigkeiten der enzymatischen Hydrolyse in Ab- bzw. Anwesenheit von Inhibitor sind. Die Messungen erfolgten unter der Bedingung $S_0 \ll K_m$, als Substrat wurden 50 μM Ala-Ala-Pro-Phe-NH-Np eingesetzt.

Des weiteren wurden die IC₅₀-Werte für die Thiopeptide, deren Thiopeptidbindung enzymkatalytisch geknüpft wurde, ermittelt (s. Tab.6). Auch dort liegen die Hemmkonstanten im millimolaren Bereich, wobei mit Unterschieden bis zu einem Faktor von 20 eine recht breite Streuung beobachtet wird.

Die Ergebnisse mit P₁-thioxosubstituierten Derivaten zeigen, daß Peptidbindungen mit aktivierter Abgangsgruppe in ihrem Verhalten gegenüber Proteasen eher Estern ähneln als entsprechenden nichtaktivierten Peptidbindungen. Diese Differenzen können zur enzymkatalysierten Thiopeptidsynthese genutzt werden. Letztere belegt erstmals, daß der Schwefel im Zuge des Katalyseprozesses kovalent am Carbonylkohlenstoff gebunden bleibt, und daß das Thiohemiketal im aktiven Zentrum des Enzyms gebunden werden kann, wengleich auch mit stark verminderter Effizienz, wie die niedrigen k_{cat} -Werte der Thioarylamide zeigen.

3.2. Subtilisin Carlsberg

3.2.1. Vorkommen, Eigenschaften und biologische Funktion

Subtilisine, erstmals beschrieben von (Linderstrom-Lang & Ottesen, 1947), umfassen eine Gruppe einzelsträngiger alkalischer Proteasen, die aus dem Kulturmedium von *Bacillus*-Stämmen gewonnen werden. Sie werden zusammen mit anderen Enzymen wie Amylasen und Nucleasen von den Bakterien sekretiert, und dienen im Medium dem Aufschluß von Nahrungsquellen. Neben dem in früheren Untersuchungen meist verwendeten Subtilisin BPN (= Subtilisin Novo, Nagarse) aus *Bacillus amyloliquefaciens* ist das hier verwendete Subtilisin Carlsberg (im Folgenden: Subtilisin C.) aus *Bacillus licheniformis* bekannt, welches sich von ersterem durch 84 weitgehend konservative Aminosäuresubstitutionen und eine Deletion (Pro56) unterscheidet (Smith et al., 1968; Übersichten: Kraut, 1971b; Markland & Smith, 1971). Subtilisin C., erstmals sequenziert von (Smith et al., 1968), besteht aus 274 Aminosäureresten, hat ein Molekulargewicht von 27 277 Dalton und einen isoelektrischen Punkt bei pH 9.4. Die erste Kristallstruktur für den Phenylmethansulfonyl-Subtilisin BPN Komplex wurde von (Wright et al., 1969) bestimmt. Die katalytische Triade umfaßt die Aminosäurereste Asn32-His64-Ser221. Das katalytisch aktive Serin ist in die Sequenz -Thr-Ser-Met- eingebettet und kann mit DFP (Sanger & Shaw, 1960) und PMSF (Neet & Koshland, 1966) irreversibel inhibiert werden. Das Enzym zeigt keine Sequenzhomologien zu den pankreatischen Serinproteasen und enthält auch keine Cysteinreste.

3.2.2. Bedeutung des Enzyms

Auch die Subtilisine sind als Vertreter der bakteriellen Serinproteasen zu vielfach verwendeten Objekten der Proteaseforschung geworden. So läßt sich durch chemische (Polgar & Bender, 1966; Neet & Koshland, 1966) bzw. gentechnologische (Nakatsuka et al., 1987) Substitution des katalytisch aktiven Ser221 zum Cys eine effiziente Ligaseaktivität in das Enzym einführen. Durch Einführung weiterer Punktmutationen in das Subtiligase genannte modifizierte Subtilisin BPN konnte die Ligaseaktivität auf das 10^4 -fache des Wildtyp-Enzyms erhöht werden (Abrahamsen et al., 1991; Chang et al., 1994). Mittels Subtiligase-Katalyse gelang es, Ribonuclease A und verschiedene „active-site“ Varianten desselben durch schrittweise Ligation von Peptidester-Fragmenten zu synthetisieren (Jackson et al., 1994). Durch mehrere definierte Aminosäureaustausche im Subtilisin BPN mittels ortsspezifischer Mutagenese konnte eine dem Furin ähnliche Spezifität für di- und tribasische Reste eingeführt werden (Ballinger et al., 1995, 1996). Auch das native Enzym wurde für vielfältige Experimente zur enzymkatalysierten Peptidsynthese verwendet. Die Wiederverknüpfung von Fragmenten des mittels Subtilisin C. proteolysierten Hühnereiweiß-Lysozyms durch die gleiche Protease bei partieller Substitution des Puffers durch DMSO wird von (Vogel et al.,

1996) beschrieben. Vergleichbare Ergebnisse wurden mit Ribonuclease S erzielt, die zuvor in wäßrigem Puffer durch Subtilisin BPN hydrolysierte Ala²⁰-Ser²¹ Bindung wurde nach Zusatz von 90% Glycerol mit 50% Ausbeute wiedergeknüpft (Homandberg & Laskowski, 1979). Durch Subtilisin-katalysierte Peptidsynthese in organischen Lösungsmitteln mit 10% Wassergehalt können Di- und Tripeptide bzw. auch Aminosäurederivate wie Taurin als Nucleophile eingesetzt und auf N-geschützte Aminosäureester transferiert werden (Cerovsky & Jakubke, 1994a, 1996).

3.2.3. Substrate und Inhibitoren

Subtilisin C. besitzt eine dem α -Chymotrypsin vergleichbare P₁-Spezifität, jedoch ist die S₁-Bindungstasche beim Subtilisin C. größer und flexibler bezüglich des P₁-Bindungspartners (Stoll et al., 1998). Das verwandte Subtilisin BPN besitzt zwei differente S₁-Bindungsmodi, es kann sowohl ein P₁-Phe als auch P₁-Lys fixieren (Robertus et al., 1972a; Poulus et al., 1976). Auch beim Subtilisin C. kann zwischen einer den P₁-Substituenten kennzeichnenden Primärspezifität und einer die anderen Sekundärbindungsstellen beschreibenden Sekundärspezifität unterschieden werden.

Neben der proteolytischen Aktivität werden auch Esterase-, Thiolesterase- und Amidase-Aktivitäten mit Substrat- und Reaktionstyp-abhängigen pH-Optima im Bereich von pH 8-11 gefunden. Das Enzym kann als Endoproteinase und als Carboxypeptidase aktiv sein. Die Subtilisine können mit Aromaten wie Indol oder Phenol kompetitiv gehemmt werden. (Übersichten: Kraut, 1971; Markland & Smith, 1971). Die Konzentration der aktiven Zentren kann durch Titration mit *N-trans*-Zimtsäureimidazol bestimmt werden (Bender et al., 1966).

Wie am Beispiel von Enzym-Peptidinhibitor Komplexen beobachtet werden kann, gehen Subtilisine ausgedehnte Sekundärbindungsstellen-Wechselwirkungen ein. Der Komplex zwischen Subtilisin BPN und dem Streptomyces Subtilisin Inhibitor (SSI) ist ein Michaelis Komplex. Die Sekundärbindungsstellen-Wechselwirkungen umfassen 2 Regionen, einerseits zwischen P₁-P₃ und den Aminosäureresten 125-127 des Enzyms, andererseits eine zusätzliche Wechselwirkungsregion zwischen P₄-P₆ und den Aminosäureresten 102-104 (Takeuchi et al.; 1991). Eine Verschiebung der Spezifität des SSI von Subtilisin zum Trypsin kann durch selektive Aminosäureaustausche in den P₁ und P₄ Bindungsregionen erreicht werden (Kojima et al., 1990).

Während beim α -Chymotrypsin kaum wechselseitige Abhängigkeiten zwischen einzelnen Sekundärbindungsstellen gefunden werden, sind diese beim Subtilisin C. deutlich ausgeprägt. Neben der S₁-Bindungstasche findet man eine zweite, ebenfalls auf aromatische und große hydrophobe Aminosäurereste optimierte Bindungstasche in S₄-Position (Rheinacker et al., 1993). Günstige Enzym-Substrat Wechselwirkungen in diesen zwei Positionen können ungünstige Wechselwirkungen anderer Sekundärbindungsstellen kompensieren, wie am

Beispiel der Savinase, einem Subtilisin aus *Bacillus lentus* gezeigt wurde (Grøn & Breddam, 1992). Dies führte zu der Erkenntnis, daß einerseits keine Additivität der Einzelwechselwirkungen bei der Optimierung eines Substrates gegeben ist, andererseits hochaffine Interaktionen bestimmter Enzym-Substrat Bereiche weniger affine Wechselwirkungen in anderen Positionen kompensieren können. Wechselwirkungen zwischen einzelnen Sekundärbindungsstellen der Protease zeigen sich auch darin, daß eine Modifikation der S₄-Bindungstasche mittels ortsspezifischer Mutation eine Veränderung der kinetischen Konstanten bei der Hydrolyse einfacher Acylaminosäureester verursacht, obwohl bei diesen gar keine S₄-P₄ Wechselwirkungen stattfinden können (Rheinacker et al., 1994). Ein „Sekundärbindungsstellen-mapping“ der Spezifität von Subtilisin C. unter Nutzung einer Peptidbibliothek wurde von (Meldal et al., 1994) beschrieben. Dabei zeigte sich, daß an zwei verschiedene poröse Festphasen (Kieselguhr-Polyamid-Resin, Polyethylenglycol-N,N-dimethylacrylamid-Copolymer) gebundene Substrate zu einer partiellen Verschiebung der Spezifität des Enzyms führen können. Folgende Präferenzen wurden gefunden: P₄: Val, P₃: Glu, Gln, P₁: Ser und P₂: Glu.

Bei Verwendung gelöster Peptidsubstrate wurden für Subtilisin BPN Enzym-Substrat Wechselwirkungen für die Positionen P₁ und P₂ beschrieben, mit einer Präferenz von P₁ für Ala und Gly (Brömme et al., 1986). Acyltransferreaktionen auf Di- und Tripeptide in Acetonitril-Piperidin Mixturen mit 10% Wasser waren am effektivsten mit Gly in P₁- und P₂-Position, in P₃-Position kann auch sehr effizient Pro eingebaut werden (Cerovsky & Jakubke, 1996). Eine Bewertung der Aminosäure- und Stereospezifität der P₂-Position der Subtilisine C. und BPN durch (Chen et al., 1993) ergab eine bevorzugte Bindung von Ala gegenüber großen oder geladenen Seitenketten.

Folgende allgemeingültigen Spezifitätsmerkmale können trotz der voranstehend aufgeführten Einschränkungen für die Subtilisine BPN und Savinase (Grøn et al., 1992) und Subtilisin C. (Meldal et al., 1994) abgeleitet werden:

- ausgedehnte Enzym-Substrat Wechselwirkungsbereiche, die von P₆ bis zur P₃'-Position reichen und deren Belegung die katalytische Effizienz entsprechender Substrate erhöht
- eine Präferenz für aromatische Aminosäuren in den Positionen P₄ und P₁, letztere bindet auch Leu sehr effizient
- für Subtilisin BPN ist eine optimale S₄-P₄ Wechselwirkung für eine hohe kinetische Effizienz notwendig (Moriyama, 1974)
- in P₁-Position werden kleine (polare) Aminosäurereste bevorzugt
- Pro kann effizient in P₄ und P₂ gebunden werden, nicht jedoch in P₃, P₁ und P₁'-Position
- durch Pro in P₂-Position zusammen mit Phe in P₄ kann die Hydrolysestelle zur gewünschten P₁-Position „dirigiert“ werden.

3.2.4. Ergebnisse der Untersuchungen

Es wurden die gleichen Substrate verwendet wie in den Messungen mit α -Chymotrypsin. Zur Interpretation der hier erhaltenen Ergebnisse wurden als Vergleichsgrundlage die im Subtilisin C. - Eglin C Komplex (McPhalen & James, 1988; Bode et al., 1986, 1987) sowie die in Peptidyl-Chlormethylketon-Inhibitor-Komplexen (Robertus et al., 1972a) gefundenen HB und Seitenkettenwechselwirkungen herangezogen.

3.2.4.1. Hydrolyse von P₄, P₃ und P₂-thioxylierten Tetrapeptid-4-Nitroaniliden

Einleitend sei angemerkt, daß die enzymatischen Eigenschaften von Subtilisin C. in stärkerem Maße als beim α -Chymotrypsin zu beobachten durch das dem Reaktionsansatz zugesetzte DMSO beeinflusst werden, was sich vorwiegend in vergrößerten K_m und kleineren k_{cat}/K_m -Werten zeigt. Vergleichbare Beobachtungen wurden für Subtilisin BPN in Gegenwart von Formamid gemacht (Robertus et al., 1972a). Die in der Literatur häufig beschriebenen sehr großen K_m -Werte von N-geschützten Substraten, die wegen ihrer schlechten Löslichkeit in wäßrigem Puffer in Gegenwart hoher organischer Lösungsmittelanteile gemessen wurden, sind so erklärbar.

Peptid-Derivat	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ s ⁻¹)
Ala-Gly-Pro-Phe-NH-Np	1.55 ± 0.20	67.2 ± 3.3	43 400
Ala-ψ[CS-NH]-Gly-Pro-Phe-NH-Np	1.11 ± 0.26	54.4 ± 9.9	49 000
Ala-Gly-ψ[CS-N]-Pro-Phe-NH-Np	2.16 ± 0.07	5.6 ± 0.1	2 600
Ala-Gly-Pro-ψ[CS-NH]-Phe-NH-Np	2.56 ± 0.43	63.8 ± 8.0	24 900
Ala-Gly-Pro-Phe-ψ[CS-NH]-Np	3.18 ± 0.57	0.13 ± 0.01	40
Ala-Ala-Pro-Phe-NH-Np	1.30 ± 0.09	23.0 ± 0.8	17 700
Ala-ψ[CS-NH]-Ala-Pro-Phe-NH-Np	1.52 ± 0.10	31.5 ± 1.4	20 700
Ala-Ala-ψ[CS-N]-Pro-Phe-NH-Np	1.84 ± 0.18	1.4 ± 0.1	800
Ala-Ala-Pro-ψ[CS-NH]-Phe-NH-Np	2.55 ± 0.47	26.2 ± 3.7	10 290
Ala-Ala-Pro-Phe-ψ[CS-NH]-Np	> 5.00	< 0.07	14

Tab.7: Kinetische Konstanten der Subtilisin C. katalysierten Hydrolyse von Oxo- und Thiopeptid-Derivaten in 35 mM Hepes, pH 7.8, der 2 Vol.% DMSO enthielt, bei 25°C.

Die Thioxylierung der N-terminalen Aminosäure in P₄-Position (Ala) hat praktisch keinen Einfluß auf die Hydrolyse dieser Derivate, die kinetischen Konstanten sind denen der entsprechenden Oxo-Verbindungen vergleichbar (vgl.Tab.7).

Ein deutlicher Einfluß der Thioxylierung wird für die P₃-Position gefunden. Die k_{cat} -Werte sinken in beiden Fällen um mehr als den Faktor 10 ab, bei ebenfalls leicht verschlechterten

K_m -Werten ergeben sich für beide Substratreihen um den Faktor 20 verringerte katalytische Effizienzen.

Die Hydrolyse der in P_2 -Position (Pro) thioxylierten Derivate verläuft wiederum mit den Oxo-Derivaten vergleichbaren k_{cat} -Werten, nur die leicht verschlechterten K_m -Werte bewirken letztendlich eine Verringerung der Quotienten k_{cat}/K_m auf ungefähr die Hälfte der Oxo-Substrate. Tendenziell ist in beiden Substratreihen zu beobachten, daß die Substrataffinität leicht, aber beständig abnimmt, je näher sich die Thioxylierung der zu hydrolysierenden Bindung befindet.

Bei der Subtilisin C. katalysierten Peptidhydrolyse sind die Aminosäurereste des Substrates der Positionen P_4 bis P_1 zwischen zwei β -Faltblattstrukturen des Enzyms, welche die Aminosäurereste 100-102 und 125-127 der Proteinkette umfassen, eingebettet. Das so gebildete dreisträngige antiparallele Falblatt geht, wie an röntgenkristallografischen Studien am Enzym-Inhibitor Komplex aus Subtilisin C. und Eglin C gezeigt wurde, intensive Wechselwirkung in Form von HB (vgl. Abb.21) und Seitenketteninteraktionen mit dem gebundenen Peptid ein. Diese reichen von der P_4 - bis hin zur P_2 -Position (McPhalen & James, 1988).

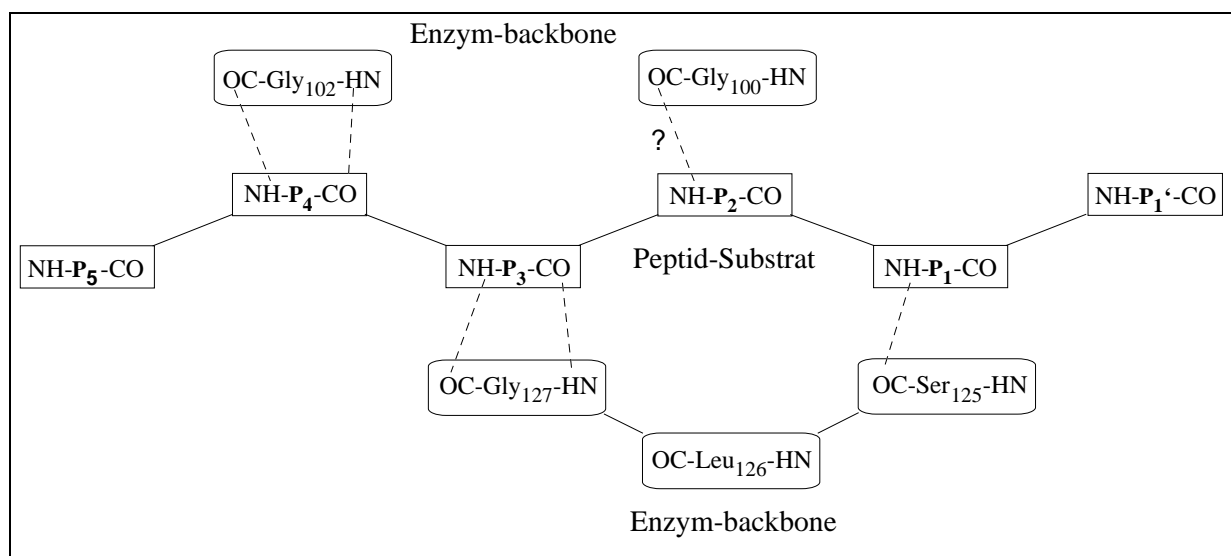


Abb.21: Schematische Darstellung der doppelsträngigen antiparallelen β -Faltblattstruktur zwischen der Aminosäurekette des Substrates (bzw. Inhibitors) und den Peptidketten des Enzyms. Die im Rahmen der Sekundärbindungsstellen-Wechselwirkungen zwischen Enzym und Substrat ausgebildeten HB sind durch gepunktete Linien gekennzeichnet. Die Existenz der mit „?“ gekennzeichneten HB gilt nicht als gesichert. Modifiziert nach (McPhalen & James, 1988).

Neben der Bedeutung der P_1 -Position für die Primärspezifität kommt in der Subtilisin katalysierten Hydrolyse eine besondere Bedeutung der S_4 - P_4 Wechselwirkung zu. Letztere Position bildet ebenfalls eine hydrophobe Höhle, in der bevorzugt aromatische und große

hydrophobe Seitenketten fixiert werden (Rheinecker et al., 1993). Die Thioxosubstitution in P₄-Position sollte eine HB dieses Carbonyls zum Amidwasserstoff des Gly102 der Proteinkette aufheben. Eine Beeinflussung der kinetischen Daten wird indes nicht gefunden. Auch scheint die auf große Aminosäure-Seitenketten ausgerichtete S₄-Bindungstasche in der Lage zu sein, die mit der Thioxosubstitution am Ala möglicherweise verbundenen sterischen Veränderungen zu tolerieren.

Wesentlich stärkere Einflüsse werden bei Thioxylierung des P₃-Restes (Xaa: Gly, Ala) gefunden (vgl.Tab.7). Die beiden von P₃ ausgehenden HB bewirken, gemeinsam mit der P₁-S₁ HB, eine leicht verdrehte Anordnung des antiparallelen Faltblattes zwischen der Peptidkette des Inhibitors und den Aminosäureresten 125-127 im Subtilisin BPN (Robertus et al., 1972a). Verglichen mit dem Subtilisin C.- Eglin C Modell (McPhalen & James, 1988) sollte hier die HB vom P₃-Carbonyl zum Gly127-NH gestört sein. Insofern die Thioxosubstitution eine Verdrillung oder Verdrehung der Peptidkette bewirkt, könnten auch weitere Enzym-Substrat Wechselwirkungen, wahrscheinlich vorwiegend im Bereich der N-terminalen Extension, beeinträchtigt sein. Speziell die N-terminal unmittelbar benachbarte HB des P₃-Amids zum Gly-127 Carbonyl scheint von großer Bedeutung zu sein. Die Aminosäure Prolin in P₃-Position liefert um mehrere Größenordnungen schlechtere Substrate als entsprechende Verbindungen mit anderen Aminosäureresten (Grøn et al., 1992; Grøn & Breddam, 1992). Dieser Effekt sollte deshalb auf die gestörte HB zurückzuführen sein, weil die P₃-Seitenkette im Subtilisin C.- Eglin C Modell (McPhalen & James, 1988) und auch im Subtilisin BPN - Chlormethylketon-Komplex verschiedener Peptidderivate (Robertus et al., 1972a) keine Wechselwirkungen mit der Proteinmatrix des Enzyms eingeht. Bei kinetischen Messungen mit Substraten der Struktur Ac-(Gly)_n-Trp-OMe wurde ein Anstieg der k_{cat}- und k_{cat}/K_m-Werte um mehr als eine Größenordnung beim Wechsel von Ac-Gly-Trp-OMe zu Ac-(Gly)₂-Trp-OMe gefunden, was auf einen Beitrag der P₃-NH HB zum Gly127-CO zur passenden Ausrichtung der zu hydrolysierenden Esterbindung, verbunden mit einer Stabilisierung des ÜZ, zurückgeführt wird (Karasaki & Ohno, 1979). Ein 30-fach höherer k_{cat}-Wert wurde für die Amidase-Reaktion von Subtilisin BPN am Z-Gly-Gly-Leu-NH₂, verglichen mit Z-Gly-Leu-NH₂, gefunden (Moriyama et al., 1970).

Die Thioxylierung des P₂-Restes (Pro) hat weniger starke Auswirkungen auf die enzymkatalysierte Hydrolyse, im Subtilisin C.- Eglin C Komplex wird keine HB für diese P₂-Carbonylgruppe, jedoch eine HB des P₂-NH zum Gly100-CO gefunden (McPhalen & James, 1988). Im Komplex mit verschiedenen Peptidyl-Chlormethylketonen (Robertus et al.,

1972a) wurde diese nicht identifiziert (Robertus et al., 1972a). Eine hydrophobe S₂-Bindungstasche kann durch Wechselwirkung mit einem P₂-Pro die energetischen Verluste vermindern, die durch Wegfall einer möglicherweise bestehenden P₂-NH HB entstanden sind.

3.2.4.2. Derivate mit P₁-thioxylierter Peptidbindung

3.2.4.2.1. Hydrolyse P₁-thioxylierter Tetrapeptid-4-Nitroanilide (Thioxoarylamide)

Derivate mit einer thioxylierten zu hydrolysierenden Bindung, kombiniert mit der 4-Nitroanilid-Abgangsgruppe, werden durch Subtilisin C. hydrolysiert, jedoch mit 3 Größenordnungen verminderten katalytischen Effizienzen (vgl.Tab.7). Obwohl dieser Abfall, ähnlich wie auch beim α -Chymotrypsin, vorwiegend auf die Verkleinerung der k_{cat}-Werte zurückzuführen ist, werden für beide Substratreihen beim Subtilisin C. zusätzlich noch schlechtere K_m-Werte gefunden, je näher sich die Thioxylierung der zu hydrolysierenden Bindung befindet. Die Reduktion der k_{cat}-Werte kann allgemein auf eine Destabilisierung des ÜZ der Acylierungsreaktion, relativ zum Michaelis-Komplex, zurückgeführt werden. Da eine der beiden Oxyanionen-HB im Subtilisin von der Seitenkette des Asn155 ausgeht, wurde eine höhere Flexibilität bei der Wechselwirkung mit dem sterisch anspruchsvolleren Schwefelatom postuliert, verglichen zum α -Chymotrypsin, bei dem beide Oxyanionen-HB von Peptidrückgrat-Aminosäureresten ausgehen (Asboth & Polgar, 1983). Sofern diese Flexibilität gegeben ist, wirkt sie sich nicht in Form einer Steigerung der Hydrolyse der Thioxoarylamide aus, verglichen mit den für α -Chymotrypsin erzielten Ergebnissen.

Auch die im Ergebnis der Subtilisin C. katalysierten Hydrolyse der Thioxoarylamide freigesetzten Peptide enthielten keinen Thioxo- bzw. Thiolcarbonylrest mehr. Deren scheinbar nur begrenzte Stabilität in wäßrigen Lösungen und die geringe Reaktionsgeschwindigkeit verhindern offenbar eine Akkumulation der Peptid-Thioxo- bzw. Thiolsäure. Der Nachweis, daß die Hydrolyse dennoch über ein Thioxoacylzym und die entsprechenden tetraedrischen Thiohemiketale verläuft, wurde erneut durch Thioxoacyltransfer erbracht. Die enzymkatalysierte Knüpfung von Thioxopeptidbindungen gelingt auch mit Subtilisin C., wiederum findet man einen kinetisch kontrollierten Reaktionsverlauf, da die Syntheseprodukte resistent gegenüber Hydrolyse durch die Protease sind.

Zahlreiche Untersuchungen wurden durchgeführt zur Bedeutung des Säureamidstickstoffs der Seitenkette des Asn155 für die Ausprägung der Oxyanionenhöhle im Subtilisin BPN. Ein Austausch dieser Aminosäure durch Alanin mittels ortsspezifischer Mutagenese bewirkte eine 300-fache Verschlechterung der katalytischen Konstanten und eine Verschiebung des pK_a der Oxyanionenbildung von pH 7.00 zu pH 8.09. Die veränderte Wechselwirkung zwischen dem Oxyanion und dem Imidazoliumion des His64 wird für die Abschwächung der Acidität verantwortlich gemacht (Oconnell et al., 1997). Vergleichbare Ergebnisse wurden bereits

früher bei Untersuchungen an einer Asn155Leu Mutante erhalten (Bryan et al., 1986). Untersuchungen mit Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-NH-Np als Substrat zeigten gleiche Lösungsmittel-Isotopieeffekte für das Wildtyp Subtilisin und die Asn155Gly Mutante, obwohl durch diese Mutation eine Wasserstoffbrückenbindung der Oxyanionenhöhle gestört wird, und die katalytische Effizienz der Mutante zwei Größenordnungen geringer ist als die des Wildtyps (Chang et al., 1996, Chiang et al., 1995). Diese Ergebnisse unterstreichen einerseits die große Bedeutung der von Asn155 ausgehenden HB, und lassen andererseits eine vom Lösungsmittel abgeschirmte Lokalisation dieses Aminosäurerestes vermuten. Letztere könnte in Folge der Thioxosubstitution ebenfalls verändert sein, was sich wiederum negativ auf die Effizienz der Hydrolyse der Thioxoarylamide auswirken würde.

3.2.4.2.2. P₁-thioxylierte Peptidderivate ohne aktivierte Abgangsgruppe

Auch Subtilisin C. ist nicht in der Lage, thioxylierte Peptidbindungen ohne aktivierte Abgangsgruppe in P₁-Position zu hydrolysieren (vgl.Tab.8). Weder für das Thioxopentapeptid Ala-Ala-Pro-Phe-ψ[CS-NH]-Ala noch für die enzymkatalytisch synthetisierten Thioxo-peptide (vgl.Tab.9) wurden bei Langzeitinkubation mit 4 μM Subtilisin C. Hinweise auf eine Hydrolyse der Thioxo-peptidbindung gefunden.

Jedoch wird eine reversible Hemmung der Hydrolyse des Substrates Ala-Ala-Pro-Phe-NH-Np beobachtet. Aus der Dixon-Auftragung wurde für den Inhibitor Ala-Ala-Pro-Phe-ψ[CS-NH]-Ala ein gemischter Hemmtyp abgeleitet, was auf zwei verschiedene Bindungsmodi zwischen Enzym und Inhibitor schließen läßt. Die höhere Flexibilität der S₁-Bindungstasche des Enzyms scheint sich hierin widerzuspiegeln. Diese zeigt sich auch in der hohen Esteraseaktivität am Substrat Ala-Ala-Pro-Phe-Ala-OMe, welche die proteolytische Aktivität bezüglich der Phe-Ala Bindung um das 30-fache übersteigt. Beim α-Chymotrypsin wurde hingegen keine nennenswerte Esteraseaktivität gefunden.

Peptid-Derivat	K _m (mM)	k _{cat} /K _m (M ⁻¹ s ⁻¹)
Ala-Ala-Pro-Phe-Ala- [↓] -OMe ^a		> 5 000
Ala-Ala-Pro-Phe- [↓] -Ala-OMe ^b		< 200
Ala-Ala-Pro-Phe- [↓] -Ala	> 5	98
Ala-Ala-Pro-Phe-ψ[CS-NH]-Ala	Ki: 2.7 ^c	

Tab.8: Kinetische Konstanten der Hydrolyse bzw. Inhibierung von Oxo- und Thioxo-peptidderivaten mit einer nativen Aminosäure in P₁-Position. Alle Reaktionen wurden bei 25 °C in 35 mM Hepes; pH 7.8 durchgeführt. ^aEsteraseaktivität; ^bPeptidhydrolaseaktivität, ^cgemischte Inhibierung

Unterschiede zwischen Subtilisin C. und α -Chymotrypsin findet man auch bei deren Wechselwirkung mit den enzymkatalytisch hergestellten Thioxozeptiden (vgl.Tab.9). Diese binden mit IC_{50} -Werten um bzw. deutlich unter 1 mM an Subtilisin C. und zeigen somit eine um ca. eine Größenordnung höherer Affinität zur bakteriellen Protease als zum α -Chymotrypsin.

Thioxozeptid-Inhibitor	IC_{50} : [mM]
Ala-Ala-Pro-Phe- ψ [CS-NH]-Met-Ala	0.80 ± 0.02
Ala-Ala-Pro-Phe- ψ [CS-NH]-Ala-Tyr	0.55 ± 0.03
Ala-Ala-Pro-Phe- ψ [CS-NH]-Leu-NH ₂	0.82 ± 0.14
Ala-Ala-Pro-Phe- ψ [CS-NH]-Phe-Leu-N(CH ₃) ₂	1.30 ± 0.04
Ala-Ala-Pro-Phe- ψ [CS-NH]-Ala-Ala-Pro-Phe	0.36 ± 0.01

Tab.9: Inhibierung von Subtilisin C. durch verschiedene, enzymkatalytisch aus Ala-Ala-Pro-Phe- ψ [CS-NH]-Np und dem entsprechenden Nucleophil hergestellte Thioxozeptide. Die Berechnung der IC_{50} -Werte erfolgte mittels nichtlinearer Regression gemäß der Gleichung $k_i = k_e/(1+I_0/IC_{50})$, wobei k_e und k_i die I.Ordnungskonstanten der enzymatischen Hydrolyse in Ab- bzw. Anwesenheit von Inhibitor sind. Die Messungen erfolgten unter der Bedingung $S_0 \ll K_m$, als Substrat wurden 50 μ M Ala-Ala-Pro-Phe-NH-Np eingesetzt.

Als Ursache für das unterschiedliche Verhalten gegenüber aktivierten und nichtaktivierten Thioxozeptiden sind die gleichen Punkte zu diskutieren wie beim α -Chymotrypsin (vgl.Kap.3.1.4.2.). Auch hier scheint die Ausstoßung der Abgangsgruppe der entscheidende Schritt für eine erfolgreiche Thioxoacylierung zu sein. Diese gelingt bei aktivierten Derivaten, welche keine Protonierung durch His-N₂H⁺ benötigen, und mißlingt bei nichtaktivierten, zwei proteinogene Aminosäurereste verbindenden, Thioxozeptidbindungen. Der erfolgreiche Thioxoacyltransfer auf geeignete Akzeptorpeptide belegt auch hier den Reaktionsverlauf über zwei tetraedrische Thiohemiketale, was wiederum zeigt, daß eine Adaptation des Thioxo-carbonyls im aktiven Zentrum des Enzyms auch beim Subtilisin C. möglich ist.

Zusätzlich wurde beim Subtilisin C. ein deutlicher Einfluß der P₃-Sekundärbindungsstellen-Thioxylierung gefunden, welche die katalytische Effizienz der entsprechenden Derivate um mehr als eine Größenordnung reduzierte. Während solche Sekundärbindungsstellen-Einflüsse für die Prolyl-spezifische Serin-Exoprotease DP IV bereits bekannt sind (Schutkowski et al., 1994), ist dies der erste Nachweis derartiger Effekte für eine Serin-Endoprotease.

3.3. Prolyloligopeptidase

3.3.1. Vorkommen, Eigenschaften und biologische Funktion

Im Jahre 1971 wurde erstmals eine aus teilgereinigten Uterus-Homogenaten isolierte Enzymaktivität beschrieben, die in der Lage war, Pro-Yaa Bindungen in biologisch aktiven Peptiden zu hydrolysieren (Walter et al., 1971). Auf Grund der Eigenschaft des Enzyms, am C-Terminus des Prolins anzugreifen, wurde zunächst die Bezeichnung "post-proline cleaving enzyme" gewählt.

In den folgenden Jahren wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen weitere Enzymaktivitäten in unterschiedlichen Organismen und Organen mit gleicher Spezifität beschrieben (Oliveira et al., 1976; Hersh & McKelvy, 1979; Knisatschek et al., 1979; Rupnow et al., 1979), die sich nach eingehender Charakterisierung als der von (Walter et al., 1971) beschriebenen identisch erwiesen (Hersh, 1981). Auf Grund der Fähigkeit dieser Protease, innerhalb kurzer Peptidsequenzen Pro-Yaa Bindungen zu hydrolysieren, wurde die Bezeichnung Prolyloligopeptidase (im Folgenden: POP) gewählt (Barett & McDonald, 1981).

Das Enzym wurde aus einer Vielzahl von Quellen isoliert, so z.B. dem Archebacterium *Pyrococcus furiosus* (Harwood et al., 1997), aus *Flavobacterium meningosepticum* (Yoshimoto & Tsuru, 1982), aus Eiern und Spermien der Seescheide *Halocynthia roretzi* (Yokosawa et al., 1987) und aus einer Vielzahl von Säugergeweben. Hier sind besonders hohe Konzentrationen im Hirn zu finden. Innerhalb des Hirns sind die Aktivitäten unterschiedlich verteilt, im Hippocampus und Striatum sind sie höher als in Pons und Medulla (Orlowski et al., 1979). Außerdem unterscheiden sich die Enzymaktivitäten in den verschiedenen Stadien der Individualentwicklung erheblich (Kato et al., 1980).

Weiterhin wurde die POP aus Leber, Niere, Herz- und Skelettmuskel, Lunge, Pankreas, Testis und Uterus isoliert, als Untersuchungsobjekte dienten meist Ratte, Maus und Kaninchen (Übersichten: Wilk, 1983; Welches et al., 1993; Yaron & Naider, 1993; Cunningham & O'Conner, 1997). Das humane Enzym wurde aus dem Hirn (Kalwant & Porter, 1991), dem Uterus (Walter et al., 1971) und aus T-Lymphozyten isoliert (Shirasawa et al., 1994; Goossens et al., 1995). Untersuchungen an humanen (Goossens et al., 1996) und tierischen (Cunningham & Oconner, 1998) Gewebekomponenten und Körperflüssigkeiten zeigten eine weite Verbreitung der Protease.

POP aus verschiedenen Quellen zeigt ähnliche physikalische Eigenschaften. Das Enzym besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette (Hersh, 1981; Yoshimoto et al., 1981), hat ein Molekulargewicht zwischen 62 und 77 kD (Wilk, 1983; Zolgari et al., 1986; Schönlein et al., 1990) und einen pI im Bereich von 4,5 bis 4,9 (Yoshimoto et al., 1983). Eine Ausnahme bildet hier die prokaryotische POP mit einem pI von 9. Die optimale Enzymaktivität liegt im

neutralen bis schwach alkalischen pH-Bereich (Rupnow et al., 1979; Orłowski et al., 1979; Yoshimoto et al., 1981, 1983).

Das aus Schweineniere isolierte und sequenzierte Enzym besitzt den für Serinproteasen typischen Serylrest im katalytischen Zentrum, welcher in die für diese Proteaseklasse charakteristische Konsensussequenz -Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly- eingebettet ist (Brenner, 1988). Die bislang nur postulierte Existenz einer katalytischen Triade wurde kürzlich durch Röntgenkristallstruktur-Analyse zweifelsfrei nachgewiesen (Fülöp et al., 1998). Während die Beteiligung der Aminosäurereste Ser554 (Rennex et al., 1991) und His680 (Stone et al., 1991) schon früher durch chemische Modifizierung belegt wurde, konnte Asp641 (Polgar, 1992; Goossens et al., 1995) als dritte Komponente der katalytischen Triade über die Röntgenkristallstruktur identifiziert werden (Fülöp et al., 1998).

Die POP spielt eine wichtige Rolle beim Abbau bzw. peptidolytischen Processing biologisch aktiver Peptide. Umfangreiche Untersuchungen liegen für die Peptidhormone Oxytocin, Vasopressin, Gonadoliberin, Thyroliberin, Melanocyten stimulierendes Hormon (MSH) und Bradykinin vor (Übersichten: Wilk, 1983; Yaron & Naider, 1993).

Eine hohe Affinität besitzt das Enzym gegenüber Substanz P (K_m : 10^{-6} M). Unter der Annahme eines für viele POP-Substrate typischen k_{cat} -Wertes von $10-50 \text{ s}^{-1}$ könnte eine katalytische Effizienz erreicht werden, die sich in der Größenordnung von Neurotransmitter abbauenden Enzymen, wie z.B. Acetylcholinesterase bewegt (Blumberg et al., 1980). Tatsächlich konnte die Existenz einer POP-Form in synaptischen Membranen aus Pferdehirn nachgewiesen werden (Oleary & Oconner, 1995; Oleary et al., 1996).

Eine Beteiligung der POP am Angiotensin I - Processing und somit eine Blutdruck-beeinflussende Wirkung wurde ebenfalls belegt (Chappell et al., 1990).

Des weiteren beeinflusst das Enzym Lern- und gedächtnisbildende Prozesse. Bei Versuchen mit Ratten konnten Amnesie-Effekte durch Injektion von POP-Inhibitoren verringert werden (Yoshimoto et al., 1987, Shishida et al., 1996). Die mit der Alzheimer'schen Krankheit einhergehende Bildung und Ablagerung des β -Amyloidproteins in Hirnneuronen kann im Tiermodell durch Langzeitapplikation von POP-Inhibitoren reduziert werden (Shinoda et al., 1997; Kato et al., 1997).

Eine allgemeine Bedeutung bei der ontogenetischen Entwicklung von Hirnneuronen wird ebenfalls diskutiert. In diesem Zusammenhang ist die Existenz eines aus Ratten- (Soeda et al., 1985) und Schweinehirn (Yoshimoto et al., 1982) isolierten endogenen Inhibitorpeptides (M_R 7000 ; K_i : $2 \mu\text{M}$) interessant, das einen biologischen Modulator der POP-Aktivität darstellen könnte.

Untersuchungen an embryonischen Zellen der Fleischfliege *Sarcophaga peregrina* (Ohtsuki et al., 1997) und an Säugerzellen (Ishino et al., 1998) zeigten, daß eine im Nucleus lokalisierte POP in die DNA-Synthese und Zellproliferation involviert ist.

3.3.2. Substrate und Inhibitoren

Die POP hydrolysiert Peptidbindungen am C-Terminus des Prolins in Peptiden mit einer Länge bis zu 30 Aminosäureresten. Längere Peptide werden auch im denaturierten Zustand nicht mehr erkannt (Taylor & Dixon, 1980; Moriyama et al., 1988). Die Xaa-Pro Bindung muß dabei in *trans*-Konformation vorliegen (Fischer et al., 1983). Nach Untersuchungen von (Polgar, 1992) liegt die POP in zwei verschiedenen, physiologisch kompetenten Formen vor. Die unterhalb von pH 7 aktive Form besitzt höhere Reaktivität für saure Aminosäurereste in P₂-Position und zeigt in D₂O kinetische Isotopie-Effekte. Die oberhalb von pH 7 aktive, als physiologisch relevante Enzymform betrachtete POP bevorzugt in P₂-Position basische Aminosäurereste und ist nicht sensitiv für kinetische Isotopie-Effekte (Polgar, 1992; Noula et al., 1997).

Das Enzym verfügt über eine ausgedehnte Substratbindungsregion, die von der S₃ bis zur S₂'-Position reicht (Wilk, 1983). Im Bereich von S₂ bis S₁' werden nach (Walter & Yoshimoto, 1978; Yoshimoto et al., 1983; Schönlein et al., 1990) keine D-Aminosäuren akzeptiert.

N-geschützte Dipeptidester bzw. -amide stellen eine für die Hydrolyse notwendige Minimalstruktur dar. Freie Di- bzw. Tripeptide der Struktur Pro-Yaa bzw. Xaa-Pro-Yaa werden nicht vom Enzym hydrolysiert. In P₁-Position werden neben Pro auch Ala, Sarcosin und N-Methyl-Alanin akzeptiert (Nomura, 1986; Schutkowski, 1992; Jakob, 1994). Substrate, mit einem hydrophoben Aminosäurerest in P₁'-Position werden effizienter hydrolysiert als solche mit einem basischen oder sauren Rest, Pro wird dort nicht akzeptiert (Übersicht: Yaron & Naider, 1993).

Die POP ist hemmbar mit DFP, jedoch nicht oder nur begrenzt mit PMSF (Übersicht: Wilk, 1983). Das cysteinhaltige eukaryotische Enzym ist sensitiv gegenüber Thiolreagenzien wie z.B. *p*-Chlormercuribenzoat, das cysteinfreie prokaryotische Enzym hingegen nicht (Yoshimoto et al., 1983). Verbindungen vom Chlormethylketon-Typ wie z.B. Z-Gly-Gly-Pro-CH₂Cl sind gute Inhibitoren der POP, sie alkylieren einen Histidylrest im aktiven Zentrum.

Substratanaloge mit einer C-terminalen Prolinal-Gruppe sind, im Gegensatz zu den entsprechenden Säuren und Alkoholen, hochaffine, wahrscheinlich ÜZ-analoge Inhibitoren (Wilk, & Orłowski, 1983; Friedman et al., 1984). Durch Einführung eines Schwefelatoms in den Pyrrolidin-Ring des Prolins (Tsuru et al., 1988; Kanai et al., 1997) können diese Effekte noch gesteigert werden. Eine weitere Gruppe hochaffiner, irreversibel und POP-spezifisch wirkender Inhibitoren stellen Peptidyl-Diazomethyl-Ketone (Knisatschek & Bauer, 1986) und substituierte Pyrrolidide wie FMOC-Aminoacyl-cyanopyrrolidide (Li et al., 1996) und das Z-Pro-3-fluorpyrrolidid (Goossens et al., 1997) dar. Diese Substanzen sind für *in vivo* Inhibierungsexperimente interessant, da sie die Blut-Hirn-Schranke passieren, und somit Aufschluß über die *in vivo* Verteilung und Aktivität der POP, speziell deren Einfluß auf Neuropeptide, geben können.

3.3.3. Ergebnisse der Untersuchungen

Für die enzymkinetischen Untersuchungen wurden zum einen die gleichen Modellsubstrate verwendet wie für α -Chymotrypsin und Subtilisin C., wobei die POP die Peptidbindung nach dem Pro hydrolysiert. Weiterhin wurden als Oxo- bzw. Thioxyarylamide die Derivate Suc-Ala-Pro-NH-Np und Suc-Ala-Pro- ψ [CS-NH]-Np untersucht (vgl. Abb.22). Zur Interpretation der Ergebnisse wurden als Vergleichsgrundlage die kürzlich publizierten Röntgenkristallstruktur-Daten der POP aus Schweinemuskel, komplexiert mit dem ÜZ-analogen Inhibitor Z-Pro-Prolinal, herangezogen (Fülöp et al., 1998).

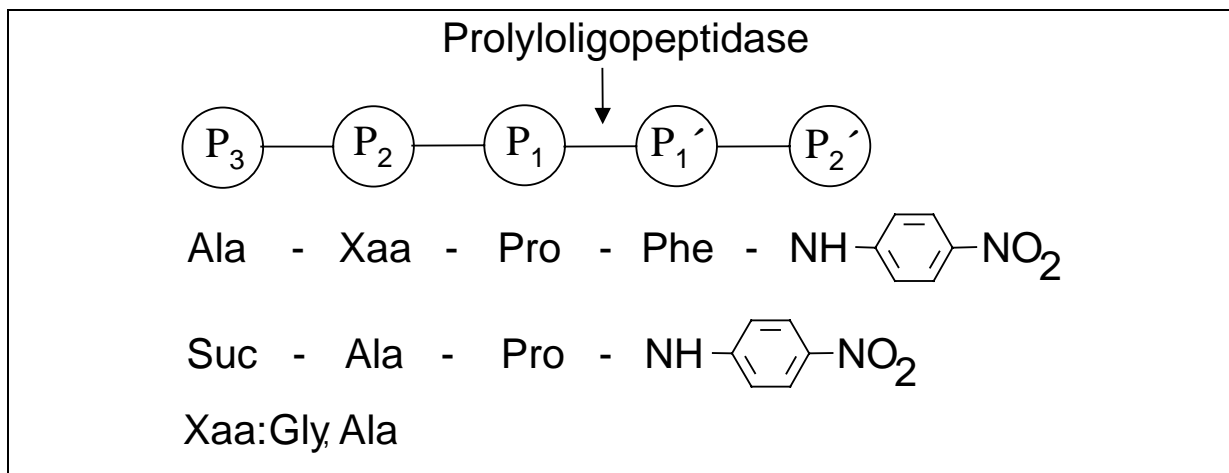


Abb.22: Schematische Darstellung der Substratspezifität der POP. Der Pfeil kennzeichnet die zu hydrolysierende Bindung.

3.3.3.1. Hydrolyse von P₃, P₂ und P₁'-thioxylierten Tetrapeptid-4-Nitroaniliden

Die pH-Abhängigkeit der Katalysemechanismen und der große Einfluß der Ionenstärke auf die Katalyse (Polgar, 1995) unterscheiden die POP von anderen Serinproteasen wie Chymotrypsin oder Subtilisin. Die für letztere beobachteten HB zwischen dem P₁-NH und dem S₁-CO sind bei der POP wegen des fehlenden Protons am Prolin nicht möglich. Eine ersatzweise Bildung von HB zwischen dem P₂-CO und S₂-NH, ähnlich wie in Cysteinproteasen gefunden, wird im Komplex mit Z-Pro-Prolinal zwischen P₂-Pro-CO und dem NH der Seitenkette von Arg643 beobachtet (Fülöp et al., 1998). Die von (Polgar et al., 1993) beschriebene, um mindestens 5 Größenordnungen schlechtere Hydrolyse des Derivates Z-Gly- ψ [CS-N]-Pro-Nap, bei dem die Ausprägung besagter HB wegen der Thioxosubstitution in P₂-Position stark abgeschwächt (oder aufgehoben) sein sollte, scheint diese These zu belegen. Diese Resultate konnten in unseren Untersuchungen unter Verwendung der POP aus humaner Plazenta jedoch nicht bestätigt werden. Die Hydrolyse der Substrate Ala-Xaa- ψ [CS-N]-Pro-Phe-NH-Np (Xaa: Gly, Ala) verläuft zwar mit um 2-3 Größenordnungen verringerter katalytischer Effizienz, hauptsächlich wegen der kleineren k_{cat} -Werte, ist aber um mindestens 2 Größenordnungen effizienter als bei den Derivaten mit einem thioxylierten Pro (vgl. Tab.10

und 11). Dies kann einerseits ein Beleg dafür sein, daß die diskutierte HB zwischen dem P₂-CO und S₂-NH tatsächlich von großer Bedeutung für den Katalyseprozeß ist, andererseits kann die in P₂-thioxylierten Substraten nun wieder mögliche Wechselwirkung des P₁-Pro mit dem Oxyanionenbindungszentrum für die bessere Hydrolyse dieser Derivate verantwortlich gemacht werden. Die Existenz einer Oxyanionenhöhle wurde an Hand der Röntgenkristallstruktur-Daten der POP erstmals belegt. Das Anion des P₁-Carbonylsauerstoffes wird im TI über HB zum Seitenketten-NH des Asn555 bzw. zur Seitenketten-Hydroxylgruppe des Tyr473 stabilisiert (Fülöp et al., 1998).

Peptid-Derivat	K _m (mM)	10 ³ * k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _m (M ⁻¹ s ⁻¹)
Ala-Gly-Pro-Phe-NH-Np	0.102 ± 0.011	410 ± 12	4 010
Ala-ψ[CS-NH]-Gly-Pro-Phe-NH-Np	0.034 ± 0.002	728 ± 12	21 410
Ala-Gly-ψ[CS-N]-Pro-Phe-NH-Np	0.223 ± 0.043	5.4 ± 0.4	24
Ala-Gly-Pro-Phe-[CS-NH]-Np	0.029 ± 0.003	105 ± 3	3 620
Ala-Ala-Pro-Phe-NH-Np	0.016 ± 0.002	975 ± 30	60 940
Ala-ψ[CS-NH]-Ala-Pro-Phe-NH-Np	0.023 ± 0.001	815 ± 10	35 435
Ala-Ala-ψ[CS-N]-Pro-Phe-NH-Np	0.150 ± 0.020	35 ± 2	233
Ala-Ala-Pro-Phe-[CS-NH]-Np	0.012 ± 0.001	284 ± 7	23 670

Tab.10: Kinetische Daten für die Hydrolyse von Derivaten, deren Sekundärbindungsstellen thioxyliert sind, durch die POP aus humaner Plazenta. Zum Vergleich sind die Daten der entsprechenden Oxo-Verbindungen angegeben. Alle Messungen erfolgten in 100 mM TRIS, 1 mM DTT, pH 7.5 bei 30°C.

Die K_m-Werte der in P₂-Position (Xaa) thioxylierten Derivate sind um den Faktor 2 (Xaa = Gly) bzw. 5 (Xaa = Ala) größer als für die entsprechenden Oxo-Derivate. Es ist bekannt, daß die Geschwindigkeitskonstanten der *cis* → *trans* Isomerisierung in -Xaa-ψ[CS-N]-Pro- Bindungen in Folge der Thioxosubstitution um ca. 2 Größenordnungen verringert sind, wohingegen das *cis/trans* Gleichgewicht nicht verschoben wird (Schutkowski et al., 1997). Auch die POP ist bezüglich der Peptidyl-Prolyl-Peptidbindung *trans*-spezifisch (Fischer et al., 1983; Lin & Brandts, 1983), was für den Fall, daß die Geschwindigkeitskonstante der Hydrolyse die der Isomerisierung übersteigt, eine Reduktion der effektiv nutzbaren *trans*-Anteils, und somit eine scheinbare Verringerung der Substrataffinität bedeuten würde. Bei einem maximalen *cis*-Gehalt von 33% (Xaa = Gly) und Messung der Proteolysereaktion im Bereich zwischen 0 und 10 % Umsatz des Substrates sind die größeren K_m-Werte jedoch nur teilweise über die verlangsamte *cis/trans* Gleichgewichtseinstellung zu erklären. Die um ca. 12 kJ/mol erhöhte Rotationsbarriere der

Thiopeptidbindung könnte auch die Wechselwirkungen des *trans*-Isomers mit dem aktiven Zentrum des Enzyms bei der Bildung des Übergangszustandes der Acylierung beeinflussen, speziell die im Rahmen des vorgeschlagenen „induced fit“ Mechanismus stattfindenden Konformationsänderungen (Polgar, 1992; Polgar et al., 1993) sollten wegen der erschwerten Rotation um die C-N Bindung verlangsamt sein.

Die vorhergehenden Untersuchungen machen deutlich, daß eine Substitution des Carbonylsauerstoffes durch ein Schwefelatom in P₂-Position (Xaa) drastische Auswirkungen auf die Substrateigenschaften dieser Peptidderivate hat. Deshalb war es interessant, die Untersuchungen auf die jeweils benachbarten Peptidbindungen auszudehnen, und den Einfluß einer Thioxylierung der P₃-Position (Ala) und der P₁'-Position (Phe) zu untersuchen. Bei beiden konnte ein Einfluß auf die enzymkinetischen Konstanten festgestellt werden, was ein weiterer Beleg für die ausgedehnte Substratbindungsregion der POP ist.

Beide in P₁'-Position (Phe) thioxylierten Derivate sind gute Substrate für das Enzym. Bei beiden fällt auf, daß die k_{cat} -Werte gegenüber der jeweiligen Oxo-Verbindung um den Faktor 3 bis 4 kleiner sind. Im Falle des Derivates mit Xaa = Gly wird dies durch eine nahezu adäquate Erhöhung der Substrataffinität kompensiert, so daß praktisch gleiche katalytische Effizienz resultiert. In der Reihe mit Xaa = Ala besitzt bereits die Oxo-Verbindung eine hohe Affinität zum Enzym, die beim P₁'-thioxylierten Derivat keine weitere Steigerung mehr erfährt. Somit ist auch dessen k_{cat}/K_m -Wert gegenüber dem zugehörigen Oxo-Substrat geringer. Es ist schwierig, diese Ergebnisse zu interpretieren. Die Erhöhung der Substrataffinität im P₁'-thioxylierten Derivat mit Xaa = Gly ist möglicherweise ein eher unspezifischer Effekt, der aus der höheren Hydrophobizität des Schwefels resultiert. Dafür würde sprechen, daß, mit Ausnahme der nicht hydrolysierten Derivate, alle Vertreter der Modellsubstratreihe mit Xaa = Ala eine höhere Affinität zum Enzym haben als die der Glycin-Reihe. Die Verringerung der k_{cat} -Werte ist wahrscheinlich auf ungünstigere Enzym-Substrat Wechselwirkungsmöglichkeiten zurückzuführen, die durch den größeren van der Waals Radius des Schwefelatoms verursacht werden.

Die in P₃-Position (Ala) thioxylierten Peptide sind sehr gute Substrate der POP. Eine HB zwischen dem P₃-CO zur Seitenkette von Trp595 wurde aus der Kristallstruktur mit Z-Pro-Prolinal abgeleitet. Die mögliche Störung dieser HB durch die P₃-Thioxosubstitution reflektiert sich jedoch nicht in verminderten Substrateigenschaften der hier untersuchten Derivate. Beim Derivat mit Xaa = Gly sind k_{cat} und K_m sogar noch besser als beim Oxo-Substrat, was zu einer fünffach höheren katalytischen Effizienz führt. Hingegen sind die katalytischen Konstanten des Derivates mit Xaa = Ala gegenüber dem Oxo-Derivat geringfügig verschlechtert (s.Tab.10). Kooperative Effekte in Form einer gegenseitigen Abstoßung zwischen der Methylseitenkette des Alanins und dem Schwefel der Thiopeptidbindung können als Ursache für die beobachteten Effekte in Frage kommen

(Schutkowski et al., 1997). Die Aufhebung dieses sterischen Zwanges im Derivat mit Xaa = Gly würde dessen affinere Bindung und effizientere Hydrolyse bewirken. Ein vergleichbares Verhalten wurde für das „Angiotensin Converting Enzyme“ gefunden, welches nicht in der Lage ist, die -Phe- ψ [CS-NH]-Ala- Bindung zu hydrolysieren, während ein entsprechendes Derivat mit -Phe- ψ [CS-NH]-Gly- gute Substrateigenschaften besitzt (Maziak et al., 1986).

Die fünffach erhöhte Proteolyseempfindlichkeit von Ala- ψ [CS-NH]-Gly-Pro-Phe-NH-Np ist das erste Beispiel innerhalb der hier untersuchten Derivate, bei dem der proteolytische Abbau in Folge der Thioxosubstitution deutlich verstärkt wird. Dies unterstreicht, daß die Effekte einer Sekundärbindungsstellen-Thioxylierung auf die enzymkatalysierte Proteolyse von Peptidsubstraten sich nicht immer in erhöhter Proteolyseempfindlichkeit ausdrücken, und somit auch nicht vorhersagbar sind.

3.3.3.2. Derivate mit P₁-thioxylierter Peptidbindung

Beide Formen der POP sind in der Lage die Thioxoarylamidbindung im Derivat Suc-Ala-Pro- ψ [CS-NH]-Np zu hydrolysieren, jedoch nur mit mehr als drei Größenordnungen reduzierter katalytischer Effizienz (vgl. Tab.11). Die angegebenen k_{cat}/K_m Werte sind aus dem prozentualen Umsatz einer langzeitinkubierten Probe (24h) abgeschätzt, wobei der Aktivitätsverlust des humanen Enzyms von 35% bzw. 20% des bakteriellen Enzyms über die Inkubationszeit berücksichtigt wurden. In vergleichbaren Untersuchungen am Derivat Z-Gly-Pro- ψ [CS-NH]-Naphthylamid mit POP aus Schweinemuskel wurde eine im Vergleich zum Oxo-Substrat um den Faktor 5 622 schlechtere enzymkatalysierte Hydrolyse beobachtet (Polgar et al., 1993).

Der beobachtete Abfall an katalytischer Effizienz bei der Hydrolyse der Thioxoarylamid-Derivate bewegt sich in der gleichen Größenordnung, wie er für α -Chymotrypsin und Subtilisin C. gefunden wird. Bei Zusatz von Leu-NH₂ als Nucleophil konnte jedoch kein Thioxoacyltransfer beobachtet werden. Die prinzipielle Möglichkeit von POP-katalysierten Acyltransferreaktionen unter Verwendung von Estern als Acylkomponenten wurde hingegen nachgewiesen, wenngleich auch Unterschiede zu den voranstehend beschriebenen Proteasen zu existieren scheinen. Die notwendige Nucleophilkonzentration für eine enzymkatalysierte Peptidsynthese liegt im Bereich von 0.5 bis 1 M, und übersteigt damit den Bedarf der Proteasen α -Chymotrypsin und Subtilisin C. um eine Größenordnung (Krieg & Wolf, 1995). Die Sättigungskurve der enzymkatalysierten Synthese ist bei Nucleophilkonzentrationen über 1 M von einer partiellen Enzymhemmung überlagert, deren Intensität wiederum von der verwendeten Acylkomponente abhängt. Selbst in optimierten Reaktionsansätzen überstieg die Syntheseausbeute nicht 50 % (Krieg & Wolf, 1995). Eine enzymkatalysierte Peptidsynthese unter Kryobedingungen wurde kürzlich für die POP aus *Flavobact. Meningosepticum*

beschrieben (Haensler & Jakubke, 1998). Bei Verwendung von Benzoyl-Gly-Pro-OMe als Acylkomponente konnte unter optimierten Bedingungen der Acyltransfer auf Leu-NH₂ auf 73 % gesteigert werden, dennoch weisen einige andere Befunde wie z.B. das verschobene Temperaturoptimum (-3°C), die Nichtverwendbarkeit aromatischer Aminosäureamide als Nucleophile sowie die reduzierte S₁-Stereospezifität unter Kryobedingungen auf Besonderheiten bei POP-katalysierten Acyltransferreaktionen hin (Haensler & Jakubke, 1998).

Peptid-Derivat	K _m (mM)	10 ³ * k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _m (M ⁻¹ s ⁻¹)
POP (<i>humane Plazenta</i>) Suc-Ala-Pro-NH-Np Suc-Ala-Pro-ψ[CS-NH]-Np	0.55 ± 0.07	4 700 ± 200	8 540 < 5
Ala-Gly-Pro-Phe-NH-Np Ala-Gly-Pro-ψ[CS-NH]-Phe-NH-Np	0.102 ± 0.011	410 ± 12	4 010
Ki: 0.012 ± 0.001			
Ala-Ala-Pro-Phe-NH-Np Ala-Ala-Pro-ψ[CS-NH]-Phe-NH-Np	0.016 ± 0.002	975 ± 30	60 940
Ki: 0.044 ± 0.003			
POP (<i>Flavobact. meningosepticum</i>) Suc-Ala-Pro-NH-Np Suc-Ala-Pro-ψ[CS-NH]-Np	0.43 ± 0.04	17 400 ± 170	40 460 < 20

Tab.11: Kinetische Daten für die Hydrolyse bzw. Inhibierung der POP durch Thioxoarylamide und Thioxopeptid-4-nitroanilide, deren zu hydrolysierende Bindung thioxyliert ist, im Vergleich mit den entsprechenden Oxo-Verbindungen. Alle Messungen erfolgten in 100 mM TRIS, 1 mM DTT, pH 7.5 bei 30°C.

Im Gegensatz zur Hydrolyse der Thioxoarylamidbindung ist, wie in früheren Untersuchungen gezeigt werden konnte, das humane Enzym nicht in der Lage, die nichtaktivierte Thioxopeptidbindung in den Derivaten Ala-Xaa-Pro-ψ[CS-NH]-Phe-NH-Np (Xaa: Gly, Ala) zu hydrolysieren (Jakob, 1994; Schutkowski et al., 1997). In diesem Punkt verhält sich die einer neuen Gruppe von Serinproteasen zugeordnete POP (Rawlings et al., 1991; Polgar & Szabo, 1992; Rawlings & Barrett, 1993) identisch wie α-Chymotrypsin und Subtilisin C. (Barrett & Rawlings, 1995). Die reversible Bindung der P₁-thioxylierten Tetrapeptid-4-Nitroanilide mit K_i-Werten, die den K_m-Werten der Substrate vergleichbar (Xaa = Ala) bzw. deutlich niedriger (Xaa = Gly) sind, zeigt, daß die Ausbildung des Michaelis-Komplexes zwischen den Thioxoderivaten und der POP möglich ist. Folglich muß auch hier die Hydrolyseresistenz der nichtaktivierten Thioxopeptidbindung im Mißlingen des Acylierungsschrittes begründet liegen.

Obwohl die Enzyme der POP-Familie zur Gruppe der Serinproteasen gehören, unterscheiden sie sich von den pankreatischen Proteasen und denen vom Subtilisin-Typ in mehreren Punkten. In $^1\text{H-NMR}$ -Messungen konnten für die POP und Oligopeptidase B, einem anderen Mitglied der POP-Klasse von Serinproteasen, keine Resonanz der Protonen von $\text{His652-NH}_\delta\text{H}$ und $\text{His652-N}_\epsilon\text{H}^+$ im Grundzustand gefunden werden. Erst nach Bindung des Inhibitors Boc-D-Val-Leu-Arg-Boronsäure findet man eine starke Resonanz bei 15.8 p.p.m. Dies weist auf die Bildung von LBHB ausschließlich im ÜZ-analogen Komplex hin (Kahyaoglu et al., 1997). Im Grundzustand hingegen findet man zwei Resonanzen, die zwei protonierten nichtkatalytischen His-Resten zugewiesen werden. Derartige HB sind für andere Gruppen von Serinproteasen bislang nicht beschrieben.

Kürzlich gelang es erstmals, eine zu den Serinproteasen zählende Prolin-Aminopeptidase aus *Xanthomonas campestris* zu kristallisieren (Medrano et al., 1998). Dieses Enzym kann die Hydrolyse N-terminaler Prolinreste von Peptiden katalysieren. Die gefundene Sekundärstruktur dieses Enzyms zeigt einen hohen Grad an Übereinstimmung mit Strukturvorhersagen, die für die katalytisch aktive C-terminale Domäne der POP gemacht (Goossens et al., 1995) und an Hand der kürzlich beschriebenen Kristallstruktur (Fülöp et al., 1998) bestätigt wurden. Die für das kristallisierte Enzym gefundene hydrophobe, in ihren Dimensionen auf die Anpassung eines Prolinrestes optimierte S_1 -Bindungstasche, die erstmals belegte katalytische Triade einer Pro-spezifischen Serinprotease und der in der Nähe des katalytisch aktiven Serinrestes gefundene Cys-Rest existieren in ähnlicher Form in der eukaryotischen POP. Die partielle Hemmung dieser Serinprotease mit Thiolreagenzien ist somit zu erklären.

Die Ergebnisse belegen einen deutlichen Einfluß von Thioxosubstitutionen auf die POP-katalysierte Peptidbindungshydrolyse. Die 160- (Xaa = Gly) bzw. 260-fach (Xaa = Ala) reduzierten $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ -Werte der P_2 -thioxylierten Derivate stützen die These einer essentiellen HB zwischen dem P_2 -CO und S_2 -NH. Die für das P_3 -thioxylierte Derivat mit Xaa = Gly gemessenen kinetischen Konstanten zeigen, daß Thioxylierungen die proteolytische Stabilität von Thiopeptiden auch verringern können. Der Einfluß einer P_1 -Thioxylierung wurde hier erstmals untersucht, und deren Einfluß auf k_{cat} demonstriert. Das Verhalten der POP gegenüber Derivaten mit einer thioxylierten zu hydrolysierenden Bindung ist dem der voranstehend untersuchten Proteasen vergleichbar, mit dem Unterschied, daß für die POP kein Thioxyacyltransfer nachgewiesen werden konnte.

3.4. Dipeptidylpeptidase IV

3.4.1. Vorkommen, Eigenschaften und biologische Funktionen

Die Dipeptidylpeptidase IV ist eine prolinpezifische Serinprotease (Kenny et al.; 1976) die Dipeptide vom N-Terminus von Peptidketten, deren zweiter Aminosäurerest (P_1 -Position) ein Prolin ist, hydrolysiert. Sie ist hemmbar mit DFP, jedoch nicht mit PMSF (Barth et al., 1974) und besitzt ein pH-Optimum im schwach alkalischen Bereich. Das Enzym wurde 1966 bei der Untersuchung enzymatischer Aktivitäten der Rattenleber erstmals beschrieben und entsprechend seiner Aktivität als Glycylprolyl- β -naphtylamidase bezeichnet (Hopsu-Havu & Glenner, 1966). Die DP IV ist ein Glycoprotein mit neun Glykosylierungsstellen, die mit den Zuckern Mannose, Galactose und Sialinsäure verknüpft sind (Fukasawa et al., 1978). Die N-Glykosylierung von Asn319 ist dabei essentiell, eine Blockierung der Glykosylierung durch eine Asn319Gln Punktmutation verhindert Faltung, Targeting und Aktivität (Fan et al., 1997). Das native, glykosylierte Enzym besteht aus zwei identischen Untereinheiten mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 110-130 kD, die aus Rattenleber-cDNA abgeleitete Primärsequenz besteht aus 767 Aminosäuren mit einem M_R von 88 107 Dalton (Ogata et al., 1989). Die DP IV ist ubiquitär verbreitet, sie wurde aus zahlreichen Säugergeweben, Bakterien, Pilzen und aus Bienengift (Kreil et al., 1980; Übersichten: Yaron & Naider, 1993; Cunningham & O'Conner, 1997) gewonnen. Kürzlich wurde das Enzym auch in Pflanzen wie z. B. in Samen und Geweben der Gurke (*Cucumis sativus*) (Stano et al., 1994) und im Mohn (*Papaver Somniferum*) entdeckt (Stano et al., 1997). Das humane Enzym wurde als membrangebundenes Ectoenzym u.a. aus der Niere (Hama et al., 1982), Nierenrinde (Wolf et al., 1989), der Plazenta (Puschel et al., 1982) und aus Lymphozyten (Mentlein et al., 1986) isoliert, eine lösliche Form wurde aus Blutplasma (Küllertz et al., 1986; de Meester et al., 1996) und Urin (Chikuma et al., 1990) gewonnen.

Die DP IV ist an einer Vielzahl verschiedener physiologischer Prozesse beteiligt (Morimoto & Schlossman, 1998). Das an der Oberfläche von T-Zellen befindliche Enzym spielt eine wichtige Rolle bei der Immunregulation, dabei ist es mit einem anderen Oberflächenprotein, der Adenosin Deaminase (ADA) assoziiert (Kameoka et al., 1993). In diesem Fall fungiert die DP IV als Bindungspartner der ADA, deren Deaminaseaktivität die lokale Adenosin-Konzentration erniedrigt und somit die Adenosin-vermittelte Inhibierung der T-Zell Reifung und Interleukin-2 Produktion abschwächt (d.h. die Immunreaktion verstärkt), die Proteaseaktivität wird für die DP IV - ADA Komplexierung nicht benötigt (Dong et al., 1996). Eine Beteiligung der Proteaseaktivität der DP IV wurde in anderen Experimenten beschrieben. Die Hemmung des Enzyms mit DP IV spezifischen Inhibitoren bewirkte in PWM- (pokeweed mitogen) stimulierten peripheren Blutmonocyten und T-Zellen eine

verminderte DNA-Synthese und Cytokinproduktion (Reinhold et al.; 1997). Die Wirkung erfolgt hier wahrscheinlich indirekt über eine erhöhte Sekretion von TGF β (transforming growth factor β), der als eigentlicher Auslöser der beobachtbaren Effekte gilt. Die Bindung von TGF β an spezifische Antikörper hebt die durch DP IV Inhibitoren induzierten Effekte auf (Reinhold et al.; 1997). Ein direkter Einfluß der DP IV-Aktivität auf Tyrosin-Phosphorylierungsreaktionen wurde für verschiedene Kinasen, die ihrerseits eine Rolle in der Signaltransduktion der T-Lymphozyten spielen, beschrieben (Kahne et al., 1995; Hegen et al., 1997).

Große Beachtung erlangte die DP IV als nachgewiesen wurde, daß sie ein essentieller Cofaktor für Bindung und Infektion von T-Lymphoblasten und Monocyten mit dem HIV-1 Virus ist (Callabaut et al., 1993). Die Hemmung der DP IV durch den Virus erfolgt dabei sowohl über direkte Inhibierung der Proteaseaktivität (Wrenger et al., 1996) als auch über die Blockierung der DP IV - ADA Wechselwirkung (Valenzuela et al., 1997). Die Vorbehandlung von T-Zellen mit monoklonalen Anti-DP IV-Antikörpern bzw. DP IV-Inhibitoren führte zu einer reduzierten Infektion mit dem HIV-1 Virus (Callabaut et al., 1993; Jiang et al., 1997). Auch verschiedene Chemokine, die primär Substrate der DP IV darstellen, können den HIV-Infektionsprozeß hemmen (Ohtsuki et al., 1998; Shioda et al., 1998).

Weitere Krankheitsbilder wurden beschrieben, in welche die Proteaseaktivität der DP IV involviert ist, so z.B. Arthritis (Tanaka et al., 1997) und Multiple Sklerose (Bou-Gharios et al., 1995; Reinhold et al., 1998). Die Bedeutung des an Dünndarm- und Nierenzellen gebundenen Enzyms für die Assimilation bzw. Reassimilation von prolinhaltigen Peptiden konnte an Hand von DP IV-defizienten Ratten belegt werden. Diese zeigen, im Gegensatz zu nichtdefizienten Tieren, pathologische Veränderungen bei Verabreichung einer prolinreichen Diät (Miyamoto et al., 1987; Tirupathi et al., 1993; Suzuki et al., 1993).

3.4.2. Substrate und Inhibitoren

Die minimale Substratstruktur stellen N-terminal freie (Barth et al., 1984) Tripeptide bzw. chromophore Dipeptidamide dar. In der P₁-Position müssen sie ein Pro enthalten, mit verringerter Effizienz werden auch Ala und Hydroxyprolin akzeptiert (Heins et al., 1988). Eine Modifikation des Pyrrolidinringes des Pro durch Ringverkleinerung (Azetidin-2-carbonsäure), Ringvergrößerung (Piperidin-2-carbonsäure) und Einbau von Heteroatomen (Oxazolidin-4-carbonsäure, Thiazolidin-4-carbonsäure) wird von der DP IV akzeptiert (Rahfeld et al., 1991; Schutkowski, 1992). N-Methyl-Alanin und Sarcosin als nichtzyklische P₁-Pro Surrogate werden mit ein bzw. zwei Größenordnungen verringerter katalytischer Effizienz hydrolysiert (Schutkowski, 1992). Die Hydrolyse von Pro-Pro Bindungen (Pro in P₁-Position) wird nicht beobachtet (Harada et al., 1982). Derivate mit zyklischen bzw.

N-Alkyl-Aminosäureresten in P₁'-Position werden generell nicht hydrolysiert (Schutkowski, 1992).

Substrate mit P₁-Pro sind bezüglich der P₂-Position absolut L-spezifisch, mit P₁-Ala und D-Aminosäureresten oder achiralen Aminosäuren in P₂-Position wird eine langsame Hydrolyse beobachtet. Es werden nur Substratmoleküle hydrolysiert, deren Xaa-Prolyl Peptidbindung in der *trans*-Konformation vorliegt (Fischer et al., 1983b). Bei der Hydrolyse von Substraten mit P₁-Pro tritt ein anderer geschwindigkeitsbestimmender Schritt auf als bei den entsprechenden Ala-Substraten (Wolf et al., 1978; Barth et al., 1984; Heins et al., 1988).

Das ubiquitär verbreitete Enzym besitzt ein breites Spektrum potentieller nativer Substrate. Theoretisch kommen alle Peptide und deren Intermediate mit einem N-terminalen Xaa-Prolyl-Rest in Frage, die in einem DP IV-haltigen Gewebe oder Zellkompartiment vorkommen. Intensiv untersucht sind die Hydrolyse von Substanz P und dessen Derivaten (Kato et al., 1978; Heymann & Mentlein, 1978), β -Casomorphin (Barth & Oehme, 1981; Puschel et al., 1982; Kikuchi et al., 1988) und des humanen „growth hormone releasing hormone“ (GHRH) (Frohman et al., 1989). Weiterhin wurden als Substrate identifiziert: Fibrin, Prolactin, Melanostatin, Promellitin, Aprotinin, Renin-Inhibitor u.a. (Nausch et al., 1990; Übersichten in: Yaron & Naider, 1993 und Cunningham & O'Conner, 1997).

Die Beteiligung der DP IV an zahlreichen physiologischen Prozessen war Anstoß für die Entwicklung von hochaffinen, reversiblen und hochspezifischen Inhibitoren, mittels derer die proteolytische Aktivität des Enzyms moduliert werden kann. Eine hohe Spezifität ist dabei wichtig, um die Inhibition anderer Prolin-spezifischer Proteasen zu unterbinden. Als effiziente Inhibitoren erwiesen sich Dipeptid-Derivate der Struktur Xaa-Pro-Boronsäure, die jedoch im Zuge einer nichtenzymatischen Zyklisierungsreaktion langsam inaktiviert werden (Snow et al., 1994; Coutts et al., 1996; Pargellis et al., 1997). Dipeptidyl-Diphenylphosphonsäureester stellen effiziente irreversible Inhibitoren dar, die beste Hemmung wird mit Pro-Pro-Diphenylphosphonat (Prodipine) erreicht (Lambeir et al., 1996; Demeester et al., 1997). Als Dipeptidderivate mit einem P₁-Pro Surrogat sind als reversible Inhibitoren bekannt: Pyrrolidide und Thiazolidide (Schön et al., 1991), Cyanopyrrolidide (Li et al., 1995; Asworth et al., 1996a) und Cyanothiazolidide (Asworth et al., 1996b). Die irreversible Hemmung mit N-Peptidyl-O-aryl-hydroxylamin (Fischer et al., 1983a; Demuth et al., 1988, 1989; Schön et al., 1991) verläuft, wie am Subtilisin Carlsberg gezeigt wurde, über ein intermediäres Isocyanat, welches mit dem Enzym irreversibel reagiert (Steinmetz et al., 1994). Die zunächst als Inhibitoren angesehenen Tripeptide Ile-Pro-Ile (Diprotin A) und Val-Pro-Leu (Diprotin B) (Umezawa et al., 1984) stellen langsam durch das Enzym hydrolysierte Substrate dar (Rahfeld et al., 1991).

3.4.3. Ergebnisse der Untersuchungen

Die für die kinetischen Messungen verwendeten Derivate und die Substratspezifität der DP IV sind in Abb.23 dargestellt.

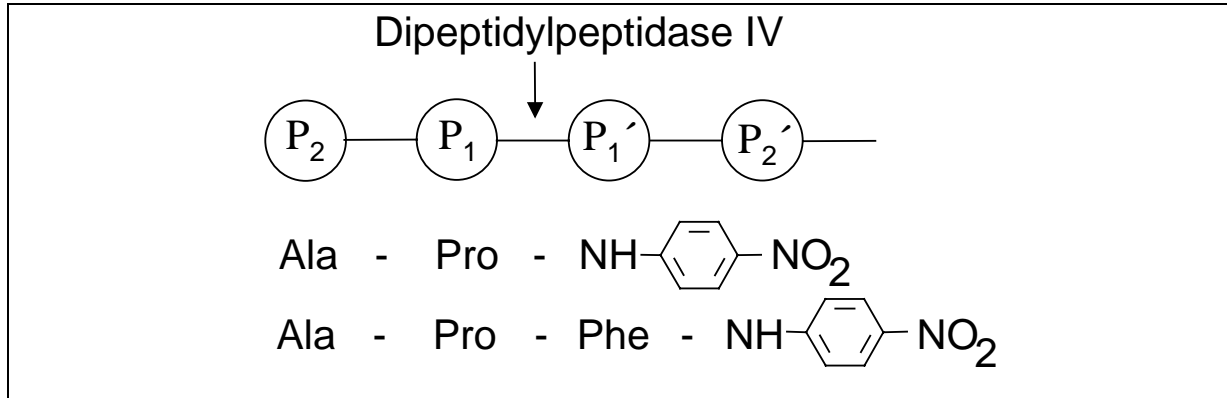


Abb.23: Schematische Darstellung der Substratspezifität der DP IV. Der Pfeil kennzeichnet die zu hydrolysierende Bindung.

3.4.3.1. Hydrolyse von P₂-thioxylierten Di- und Tripeptid-4-Nitroaniliden

Die Thioxylierung der P₂-Position (Ala) bewirkt bei Substraten der DP IV eine Verschlechterung sowohl von k_{cat} als auch K_m um Faktoren von 20 bis 30, und somit eine ca. 600-fache Reduktion der katalytischen Effizienz (vgl.Tab.12). Die im Gegensatz zu den bisher untersuchten Proteasen gefundene drastische Beeinflussung von K_m deutet auf andere Mechanismen bei der Enzym-Substrat Wechselwirkung hin.

Die DP IV wird, zusammen mit der POP, einer neuen Gruppe von Serinproteasen zugeordnet (Barrett et al., 1991; Polgar & Szabo, 1992; Barrett & Rawlings, 1995). Bisher ist nur wenig über den Katalysemechanismus der DP IV bekannt. Die ausgeprägte Substratspezifität der Protease für N-terminal protonierte Dipeptidreste mit P₁-Pro läßt, vor allem wegen des essentiellen Bedarfs einer protonierten Endgruppe, einige Besonderheiten im Ablauf des Katalyseprozesses erwarten.

Als katalytische Triade wurden die Aminosäurereste Ser624-Asp702-His734 ermittelt (David et al., 1993). Eine gemeinsame Funktion dieser Komponenten, wie für α -Chymotrypsin und Subtilisin C. gefunden, ist für die DP IV indes nicht belegt. Die Funktion von His als Säure-Base Katalysator bei der Acylierung ist fraglich, da dessen Modifizierung mit Diethylpyrocarbonat die Enzymaktivität nur um 30% verminderte (Harada et al., 1984). In der α -Chymotrypsin und Subtilisin C.-katalysierten Hydrolyse bewirkt eine Modifizierung des katalytisch aktiven His hingegen eine Reduktion der Enzymaktivität um bis zu 5 Größenordnungen (Carter & Wells, 1988). Im Gegensatz dazu ist der Asp-Rest für die

Katalyse essentiell (Ogata et al., 1992; Misumi et al., 1992), seine Funktion könnte aber, abweichend vom klassischen Schema der katalytischen Triade, darin bestehen, den positiv geladenen N-Terminus des Substrates über eine ionische Wechselwirkung zu stabilisieren.

Basierend auf „Molecular Modeling“ Berechnungen wird eine *trans* → *cis* Isomerisierung als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im Zuge der Acylenzymbildung für möglich gehalten, die erhöhte Rotationsbarriere um die Thioxozeptidbindung könnte somit eine entsprechende Reduktion der Acylierungsgeschwindigkeit bewirken (Brandt et al., 1996). Gegen diese These sprechen allerdings Ergebnisse von stopped-flow Messungen, die eine Zweiphasenkinetik der DP IV-katalysierten Hydrolyse des Substrates Gly-Pro-NH-Np zeigen (Fischer et al., 1983b). Die Amplitude der langsamen, von der Enzymkonzentration unabhängigen Phase korrelierte mit dem mittels NMR bestimmten *cis*-Gehalt des Substrates, die Aktivierungsparameter, aus den bei verschiedenen Temperaturen gemessenen Geschwindigkeitskonstanten der langsamen Phase berechnet, wiesen ebenfalls auf eine *cis/trans* Isomerisierung hin. Auch aus den Daten einer kompetitiven Inhibierung der DP IV mit den Dipeptiden Gly-Pro und Ala-Pro konnte eine *trans*-Spezifität des Enzyms abgeleitet werden. Neuere Untersuchungsergebnisse einer Tieftemperatur-kapillarelektrophoretischen Isomerentrennung der Hydrolyseprodukte von Ala-Pro-NH-Np zeigten, daß ausschließlich das *trans*-Konformere des Dipeptids Ala-Pro durch die DP IV freigesetzt wird (F. Thuncke, nichtpublizierte Daten).

Da zum gegenwärtigen Zeitpunkt der Katalysemechanismus der DP IV nicht geklärt ist, erscheinen weiterführende Spekulationen bezüglich des Einflusses der Thioxosubstitution auf die kinetischen Einzelkonstanten nicht sinnvoll.

Peptid-Derivat	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
Ala-Pro-NH-Np*	11.40 ± 0.40	54.6 ± 0.01	4 770 000
Ala- ψ [CS-N]-Pro-NH-Np*	395 ± 32	2.85 ± 0.14	7 210
Ala-Pro- ψ [CS-NH]-Np	n.m.		
Ala-Pro-Phe-NH-Np	12.90 ± 2.27	45.3 ± 3.10	3 517 000
Ala-Pro- ψ [CS-NH]-Phe-NH-Np	42.90 ± 5.52	0.47 ± 0.03	11 020

Tab.12: Kinetische Konstanten der Hydrolyse von Thioxozeptid-Derivaten und Thioxoarylamiden durch die Dipeptidylpeptidase IV. Alle Messungen erfolgten in 35 mM Hepes, pH 7.8 bei 25°C. *Daten übernommen von (Schutkowski et al., 1994); n.m.: nicht meßbar, wegen der schnellen nichtenzymkatalysierten Zyklisierung; vgl. Kap.2.2.2.

3.4.3.2. Derivate mit P₁-thioxylierter Peptidbindung

Die Untersuchungen auf Substrateigenschaften für das Derivat Ala-Pro-ψ[CS-NH]-Np waren nicht möglich, da sich diese Verbindung in wäßrigem Puffer (35 mM Hepes, pH 7.8) in weniger als 1 Sekunde vollständig zu einem zyklischen Produkt (vgl. Kap. 2.2.2.) umwandelt. Eine höhere Stabilität besitzt das Derivat Ala-Pro-ψ[CS-NH]-Phe-NH-Np, bei dem die Thiopeptidbindung durch die Aminosäure Phe vom 4-Nitroanilidrest getrennt ist. Obwohl auch hier die beschriebene Umwandlung zu beobachten ist, verläuft diese sehr viel langsamer (HWZ: 25 min unter Meßbedingungen), und die enzymkatalysierte Reaktion kann erfolgreich um das Substrat kompetieren.

Die DP IV ist als einzige der hier untersuchten Proteasen in der Lage, eine nichtaktivierte Thiopeptidbindung zu hydrolysieren (vgl. Tab.12). Auch hier wirkt sich die Thioxosubstitution auf die kinetischen Konstanten aus. Während der k_{cat} -Wert im Vergleich zur entsprechenden Oxo-Verbindung um 2 Größenordnungen reduziert ist, zeigt der K_m -Wert eine nur geringfügige Verschlechterung. Dieses Verhalten entspricht wieder dem der klassischen Serinproteasen α -Chymotrypsin und Subtilisin gegenüber Thioxoarylamid-Substraten. Dies läßt einen prinzipiell ähnlichen Katalysemechanismus vermuten, mit dem entscheidenden Unterschied, daß die Protonierung und der Ausstoß der Abgangsgruppe, gefolgt von der Bildung des Acylenzyms, bei der DP IV auch bei nichtaktivierten Derivaten möglich sind.

Eine über Zwischenstufen verlaufende Protonierung der austretenden Amin-Komponente durch das vom Substrat-N-Terminus stammende Proton (statt durch das His-NH₂H⁺ einer katalytischen Triade) könnte erklären, warum die DP IV die einzige bislang gefundene Serinprotease ist, welche eine nichtaktivierte, zwei native Aminosäurereste verbindende Thiopeptidbindung hydrolysieren kann.

Untersuchungen von (Yoshimoto et al., 1978) zeigten, daß die DP IV in der Lage ist, Transpeptidierungen auszuführen, bei der Inkubation des Enzyms mit Ala₃ wurden transient längere Peptide wie z.B. Ala₅ nachgewiesen. Die schrittweise DP IV katalysierte Kettenverlängerung am Arg-NH₂, unter Verwendung der 4-Nitroanilide Ala-Pro-NH-Np und Gly-Pro-NH-Np als Acylkomponenten, ermöglichte die Synthese von Enterostatinamid (Ala-Pro-Gly-Pro-Arg-NH₂) (Houbart et al., 1995).

Die Hydrolyse der nichtaktivierten Thiopeptidbindung im Derivat Ala-Pro-ψ[CS-NH]-Phe-NH-Np konnte in unseren Experimenten durch Thioxoacyltransfer zweifelsfrei nachgewiesen werden. In Gegenwart des Dipeptids Ala-Tyr wurde das Thioxotetrapeptid Ala-Pro-ψ[CS-NH]-Ala-Tyr gebildet. Da das Syntheseprodukt selbst wiederum als Substrat dient, tritt dieses

nur transient auf. Die analytische HPLC-Trennung eines zu 80% umgesetzten Reaktionsansatzes enthielt einen Peak, der ein Thioxozeptidspektrum, jedoch keine Absorption im Bereich des 4-Nitroanilid-Chromophors zeigte, und dessen Retentionsverhalten verschieden zu dem der Ausgangsverbindung war. Durch massespektrometrische Analyse konnte dieser Peak als Ala-Pro- ψ [CS-NH]-Ala-Tyr identifiziert und, unter Anwendung von Fragmentierungstechniken (Pfeifer et al., 1997), Pro als thioxylierte Aminosäure bestimmt werden.

Dies zeigt, daß auch bei einem alternativen Mechanismus, der möglicherweise ohne Säure-Base Katalyse durch den His-Rest einer katalytischen Triade auskommt, der Schwefel der zu hydrolysierenden Thioxozeptidbindung kovalent am Carbonylkohlenstoff gebunden bleibt. Eine im Zuge der Enzym-Substrat Wechselwirkung stattfindende „Entschwefelung“ des Thioxosubstrates, gefolgt von einer „gewöhnlichen“ Hydrolyse, kann somit auch für den alternativen Katalysemechanismus ausgeschlossen werden.

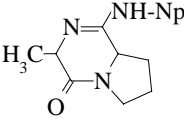
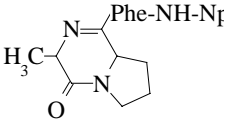
3.4.4. Untersuchungen zur Inhibierung der DP IV mit zyklischen 2-Keto-5-amino-4,5-Dehydropiperazin-Derivaten

Die aus den Thioxozeptidderivaten Ala-Pro- ψ [CS-NH]-Np und Ala-Pro- ψ [CS-NH]-Phe-NH-Np im Zuge einer nichtenzymatischen Umwandlung im wäßrigen Puffer gewonnenen 2-Keto-5-amino-4,5-Dehydropiperazin-Derivate (vgl.Tab. 13) sind weder Substrate für die POP aus humaner Plazenta noch für die DP IV. Beide Verbindungen wurden auf ihre inhibitorischen Eigenschaften untersucht. Von Interesse war, ob die in der zyklischen Struktur konservierte Alanyl-Prolyl-Peptidbindung Affinität zu den Proteasen aufweist.

Die gemessenen IC_{50} -Werte ergaben für die POP eine nur schwache, reversibel verlaufende Inhibierung. Die Affinitäten sind der des verwendeten Substrates Suc-Ala-Pro-NH-Np (K_m : 0.55 mM) ähnlich, im Vergleich zu den von biologisch relevanten Inhibitoren erreichten K_i -Werten (vgl. Kap.3.3.2.) sind es schlechte Inhibitoren.

Höhere Affinitäten zeigen die 2-Keto-5-amino-4,5-Dehydropiperazin-Derivate für die DP IV. Die IC_{50} -Werte sind im Vergleich zum K_m -Wert von Ala-Pro-NH-Np (K_m : 11.4 μ M) zwar 6-fach schlechter, jedoch ist interessant, daß überhaupt eine Inhibierung gefunden wird, da ein freier und protonierbarer N-Terminus essentiell für eine Inhibierung der DP IV ist (Barth et al., 1984). In den zyklischen Derivaten muß demzufolge die Amidinogruppe die Funktion des Protonenakzeptors übernehmen. Im Vergleich zu den bekannten hochaffinen Inhibitoren in Form von Dipeptid-Derivaten (vgl.Kap.3.4.2.) sind die hier gefundenen IC_{50} -Werte zwar um ein bis zwei Größenordnungen schlechter, dennoch könnten die 2-Keto-5-amino-4,5-

Dehydropiperazin-Derivate eine interessante neue Leitstruktur für die Entwicklung von DP IV Inhibitoren darstellen. Letzteres vor allem deshalb, weil sie einerseits, verglichen mit den IC_{50} -Werten für die POP, eine gewisse Selektivität zeigen, und andererseits, wegen ihrer zyklischen Struktur, eine hohe Proteolyseresistenz besitzen sollten.

Inhibitor-Derivat	IC_{50} : [mM]	
	POP	DP IV
	0.33 ± 0.04	0.062 ± 0.011
	0.59 ± 0.12	0.074 ± 0.004

Tab.13: Hemmung der DP IV und der POP aus humaner Plazenta durch die nichtenzymatisch gebildeten 2-Keto-5-amino-4,5-Dehydropiperazin-Derivate, zyklischen Umwandlungsprodukten der Peptide Ala-Pro- ψ [CS-NH]-Np und Ala-Pro- ψ [CS-NH]-Phe-NH-Np. Die Messungen mit der DP IV erfolgten in 35 mM HEPES, pH 7.8 bei 25°C, die Messungen mit POP erfolgten in 100 mM TRIS, 1 mM DTT, pH 7.5 bei 30°C. Die Berechnung der IC_{50} -Werte erfolgte mittels nichtlinearer Regression gemäß der Gleichung $k_i = k_e / (1 + I_0 / IC_{50})$, wobei k_e und k_i die I.Ordnungskonstanten der enzymatischen Hydrolyse in Ab- bzw. Anwesenheit von Inhibitor sind. Die Messungen erfolgten unter der Bedingung $S_0 \ll K_m$, als Substrate wurden 50 μ M Suc-Ala-Pro-NH-Np für die POP bzw. 1 μ M Ala-Pro-NH-Np für die DP IV eingesetzt.

3.4.5. Vergleichende Untersuchungen an der DP II

Die ubiquitär verbreitete, in den Lysosomen der Zelle lokalisierte DP II ist ebenfalls eine Serinprotease, ihr pH-Optimum liegt jedoch im Bereich um pH 5.5 (Übersichten: Yaron & Naider, 1993; Cunningham & O`Conner, 1997). Die DP II besitzt eine der DP IV vergleichbare Spezifität, auch sie hydrolysiert Dipeptide vom N-Terminus von Peptiden. In P_1 -Position wird, in Abweichung zur DP IV, neben Pro mit gleicher Effizienz Ala akzeptiert. Außerdem kann die aus Rattenhirn isolierte DP II auch Pro-Pro Peptidbindungen (Pro in P_1 und P_1') hydrolysieren (Mentlein & Struckhoff, 1989).

Das Verhalten der aus Schweineiere isolierten DP II gegenüber den zwei Derivaten mit einer thioxylierten zu hydrolysierenden Bindung wurde untersucht. Die Verbindung mit aktivierter Abgangsgruppe, Ala-Pro- ψ [CS-NH]-Np, zeigt selbst in 100 mM Citrat, pH 4.5 noch eine so starke Zyklisierung (HWZ: 21 min), daß eine Langzeitinkubation mit der DP II nicht möglich war. Bei Verfolgung der Reaktion über 20 min wurde keine mit der nichtenzymatischen

Umwandlung konkurrierende, DP II katalysierte Hydrolyse beobachtet, was zumindest eine hohe Reaktivität der DP II bezüglich der Thioxoarylamide ausschließt. Da diese Messungen am unteren pH-Limit der DP II Aktivität erfolgten, kann jedoch keine absolut sichere Aussage bezüglich der qualitativen Hydrolysierbarkeit dieser Derivate gemacht werden. Thioxoacyltransfer-Experimente besitzen wegen des bei pH 4.5 geringen Anteils N-terminal deprotonierter Nucleophil-Moleküle auch keine eindeutige Aussagekraft.

Das Derivat Ala-Pro- ψ [CS-NH]-Phe-NH-Np ist eindeutig kein Substrat der DP II. Diese Verbindung ist bei pH 4.5 stabil und kann für eine Langzeitinkubation verwendet werden. Nach 48h Inkubation wurden keine Hinweise auf eine Hydrolyse der Thioxo-peptidbindung gefunden, was bedeutet, daß diese Verbindung, wenn überhaupt, ein mindestens 10 000-fach schlechteres Substrat als das entsprechende Oxo-Derivat ist.

Mit dem Derivat Ala-Pro- ψ [CS-NH]-Phe-NH-Np wurde erstmals eine Verbindung gefunden, welche eine Unterscheidung zwischen den zwei Dipeptidylpeptidase-Aktivitäten an Hand der Substrateigenschaften ermöglicht. Somit existiert, neben der konventionellen Identifizierung über ein pH-Profil, eine zusätzliche Möglichkeit, entsprechende Enzymaktivitäten einer der zwei Enzymformen zuzuordnen.

3.5. Papain

3.5.1. Vorkommen, Eigenschaften und biologische Funktion

Papain ist eine Cysteinprotease, die aus den Früchten des Papaya-Baumes *Carica papaya* gewonnen wird. Das aus 212 Aminosäureresten einer einzelsträngigen, nichtmodifizierten Peptidkette bestehende Enzym (M_R : 23 350; pI: 8.75) enthält 4 Disulfidbrücken. Neben der Proteinaseaktivität besitzt Papain auch eine Esterase-, Thiolesterase- und Amidaseaktivität. Das Enzymaktivität erstreckt sich über einen weiten pH-Bereich von pH 5 bis pH 9, wobei die Optima in Abhängigkeit vom Substrat und der katalysierten Reaktion verschieden sind. Effiziente Acyltransferreaktionen in Gegenwart geeigneter Akzeptoren wurden für Papain beschrieben, wobei sowohl Transamidierungen als auch Umesterungen katalysiert werden (Übersicht: Glazer & Smith, 1971). Das aus dem Papaya-Latex isolierte teilaktive Enzym (Kimmel & Smith, 1958) wurde erstmals von (Drenth et al., 1968) kristallisiert und in seiner Struktur aufgeklärt (Übersicht: Drenth et al., 1971). Die Protease besitzt eine vergleichsweise hohe Stabilität gegen organische Lösungsmittel, denaturierende Agenzien und erhöhte Temperaturen im neutralen pH-Bereich (Übersicht: Glazer & Smith, 1971).

In Analogie zu den Serinproteasen besitzt auch die Cysteinprotease Papain eine katalytische Triade, bestehend aus dem Cys25, dessen katalytisch aktive, mit Thiolreagenzien hemmbare Thiolat-Seitenkette ein Ionenpaar mit dem Imidazolring des His159 bildet. Diese Wechselwirkung wird durch Asn175 stabilisiert. Weitere Seitenketten sind an der Stabilisierung der katalytischen Triade beteiligt. Die konservierten Reste Trp177 und Trp181 stabilisieren über Aromat-Aromat Wechselwirkungen das His159 und bilden pseudo-HB Akzeptoren für die Seitenketten-Amidprotonen des Asn175 (Brömme et al., 1996). Weitere HB zwischen einzelnen Domänen tragen zur Stabilisierung des Thiolat-Imidazolium-Ionenpaares bei, so z.B. eine HB zwischen Ser179 und Gln19 (Menard et al., 1991).

Durch die Substitution Gln19Glu im aktiven Zentrum des Papains kann eine effiziente Nitrilhydratase Aktivität in das Enzym eingeführt werden. Durch Lieferung eines Protons durch die protonierte Form des Glu wird das intermediäre Thiolimidat sauer hydrolysiert (Dufour et al., 1995a). Kinetische Untersuchungen an Papain und spezifisch im aktiven Zentrum modifiziertem Papain zeigten, daß sich Nitrile in ihrer Wechselwirkung mit der Oxyanionenhöhle wie Substrate verhalten, während Aldehyde das tetraedrische Hemithioacetal stabilisieren (Dufour et al., 1995b).

Im Falle der Cysteinproteasen Papain, Ficin und Caricain konnte gezeigt werden, das die Deprotonierung eines nicht an der katalytischen Triade beteiligten Aminosäurerestes, des Glu50, wichtig für die korrekte sterische Ausrichtung, und somit die Einschaltung der katalytischen Aktivität des Thiolat-Imidazolium Ionenpaares von Cys25-His159 ist (Pinitglang et al., 1997). Berechnungen von (Rullmann et al., 1989) zum aktiven Zentrum des

Papains zeigen, daß dieses Ionenpaar durch die α -Helix des Proteins, in die Cys25 eingebunden ist, stabilisiert wird. Solche Stabilisierungseffekte werden auf die Dipolwirkung von α -Helices zurückgeführt (Hol et al., 1978). Die α -Helix Dipole werden dabei nicht als einzelner Makrodipol, sondern als Einzelladungen von Amid- und Carbonylgruppen innerhalb der ersten und letzten turns der Helix angesehen (Nicholson et al., 1991).

3.5.2. Substrate und Inhibitoren

Eine Substratbindungstasche, vergleichbar der S_1 -Sekundärbindungsstellen-Region des α -Chymotrypsins oder Subtilisins, besitzt Papain in P_2 -Position. Der Bereich essentieller Enzym-Substrat Wechselwirkungen reicht von P_2 bis P_1' (Übersicht: Turk et al., 1998).

Die Bindungsenergien von HB und Seitenketten-Aminosäureresten für den Bereich von P_2 bis P_2' wurden von (Berti et al., 1991) untersucht. Eine starke gegenseitige Abhängigkeit der P_2 -NH-, P_2 -Seitenketten- und P_1 -NH-Wechselwirkungen konnte belegt werden. Diese Kooperativität basiert weitgehend auf dem Entropiebedarf bei der Bildung der Übergangszustandes. Vergleichbare Ergebnisse erbrachten Untersuchungen zu HB zwischen Papain und Substrat sowie hydrophoben S_2 - P_2 Wechselwirkungen (Patel et al., 1992).

Die ausgeprägte P_2 -Spezifität des Papains widerspiegelt sich auch in dessen Wechselwirkung mit spezifischen Aziridin-2,3-Dicarbonsäure Inhibitoren (Schirmeister, 1996). Die Stereoselektivität der P_2 -Position wurde mit verschiedenen Derivaten untersucht. Für Ac-L-Phe-NH-Np und Ac-D-Phe-NH-Np sind die k_{cat}/K_m Werte für das L-Enantiomer 330-fach höher als für das D-Enantiomer (Kowlessur et al., 1989, 1990). Inhibitorstudien mit Ac-Phe-aminoethyl-2'-pyridyl-disulfid zeigten, daß das L-Enantiomere 40-fach affiner bindet als die D-Form (Templeton et al., 1990). Bei ^{13}C -NMR Untersuchung der Enantiomere von Ac-Phe-Glycinal wurde eine nur um den Faktor 5 geringere Hemmung durch die D-Form gefunden (Mackenzie et al., 1986).

Eine Belegung der P_3 und P_4 Bindungsstellen mit Gly erbrachte gegenüber dem Substrat $CH_3-O-CO-Phe-Gly-CS-O-CH_3$ kaum zusätzliche Beiträge zur Katalyse, was zumindest essentielle HB zwischen diesen Sekundärbindungsstellen und dem Peptidrückgrat des Enzyms ausschließt (Angus et al., 1986). Untersuchungen von (Doran et al., 1996) zu spezifischen HB und hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Papain und spezifischen chromophoren Substraten zeigten, daß im Falle des Papains der pK_a der Deacylierung von dem in P_2 gebundenen Aminosäurerest abhängig ist. Hydrophobe Interaktionen wurden beim Papain auch für die S_3 - P_3 Wechselwirkung an Hand von Kristallstrukturanalysen kovalenter Enzym-Inhibitor Komplexe beschrieben (Matsumoto et al., 1994). Eine Wechselwirkung großer hydrophober P_4 -Aminosäurereste mit einer entsprechenden S_4 -Bindungstasche im Papain wird von (Ohno et al., 1977) beschrieben. Die Röntgenkristallstrukturanalysen von Papain, komplexiert mit dem Proteininhibitor Stefin B (Stubbs et al., 1990) zeigt jedoch, daß die über

die P₂-Position hinausgehenden Enzym-Inhibitor Wechselwirkungen nicht an spezifische S₃- bzw. S₄-Sekundärbindungsstellen gebunden sind, sondern mit völlig anderen Segmenten des Proteins stattfinden können (Turk et al., 1998).

Auf Grundlage von Acyltransferreaktionen wurde die P₁` bis P₃`- Spezifität des Papains bewertet (Schuster et al., 1991, 1992). Danach können in P₁`-Position nur Aminosäurereste mit maximal 3 Methylengruppen gebunden werden, in den Positionen P₂` und P₃` werden hydrophobe Aminosäurereste bevorzugt. Eine Verringerung der Acylierungsgeschwindigkeit des Papains in Gegenwart hydrophober Aminosäurereste in P₂`-Position wird von (Garcia-Echeverria & Rich, 1992) beschrieben. Eine im Vergleich zu einigen Cathepsinen weniger ausgeprägte S₁`-Spezifität wird für Papain auf der Basis kinetischer Fluoreszenzmessungen gefunden (Menard et al., 1993).

Eine neue Gruppe von temporär wirkenden Cystein- und Serinproteaseinhibitoren stellen Azapeptid-Derivate und Peptid-Carbonatester dar. Ihre Funktion basiert auf der Bildung von Acylenzymen, die durch den Einbau des jeweiligen Elektronendonors unmittelbar vor der P₁-Carbonylgruppe nur sehr langsam hydrolysieren (Baggio et al., 1996; Xing & Hanzlik, 1998). Im Vergleich zu Inhibitoren mit niedrigem Molekulargewicht kommen bei Proteininhibitoren wie z.B. Cystatinen und Stefinen noch Wechselwirkungen zwischen Sekundär- und Tertiärstrukturelementen hinzu (Machleidt et al., 1991).

Ausgangspunkt der Thioxylierungsexperimente für Papainsubstrate war die Möglichkeit, mit Thioxoestern Dithioacylenzyme zu generieren, die ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 315 nm besitzen (Lowe & Williams, 1965).

Spektroskopische Untersuchungen mit zahlreichen Cysteinproteasen zeigten, daß Thioxoester mit P₁-Gly konformativ einheitliche, sogenannte Konformer B-typische, Dithioacylenzyme bilden (vgl. Abb.24), die durch einen räumlich engen Kontakt zwischen dem Amidstickstoff des Glycins und dem Schwefel des als Nucleophil in der Katalyse wirksamen Cys25 gekennzeichnet sind (Carey et al., 1983, 1984; Brocklehurst et al., 1984; Angus et al., 1986). Die Stärke dieser N···S Wechselwirkung kann durch die Basizität des Substituenten am Amidstickstoff des Glycins beeinflußt werden (Carey et al., 1984). Untersuchungen mit *para*-substituierten Benzoylglycinethyldithioestern zeigten, daß mit steigenden Elektronendonoreigenschaften des Substituenten die Basizität des Glycinstickstoffes anstieg, was wiederum eine Verstärkung der N···S Wechselwirkungen und parallel dazu, eine Erhöhung des Konformer B Anteils zur Folge hatte. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß k₃, die Geschwindigkeitskonstante der Deacylierung des Dithioacylenzyms, von der Intensität dieser N···S Wechselwirkung beeinflußt wird. In P₁-Gly Substraten, bei denen der Katalyseprozeß auf Grund einer Substitution des P₂-Phe mit weniger geeigneten Resten (Gly, Phenylglycin) stark beeinträchtigt ist, wurden in den Resonanz-Raman Spektren auch

Hinweise gefunden, daß neben dem B-Konformer noch andere Konformationen vorliegen können (Tonge et al., 1992).

In Modellverbindungen mit P₁-Ala existieren Konformationen, bei denen sich die Torsionswinkel um die -C(=S)-S- Gruppe deutlich von denen in Modellverbindungen mit P₁-Gly unterscheiden. Der N-Acyl-Alanin-Rest solcher Substrate bindet in einer A- bzw. C-5-ähnlichen Konformation im aktiven Zentrum (vgl. Abb.24). Untersuchungen zur Konformation von thioxosubstituierten Piperazindionen (Szokan et al., 1995) und Thiopeptiden in verschiedenen Lösungsmitteln (Shaw et al., 1995) zeigten, daß die erhöhte Acidität der Thiopeptidbindung eine verstärkte Tendenz zur Bildung solcher C-5 Ringstrukturen bewirkt.

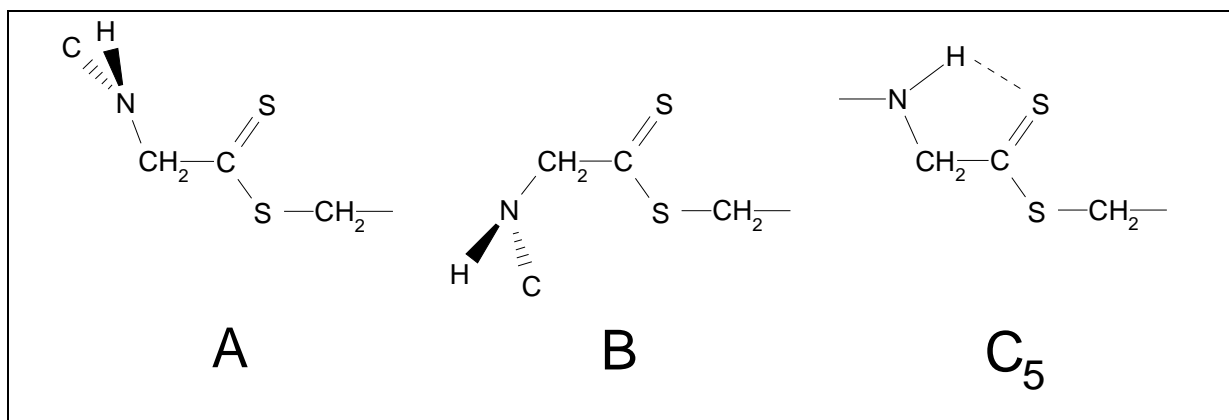


Abb.24: Schematische Darstellung der A, B und C-5 Konformationen von Dithioacylenzymen nach (Lee et al., 1988).

Daten aus kinetischen Messungen zeigten, daß die geschwindigkeitsbestimmende Deacylierungskonstante k_3 für Dithioacylenzyme ca. 60fach geringer ist als für entsprechende Thioacylenzyme, und daß auch bei Thioxoestern die Deacylierung über einen Protonentransferschritt verläuft (Storer & Carey, 1985). Kinetische Vergleiche zwischen P₁-Glycin- und P₁-Alaninthioxoestern zeigten die größten Differenzen in den Acylierungskonstanten k_2 , kaum jedoch Unterschiede in den Deacylierungskonstanten k_3 . Dies steht in Widerspruch zu den in Resonanz-Raman spektroskopischen Untersuchungen gefundenen Differenzen zwischen den entsprechenden Acylenzymen, und wurde dahingehend interpretiert, daß Oxyanionenwechselwirkungen und allgemeine Basenkatalyse möglicherweise gar nicht an der Deacylierung von Dithioacylenzymen beteiligt sind (Storer et al., 1988).

Diese Ergebnisse mit P₁-Ala Derivaten haben gezeigt, daß der Deacylierungsprozeß an verschiedenartig gebundenen Strukturen ablaufen kann, und nicht an strikte stereochemische Zwänge gebunden ist, wie aus den Ergebnissen mit P₁-Gly zunächst geschlußfolgert wurde (Angus et al., 1988; Lee et al., 1988).

3.5.3. Ergebnisse der Untersuchungen

Die Struktur der verwendeten Substrate und die Position der zu hydrolysierenden Bindung sind in Abb.25 dargestellt. Zur Interpretation der Ergebnisse wurden die durch Röntgenkristallstrukturanalyse in Papain - Peptidyl-Chlormethylketon-Inhibitorkomplexen gefundenen HB und Seitenkettenwechselwirkungen herangezogen (Drenth et al., 1976).

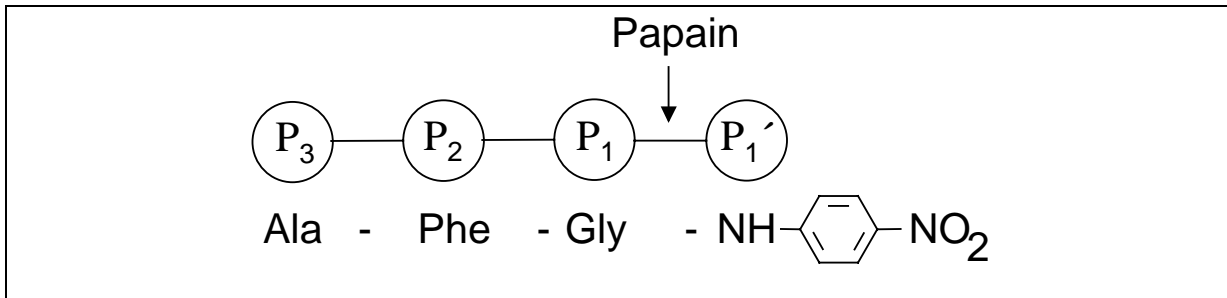


Abb.25: Schematische Darstellung der Substratspezifität des Papains. Die zu hydrolysierende Bindung ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

3.5.3.1. Hydrolyse von P_3 und P_2 -thioxylierten Tripeptid-4-Nitroaniliden

Die Thioxylierung der P_3 -Position hat nahezu keinen Einfluß auf die Hydrolyse von Substraten der Sequenz Ala-Phe-Gly-NH-Np, lediglich k_{cat} ist leicht verringert, während der K_{m} -Wert praktisch unverändert bleibt (vgl.Tab.14). Bei der Analyse von Röntgenkristallstrukturen des Papains, komplexiert mit Chlormethylketon-Inhibitoren wie z.B. Ac-Ala-Ala-Phe-Ala-CMK, wurden hydrophobe Wechselwirkungen der P_3 -Seitenkette mit der Seitenkette von Tyr67 gefunden (Drenth et al., 1976). Die P_3 -Carbonylgruppe zeigt hingegen zum Lösungsmittel, die nicht beobachtbaren Auswirkungen von deren Thioxosubstitution sind somit erklärbar (vgl.Abb.26). Die leichte Verringerung von k_{cat} kann möglicherweise über eine Beeinflussung der benachbarten P_2 -NH HB zum Gly66-CO, welche für die Katalyse bedeutsam ist, erfolgen.

Drastische Auswirkungen auf die kinetischen Konstanten hat hingegen die Thioxosubstitution der P_2 -Carbonylgruppe. Im entsprechenden Derivat sind die k_{cat} -Werte 2 900-fach reduziert, K_{m} ist im Vergleich zum Oxo-Derivat ungefähr doppelt so groß, was zu einer 5 700-fach niedrigeren katalytischen Effizienz führt. Ein ähnlicher Abfall mit einer 2 000-fachen Verringerung der katalytischen Effizienz wird für die Esteraseaktivität des Papains am Derivat Z-Phe-ψ[CS-NH]-Gly-OEt beobachtet (Asboth et al., 1988). Auch andere Cysteinproteasen wie Chymopapain, Papaya Peptidase A und das in *Mammalia* vorkommende Cathepsin B reagierten auf eine P_2 -Thioxosubstitution mit vergleichbar starker Verringerung der $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ -Werte (Asboth et al., 1988).

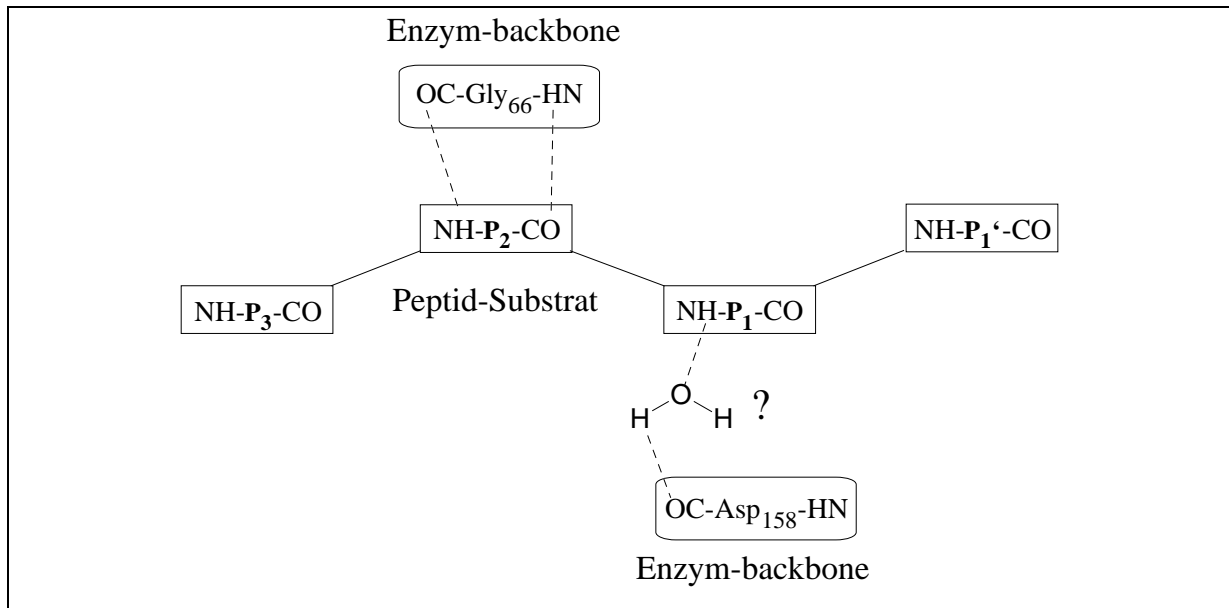


Abb.26: Schematische Darstellung der im Rahmen der Sekundärbindungsstellen-Wechselwirkungen zwischen Enzym und Substrat (bzw. Inhibitor) ausgebildeten HB (gepunktete Linien), abgeleitet aus den Ergebnissen der Röntgenkristallstrukturanalyse verschiedener Papain - Peptidyl-Chlormethylketon-Inhibitor-Komplexe nach (Drenth et al., 1976). Die mit „?“ gekennzeichnete Wechselwirkung, die über ein Wassermolekül vermittelte HB zwischen P₁-NH und Asp158-CO ermöglichen sollen, gelten nicht als gesichert.

Die P₂-Carbonylgruppe geht im Komplex von Papain mit Ac-Ala-Ala-Phe-Ala-CMK (CMK: Chlormethylketon) eine HB zum Gly66-NH ein (vgl. Abb.26), eine weitere direkte HB vom P₁-NH zum Asp158-CO ist wegen des räumlichen Abstandes zwischen beiden Resten nicht möglich, jedoch wird zwischen beiden ein Wassermolekül gefunden, welches möglicherweise als „Brücke“ fungieren könnte (Drenth et al., 1976). Wenngleich die P₂-Thioxosubstitution einen Verlust an HB-Bindungsenergie bedeutet, kann dies allein nicht der Grund für die verminderte Hydrolyse sein.

Die zwei Aminosäurereste des katalytisch aktiven Thiolat-Imidazolium Ionenpaares des Papains sind auf einander gegenüberliegenden Seiten der Substratbindungsfurche der Enzymoberfläche lokalisiert. Die P₂-P₁-Peptidbindung überspannt diese Furche, indem sie HB mit Aminosäureresten auf beiden Seiten dieser Furche bildet (Baker & Drenth, 1987). Bedingt durch den größeren van der Waals Radius des Schwefelatoms und den Verlust einer der zwei das Substrat in der Bindungsfurche fixierenden HB wird nach (Asboth et al., 1988) einerseits das gebundene Substrat nicht mehr korrekt ausgerichtet, und andererseits die optimale Positionierung der zwei katalytisch aktiven Aminosäurereste (Cys25 auf einer Seite der Substratbindungsfurche, His159 auf der anderen) zueinander aufgehoben. Auch eine dritte, ebenfalls vom P₂-Rest ausgehende HB, die vom P₂-NH zum Gly66-CO (Drenth et al., 1976), könnte infolge der gestörten Ausrichtung des gebundenen Substratmoleküls im aktiven Zentrum beeinträchtigt sein.

Da in den Untersuchungen von (Asboth et al., 1988) keine kinetischen Einzelkonstanten bestimmt wurden, weisen die hier durchgeführten Untersuchungen erstmals die stark verringerten k_{cat} -Werte als Ursache der enorm verminderten Substrateigenschaften aus. Die kaum abgeschwächte Bildung des Michaelis-Komplexes deutet auf eine weitgehend ungestörte Wechselwirkung der Seitenkette des P₂-Aminosäurerestes (Phe) mit der entsprechenden S₂-Substratbindungstasche hin, welche den Hauptbeitrag der Bindungsenergie liefert.

Peptid-Derivat	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ s ⁻¹)
Ala-Phe-Gly-NH-Np	0.40 ± 0.06	0.41 ± 0.05	1 020
Ala-ψ[CS-NH]-Phe-Gly-NH-Np	0.36 ± 0.04	0.25 ± 0.01	700
Ala-Phe-ψ[CS-NH]-Gly-NH-Np	0.77 ± 0.18	(1.4 ± 0.2) * 10 ⁻⁴	0.18
Ala-Phe-Gly-ψ[CS-NH]-Np	0.16 ± 0.01	0.53 ± 0.02	3 220

Tab.14: Kinetische Konstanten der Hydrolyse von Oxo- und Thioxo-peptid-Derivaten durch die Cysteinprotease Papain. Alle Messungen erfolgten in 100 mM Phosphat, pH 6.3 bei 25°C.

3.5.3.2. Derivate mit P₁-thioxylierter Peptidbindung

Die Hydrolyse von Thioxoestern (Lowe & Williams, 1965; Asboth & Polgar 1983) und 4-Nitroanilid-Substraten, deren zu hydrolysierende Bindung thioxyliert ist (Foje & Hanzlick, 1994), erreicht eine höhere katalytische Effizienz als die der entsprechenden Oxo-Verbindungen. Dieser Befund wird durch die hier erhaltenen Ergebnisse bestätigt (vgl.Tab.14). Der Grund für die effizientere Hydrolyse der Thioxoderivate liegt vorwiegend, wie auch bei (Foje & Hanzlick, 1994), in der um den Faktor 2.5 höheren Affinität des Enzyms zum Substrat. Bei einem ebenfalls leicht verbesserten k_{cat} -Wert resultiert letztlich eine dreifach höhere katalytische Effizienz. Der Thioxoinhibitor Ac-Phe-Gly-ψ[CS-NH]-H erreichte im Vergleich sogar eine 50-fach höhere Affinität als die entsprechende Oxo-Form (Thompson et al., 1986). Als mögliche Ursache dieser Effekte wurden eine verringerte Desolvationsenergie für die weniger polare Thioxo-peptidbindung und eine abgeschwächte Resonanz der C-N Bindung in Gegenwart einer elektronenziehenden Abgangsgruppe diskutiert. Bei Estern wäre in analoger Weise der Stickstoff durch den elektronegativeren Sauerstoff ersetzt (Foje & Hanzlick, 1994).

Während im Zuge der Papain-katalysierten Hydrolyse des Substrates Ac-Phe-Gly-ψ[CS-NH]-Np die Peptid-Thiolsäure Ac-Phe-Gly-CO-SH als Intermediat nachgewiesen werden konnte (Foje & Hanzlick, 1994), gelang dies in unseren Untersuchungen am Substrat Ala-Phe-Gly-ψ[CS-NH]-Np nicht. Untersuchungen an Aminosäure-Dithioestern ergaben, daß diese nur

dann stabil sind, wenn sie N-terminal eine Schutzgruppe tragen (Hartke, 1991). Die Papain-katalysierte Hydrolyse der Thioxyarylamidbindung unter Erhalt der Thioxy-carbonylgruppe wurde wiederum indirekt durch Thioxyacyltransfer nachgewiesen.

Eine Vielzahl von Möglichkeiten wurde diskutiert, um die Differenzen zwischen Serin- und Cysteinproteasen bei der Hydrolyse von Thioxy- und Oxyestern zu erklären. Aus den Röntgenkristallstrukturen von Papain, komplexiert mit Peptidyl-Chlormethylketon-Inhibitoren wurde die Existenz einer Oxyanionenhöhle abgeleitet, wobei die Peptidrückgrat-Amidgruppe des katalytisch aktiven Cys und die Seitenkettenamidgruppe von Gln19 als HB-Donatoren auftreten (Drenth et al., 1976).

Ursprünglich wurde angenommen, daß der Thioxy-carbonylrest auf Grund der Größe des Schwefelatoms und der verringerten Fähigkeit HB einzugehen, nicht in der Oxyanionenhöhle fixiert werden kann. Die den Oxyestern vergleichbar effiziente Hydrolyse von Thioxyestern durch die Cysteinproteasen Papain und Chymopapain wurde dahingehend interpretiert, daß Oxyanionenwechselwirkungen bei diesen Proteasen keine Rolle spielen. Für diese These spricht auch die Tatsache, daß im Chymopapain der zweite HB-Donor-Aminosäurerest durch eine Gln19Val Substitution als Element der Oxyanionenhöhle wegfällt, ohne daß das Verhältnis der Hydrolyseraten von Oxy- und Thioxyestern verschoben wird (Asboth & Polgar, 1983).

Eine Substitution des als HB-Donor in Frage kommenden Gln19 des Papains durch Ala beeinträchtigt die Bindung des Aldehyd-Inhibitors Ac-Phe-Gly-CHO nicht (Menard et al., 1991), was die voranstehende Interpretation bestätigen könnte. Aus NMR-Untersuchungen wurde jedoch geschlußfolgert, daß die Hydroxylgruppe des Thiohemiacetals zu weit von der Seitenkette des Gln19 entfernt ist, um HB einzugehen (Mackenzie et al., 1986). Die Analyse der Röntgenkristallstruktur des Papain - Leupeptin Komplexes zeigte, daß der Inhibitor kovalent an Cys25 gebunden ist, und der Carbonylsauerstoff die Oxyanionenhöhle besetzt, wobei Wasserstoffbrückenbindungen zu Gln19 und Cys25 gebildet werden (Schroder et al.; 1993).

Die Gln19Ala bzw. Gln19Ser Mutation im Papain führte zu einer 60- bzw. 600fach schlechteren Hydrolyse des Substrates Z-Phe-Arg-MCA, verglichen mit der katalytischen Effizienz des Wildtyp-Papains. Daraus konnten die Beiträge der Oxyanionenhöhle des Papains zur Stabilisierung des Übergangszustandes von 2.4 kcal/mol für die Gln19Ala Mutante und von 3.8 kcal/mol für die Gln19Ser Mutante berechnet werden (Menard et al., 1991). Verglichen mit analogen Mutationen des im Subtilisin als HB-Donor dienenden Asn155 sind die für Papain gefundenen Beiträge zwar um 0.5 (Gln19Ser) bzw. 1.8 (Gln19Ala) kcal/mol geringer, belegen aber trotzdem die Wichtigkeit von Oxyanionen-Wechselwirkungen bei der Katalyse der Cysteinproteasen (Menard & Storer, 1992).

Eine Gln19Glu Substitution führte in Abhängigkeit vom Protonierungszustand des Glu zu einem mehr oder weniger deutlichen Abfall der katalytischen Effizienz. Jedoch sind die berechneten energetischen Beiträge zur Stabilisierung des Übergangszustandes durch die Oxyanionenhöhle auch hier geringer als in vergleichbaren Messungen am Subtilisin (Menard et al.; 1995).

Auf eine wichtige Bedeutung der Oxyanionenhöhle deuten Ergebnisse kinetischer Untersuchungen an Thioxoamiden und Thioxoarylamiden hin (Foje & Hanzlik, 1994). Trotz der hohen Reaktivität gegenüber Thioxoestern und Thioxoarylamiden ist auch Papain nicht in der Lage, die nichtaktivierte Thioxoamidbindung zu hydrolysieren. Die in Abwesenheit elektronenziehender Abgangsgruppen verstärkte Resonanz der C-N Bindung erfordert eine Fixierung des Oxyanions in der Oxyanionenhöhle, um die für den nucleophilen Angriff des Thiolat-Anions minimal notwendige Elektrophilie des Carbonylkohlenstoffes aufrechtzuerhalten. Da diese Fixierung wegen der verminderten HB-Akzeptoreigenschaften des Schwefels in Thioxoamidbindungen nicht (oder nur sehr viel weniger) möglich ist, werden derartige Bindungen nicht hydrolysiert.

Zur Erklärung des unterschiedlichen Reaktionsverhaltens von Serin- und Cysteinproteasen bezüglich Thioxoestern wurden weitere Modelle aufgestellt. Obwohl Oxo- und Thioxoester vergleichbare Reaktivitäten in der basischen Hydrolyse zeigen (Campbell & Lapinskas, 1976), könnte es Reaktivitätsunterschiede zwischen dem Thiolat-Imidazolium Ionenpaar der Cysteinproteasen und dem im Grundzustand als Hydroxylgruppe vorliegenden Nucleophil der Serinproteasen bezüglich der Thioxocarbonylgruppe geben (Menard & Storer, 1992). Parallele, sich gegenseitig aufhebende Veränderungen der Acylierungskonstante k_2 und der Dissoziationskonstante K_S könnten die scheinbar unbeeinflussten Hydrolyseraten der Cysteinprotease-katalysierten Thioxoesterhydrolyse erklären (Asboth & Polgar, 1983). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, daß Cysteinproteasen in Wechselwirkung mit dem Substrat flexibel genug sind, die Thioxocarbonylgruppe im aktiven Zentrum korrekt einzupassen (Storer & Carey, 1985). Diese gewisse Flexibilität, sowohl des Substrates als auch des Proteinrückgrates, sollte deshalb vorhanden sein, weil auch beim gewöhnlichen Übergang der Carbonyldoppelbindung zur Oxyanionenform mit Einfachbindung eine Streckung der C-O Bindung erfolgt, die das Enzym tolerieren können muß.

3.6. Versuche zur proteasekatalysierten Thioxozeptidsynthese

3.6.1. Kinetisch kontrollierte enzymatische Thioxozeptidsynthese

In Röntgenkristallstrukturanalysen von Komplexen aus α -Chymotrypsin und den Aminosäurederivaten Formyl-Trp und Formyl-Phe (Steitz et al., 1969) wurde gefunden, daß diese wie Substrate mit dem aktiven Zentrum des Enzyms wechselwirken, ein Acylenzym bilden und Wassermoleküle austauschen können, weshalb sie auch als „virtuelle Substrate“ bezeichnet werden (Bender & Kemp, 1957). Gleiches wurde unter Verwendung von Z-Aminosäuren für Papain nachgewiesen (Grisaro & Sharon, 1964).

Nach gleichem Mechanismus ist es möglich, durch im Puffer gelöste Aminosäure- und Peptidderivate, die den potentiellen Hydrolyseprodukten entsprechen, in Umkehrung der Peptidbindungshydrolyse durch Proteasen diese eine Peptidbindungsknüpfung katalysieren zu lassen (Übersichten: Jakubke, 1987; Kuhl & Jakubke, 1990; Schellenberger & Jakubke, 1991; Bongers & Heimer, 1994; Hänslers & Jakubke, 1996a, b; Jakubke et al., 1996). Unter gewöhnlichen Bedingungen liegt das Gleichgewicht dieser thermodynamisch kontrollierten Reaktion jedoch weit auf Seiten der Hydrolyseprodukte. Durch Konzentrationserhöhung der als Nucleophil agierenden Aminokomponente kann diese effizienter mit Wasser um das Acylenzym kompetieren und das Gleichgewicht somit auf die Seite des Syntheseproduktes verschieben. Eine andere Möglichkeit besteht darin, den Wasseranteil im Reaktionsmedium zu verringern, entweder durch schockartiges Ausfrieren (Jakubke, 1987; Schellenberger & Jakubke, 1991; Gerisch et al., 1994; Hänslers et al., 1995; Hänslers & Jakubke, 1996a, b, 1998; Jakubke et al., 1996; Beckpiotraschke & Jakubke, 1998), oder durch partielle Substitution mit organischen Lösungsmitteln (Kuhl et al., 1981, 1982; Sears et al., 1994; Cerovsky & Jakubke, 1994a-c, 1996; Vanunen et al., 1998). Eine dritte Möglichkeit wäre, die enzymkatalysierte Synthese kinetisch kontrolliert ablaufen zu lassen (Schellenberger & Jakubke, 1991). Zu diesem Zweck wird als Acylkomponente ein reaktiver Ester eingesetzt, welcher quantitativ hydrolysiert wird. Bei der Deacylierung kann das zugesetzte Nucleophil, meist ein Aminosäureamid oder Peptid, mit dem Lösungsmittel um das Acylenzym konkurrieren und ein neues Peptid generieren. Am Ende der Esterhydrolyse wird die Protease inaktiviert, um eine Hydrolyse der gebildeten Peptidbindungen und somit einen Übergang zur thermodynamisch kontrollierten Reaktion zu unterbinden. Die enzymkatalysierte Peptidsynthese eröffnet die Möglichkeit einer hochgradig sequenzspezifischen und stereoselektiven Peptidbindungsknüpfung.

Bei der Hydrolyse der Thioxoarylamid-Substrate des α -Chymotrypsins, Subtilisin C. und Papains kann in Gegenwart eines geeigneten Acylakzeptors ein Thioxoacyltransfer erreicht werden. Die Ergebnisse in Tab.15 zeigen die Präferenz des α -Chymotrypsins für hydrophobe nichtaromatische Reste (Leu, Met) in P_1' -Position. In Position P_2' wird weder Prolin noch ein

4-Nitroanilidrest akzeptiert. Auch die Dimethylsubstitution im Leu-N(CH₃)₂ hebt die gute Nucleophilie von Leu-NH₂ auf. In der Subtilisin C. katalysierten Thioxozeptidsynthese werden sowohl hydrophobe Dipeptid-Derivate (Ala-Tyr, Phe-Leu-N(CH₃)₂) als auch das hydrophile Dipeptid Gly-Gly als Nucleophile akzeptiert (vgl.Tab.15). Mit Nucleophilen deren P₂'-Position mit Pro, dem Dimethylamid- bzw. dem 4-Nitroanilidrest belegt waren, wurde keine Reaktion beobachtet. Auch Aminosäureester sind sehr ineffiziente Nucleophile.

Acylkomponente	Nucleophil		Ausbeute (%)	
	c: [mM]	Name	α-Chymotrypsin	Subtilisin C.
Ala-Ala-Pro-Phe-ψ[CS-NH]-Np	50	Met-Ala	37	6
	< 1 ^a	Ala-Ala-Pro-Phe	10	0
	100	Gly-Gly	6	60
	50	Ala-Tyr	17	56
	20	Phe-Leu-N(CH ₃) ₂	21	48
	50	Leu-NH ₂	42	14
	20	Met-Leu	28	4
	50	Ala-OMe	0	2
	20	Leu-N(CH ₃) ₂	0	0
	2	Phe-pNA	0	0
	2	Phe-Pro-Phe-pNA	0	0

Tab.15: Enzymkatalysierte Synthese von Thioxozeptiden aus einem Thioxoarylamid als Acylkomponente und dem jeweils angegebenen Nucleophil; Alle Reaktionen bei 25 °C in 35 mM Hepes; pH 7.8. ^aNebenprodukt in der Synthese, weil die N-terminal ungeschützte Acylkomponente selbst auch als Nucleophil aktiv war.

Die eingesetzten Nucleophilkonzentrationen waren durch deren Löslichkeit in wässrigem Puffer limitiert und wurden so hoch wie möglich gewählt, um eine optimale Syntheseausbeute zu erzielen. Für das gut lösliche Dipeptid Gly-Gly wurde die Abhängigkeit der Syntheseausbeute von der Nucleophilkonzentration ermittelt. Bis 50 mM Nucleophil nimmt die Ausbeute nahezu linear zu, und geht dann in eine Sättigungskurve über, die bei Konzentrationen von 100 bis 200 mM Nucleophil einen Maximalwert erreicht (vgl. Abb.27). Die Gesamtausbeute bei optimaler Nucleophilkonzentration wird durch das Verhältnis von Hydrolyse- und Aminolysegeschwindigkeit bestimmt, und widerspiegelt die Acyltransfereffizienz des Enzyms für das jeweilige Nucleophil (Schellenberger & Jakubke, 1991). Die mit fortschreitendem Verbrauch der Acylkomponente einhergehende, als Sekundärhydrolyse bezeichnete, Hydrolyse der enzymkatalytisch synthetisierten Peptide (Schellenberger & Jakubke, 1991) wird wegen der Proteolyseresistenz der generierten Thioxozeptide in unseren Experimenten nicht beobachtet.

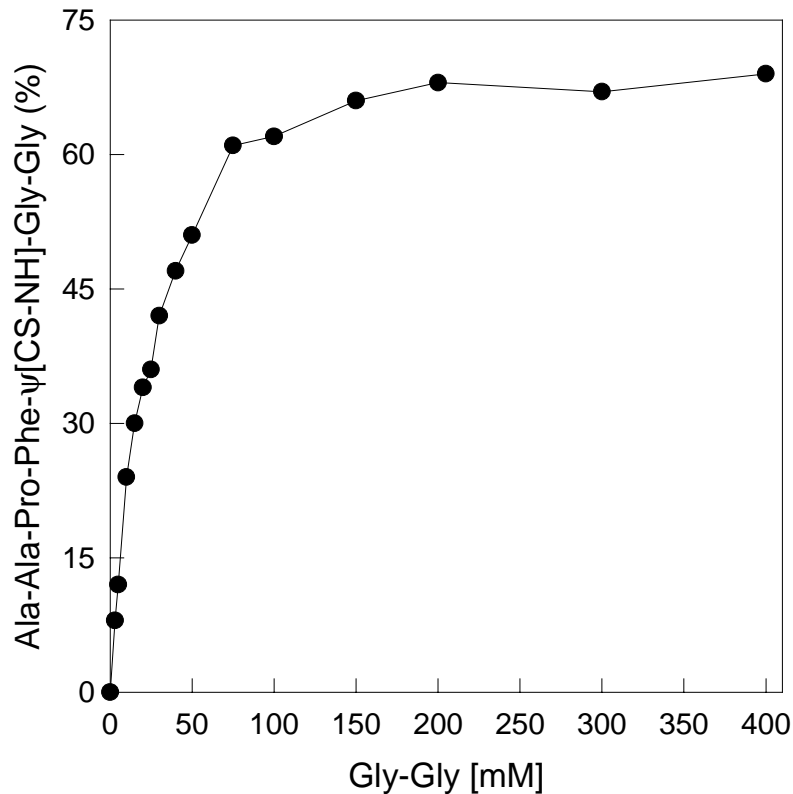


Abb.27: Konzentrationsabhängigkeit des Subtilisin C. katalysierten Thioacyltransfers auf das Dipeptid Gly-Gly. Als Acylkomponente wurden 0.5 mM Ala-Ala-Pro-Phe-ψ[CS-NH]-Np eingesetzt, die Subtilisin C.-Konzentration betrug 2 μM. Die Reaktionen verliefen in 35 mM HEPES, pH 7.8 bei 25°C über 20h.

Obwohl die Cysteinprotease Papain die Thioarylamidbindung effizienter hydrolysiert als die gewöhnliche 4-Nitroanilidbindung, ist sie nicht in der Lage, einfache nichtaktivierte Thiopeptidbindungen zu hydrolysieren. Jedoch können derartige Thiopeptide in Anwesenheit eines geeigneten Nucleophils bei der Hydrolyse der Thioarylamide in einer kinetisch kontrollierten Reaktion enzymkatalytisch gebildet werden (vgl.Tab.16). Papain ist ein besserer Katalysator für die enzymatische Synthese als es die Serinproteasen α-Chymotrypsin und Subtilisin sind. Unter gewöhnlichen Bedingungen werden im wässrigen Puffer Thioacyltransfer-Ausbeuten bis zu 80% erreicht.

Beim Papain wird auch eine effiziente Verwendung längerkettiger Nucleophile beobachtet. Durch Verknüpfung von Ala-Phe-Gly-ψ[CS-NH]-Np mit dem zuvor Subtilisin C.-katalysiert hergestellten Thiohexapeptid Ala-Ala-Pro-Phe-ψ[CS-NH]-Gly-Gly wurde das zweifach thioxylierte Nonapeptid Ala-Phe-Gly-ψ[CS-NH]-Ala-Ala-Pro-Phe-ψ[CS-NH]-Gly-Gly präparativ gewonnen. Dessen Identität wurde sowohl mittels ¹H-NMR als auch massenspektrometrisch abgesichert, zusätzlich wurden durch Fragmentierungsexperimente (Pfeifer et al., 1997) die Thioxylierungspositionen bestätigt.

Acylkomponente	Nucleophil		Ausbeute (%)
	c:[mM]	Name	
Ala-Phe-Gly- ψ [CS-NH]-Np	2	Ala-Gly-Pro-Phe-NH-Np	25
	20	Phe-Leu-N(CH ₃) ₂	72
	20	Met-Leu	76
	10	Ala-Ala-Pro-Phe- ψ [CS-NH]-(Gly) ₂	42

Tab.16: Enzymkatalysierte Synthese von Thioxozeptiden aus einem Thioxoarylamid als Acylkomponente und dem in der Tabelle jeweils angegebenen Nucleophil; Alle Reaktionen erfolgten in 35 mM Hepes; pH 7.8 bei 25 °C.

Da die verwendete Acylkomponente Ala-Phe-Gly- ψ [CS-NH]-Np N-terminal ungeschützt eingesetzt wurde, traten in der Papain-katalysierten Thioxozeptidsynthese auch höher aggregierte Nebenprodukte der Struktur (Ala-Phe-Gly- ψ [CS-NH])_n-Ala-Ala-Pro-Phe- ψ [CS-NH]-(Gly)₂ (n = 1,2 und 3) auf. Diese zeigen, wahrscheinlich wegen der hydrophoben Aminosäurereste und wegen der zunehmenden Anzahl von Thioxozeptidbindungen, eine abnehmende Löslichkeit und fallen aus der Reaktionslösung aus. Der abzentrifugierte Niederschlag wurde in einer 20% Acetonitril / 80% H₂O Mischung resuspendiert, mittels analytischer HPLC getrennt, die eluierenden Fraktionen aufgefangen, lyophilisiert und wiederum massespektrometrisch analysiert. Auf diesem Wege wurde unter anderem das dreifach thioxylierte Dodecapeptid (Ala-Phe-Gly- ψ [CS-NH])₂-Ala-Ala-Pro-Phe- ψ [CS-NH]-(Gly)₂ in analytischen Mengen gewonnen und dessen Identität durch Fragmentierung belegt (Pfeifer et al., 1997).

Diese Ergebnisse zeigen zum Einen, daß auf diesem Wege auch mehrfach thioxylierte Tandem-Peptidsequenzen zugänglich sind, und daß diese in wäßrigen Lösungen Stabilität aufweisen können. Zum Anderen zeigt sich, daß Papain auch länger-kettige Peptide als Nucleophil verwenden kann, deren Einsatz eher durch deren Löslichkeit als durch die Syntheseigenschaften des Enzyms limitiert ist.

Die mittels α -Chymotrypsin, Subtilisin C. und Papain enzymkatalytisch generierten „echten“ Thioxozeptide, d.h. solche, bei denen die Thioxozeptidbindung zwei native Aminosäurereste verbindet, sind resistent gegenüber der Proteolyse durch die gleiche Protease. Dies verstößt zwar scheinbar gegen das Prinzip der mikroskopischen Reversibilität, läßt sich aber über die unterschiedlichen Reaktivitäten der beteiligten Amin-Komponenten begründen.

Eine auf dem Zwei-Protonen-Transfer Modell nach (Fischer & Barth, 1981) beruhende Erklärung wäre, daß die Protonierung des Schwefels, die für den Übergang des TI von einer für die Substratbindung günstigen in eine für die Produktabspaltung optimale Konformation notwendig ist, nicht stattfindet. Der somit ausbleibende Konformationswechsel könnte die Protonierung der austretenden Amidgruppe durch His-N₂H⁺ der katalytischen Triade der

Protease behindern. Während dieser Protonierungsschritt wahrscheinlich essentiell für die Hydrolyse der nichtaktivierten Thioxoamidbindung ist, können aktivierte Abgangsgruppen ohne diesen Schritt auskommen, da sie das TI als Anion verlassen können (Christensen & Ipsen, 1979). Umgekehrt ist die Aminolyse des Thioxoacylenzyms durch die Aminogruppe eines Peptides bzw. Aminosäureamids möglich. Obwohl auch hier ein tetraedrisches Intermediat entsteht, scheint His-N₂ als Protonenakzeptor für eines der beiden Amidprotonen des Nucleophils in diesem Fall nicht notwendig zu sein.

Eine der hier beschriebenen, kinetisch kontrollierten enzymatischen Peptidsynthese prinzipiell vergleichbare Reaktion wurde für Trypsin-katalysierte Acyltransferreaktionen unter Verwendung von Peptid-4-Guanidinophenylestern als Acylkomponenten gefunden (Tanizawa et al., 1977; Schellenberger et al., 1991 a, b; Itoh et al., 1996, 1997; Sekizaki et al., 1996 a, b; 1998). Auch hier beobachtet man einen scheinbaren Verstoß gegen das Prinzip der mikroskopischen Reversibilität. Der an nicht-trypsinspezifische P₁-Aminosäurereste gekoppelte 4-Guanidinophenylrest bindet dabei im aktiven Zentrum des Trypsins und imitiert so die P₁-Seitenketten der spezifischen Substrate Arg und Lys, weshalb derartige Verbindungen auch als Substratmimetika (früher: inverse Substrate) bezeichnet werden (Bordusa et al., 1997). Bei der Hydrolyse dieser Verbindungen in Gegenwart geeigneter Nucleophile werden enzymkatalytisch Peptidbindungen generiert, die wegen der unspezifischen P₁-Reste nicht wieder hydrolysiert werden können.

3.6.2. Substitution wäßriger Puffer durch organische Lösungsmittel

Die enzymkatalysierte Bildung von längeren Thioxozeptiden, aufbauend auf Thioxoarylamid-Bausteinen, ist eine sinnvolle Ergänzung der bis dahin weitgehend chemischen Methoden der Thioxozeptidsynthese. Während die Verwendung an Sekundärbindungsstellen thioxylierter Peptide in der enzymatischen Peptidsynthese bereits beschrieben wurde (Unverzagt et al., 1992; Yao et al., 1998), stellt die hier beschriebene enzymkatalysierte Knüpfung der Thioxozeptidbindung an sich, ein Novum dar. Die Reaktionsausbeuten sind jedoch wegen der parallel zur Aminolyse ablaufenden Hydrolyse limitiert, sie erreichen nur bei Verwendung für das jeweilige Enzym optimaler Nucleophile befriedigende Werte. Wegen der schlechten Substrateigenschaften der Thioxoarylamide werden hohe Proteasekonzentrationen und längere Reaktionszeiten für deren Umsetzung benötigt, wodurch die Gefahr unspezifischer Hydrolysereaktionen, speziell bei Verwendung längererkettiger Acylkomponenten und Peptid-Nucleophile, wächst.

Um die Ausbeute (Aminolysereaktion) zu erhöhen und die Hydrolyse zurückzudrängen, wurde versucht, den wäßrigen Puffer partiell durch organische Lösungsmittel zu ersetzen. Bei Verwendung hochreaktiver Ester als Acylkomponenten konnte somit die Ausbeute der Aminolyse zum Teil auf Werte über 90% gesteigert werden (Kuhl et al., 1981, 1982, 1990;

Kuhl & Jakubke, 1990; Unverzagt et al., 1992; Paradkar & Dordick, 1994; Sasaki & Kise, 1994; Khmelnitsky et al., 1994; Cerovsky & Jakubke, 1994a-c, 1996, Wangikar et al., 1997). Es wurden verschiedene organische Lösungsmittel als potentielle Reaktionsmedien untersucht, so z.B. Hexan, Tetrahydrofuran, Dimethylformamid, Pyridin, Aceton, Acetonitril und DMSO, wobei der Restanteil des wäßrigen Puffers zwischen 1 und 10% lag. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze im einzelnen erfolgte nach optimierten Bedingungen, die aus der jeweiligen Literatur entnommen wurden. In allen Fällen ist die Enzymaktivität jedoch um 2 bis 3 Größenordnungen reduziert und die Aktivitäts-Halbwertszeit sinkt in den Stunden- bis Minutenbereich. Diese Bedingungen sind nicht ausreichend, um eine Hydrolyse bzw. Aminolyse der in ihren Substrateigenschaften ohnehin reduzierten Thioxoarylamide zu erreichen.

Eine Variante zur praktisch quantitativen Extraktion aktiver Enzymmoleküle aus einer wäßrigen Lösung in eine definierte *Isooctan* - Aerosol OT™ Mischung (Aerosol OT™: wäßrige Lösung aus 10% Di-*isooctyl*-sulfosuccinat) wurde von (Paradkar & Dordick, 1994; Wangikar et al., 1997) beschrieben. Diese unterhalb der kritischen Micellbildungskonzentration arbeitende Methode liefert, im Gegensatz zu den sonst üblichen Suspensionsverfahren, eine echte Enzymlösung im organischen Lösungsmittel mit ca. 10% Restaktivität und einer praktisch unbegrenzten Aktivitäts-Halbwertszeit, die in einer Modellreaktion eine effiziente enzymkatalysierte Peptidsynthese ermöglichte.

Das hier gestellte Versuchsziel, den Thioxoacylrest, mit höherer Effizienz als im wäßrigen Puffer möglich, enzymkatalytisch auf entsprechende Nucleophile zu transferieren, wurde auch mit dieser Methode nicht erreicht. Speziell das zum Lösen der Acyl- und Aminkomponenten benötigte Tetrahydrofuran reduzierte die Aktivität des extrahierten α -Chymotrypsins bzw. Subtilisin C. erheblich. Außerdem gelang es nicht, ein langsames Ausfallen von Komponenten der Reaktionsmischung über die Zeit zu unterbinden. Vor allem Letzteres führt zu einer zusätzlichen Abnahme der Enzymaktivität.

3.7. Thiopeptide als potentielle Substrate einer induzierbaren Proteaseaktivität des Cyclophilins

Cyclophiline sind Enzyme, die die *cis/trans* Isomerisierung der Peptidyl-Prolyl-Peptidbindung in Peptiden und Proteinen katalysieren und die Gleichgewichtseinstellung beschleunigen können (Fischer et al., 1984). Die Katalyseeffizienz ist dabei sehr hoch, die für Modellpeptidsubstrate beobachteten $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ -Werte liegen in der Größenordnung diffusionskontrollierter Reaktionen. Weitgehend ungeklärt ist hingegen der Mechanismus, nach dem diese Reaktionen ablaufen. Unter den zahlreichen diskutierten Varianten (Fischer et al., 1989; 1994) befinden sich auch solche, die, ähnlich der Katalyse durch Serin- und Cysteinproteasen, einen nucleophilen Angriff auf den Carbonylkohlenstoff der Peptidyl-Prolyl-Bindung unter Aufhebung des Doppelbindungscharakters der Amidbindung und Ausbildung eines tetraedrischen Intermediates postulieren. Als Nucleophil würden entweder reaktive Aminosäureseitenketten aus dem Protein oder ein Hydroxid-Ion in Frage kommen. Im Gegensatz zu den Proteasen sollten bei der Cyp-Katalyse der Konformationswechsel des tetraedrischen Intermediates hin zur Produktabspaltung und die Protonierung der Abgangsgruppe nicht stattfinden. Vielmehr sollte eine Relaxation hin zu den Ausgangskomponenten vonstatten gehen, die Zeit für eine Isomerisierung läßt (vgl. Abb.28).

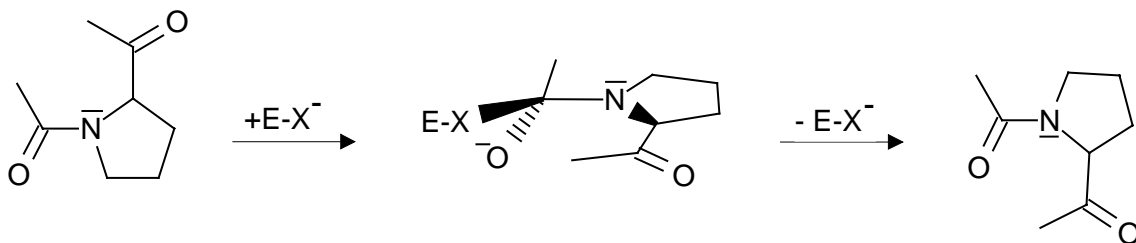


Abb.28: Modell der Cyclophilin-katalysierten Isomerisierung, bei dem ein Nucleophil am Carbonylkohlenstoff der Peptidyl-Prolyl-Peptidbindung angreift, nach (Fischer, 1994).

Durch Röntgenkristallstrukturanalyse von Cyclophilin-Inhibitor Komplexen wurden solche potentiell katalytischen Seitenketten identifiziert. Durch deren selektive Substitution mittels ortsspezifischer Mutagenese wurden die katalytischen Aktivitäten der Mutantenzymen zwar beeinflusst, ein absolut essentieller Aminosäurerest konnte auf diese Weise jedoch nicht identifiziert werden (Übersicht: Fischer, 1994). Ein pH-abhängiger Katalysemechanismus, der über Säure-Base Katalyse und ein kovalentes Intermediat verläuft, konnte kürzlich für die Isomerase Pin1 nachgewiesen werden (Ranganathan et al., 1997). Im Falle des Cyclophilins wurde dem His126 eine mögliche Beteiligung an der Katalyse zugerechnet (Ke et al., 1993).

Ein rein mathematisches Screening von Protein-3D-Daten auf Strukturen, die in ihren räumlichen Koordinaten der katalytischen Triade von Serinproteasen ähneln, ergab eine vergleichbare Konstellation der Aminosäurereste Ser99-His92-Asp123 im Cyclophilin (Wallace et al., 1996). Durch die Dreifachmutation Ala91Ser-Phe104His-Asn106Asp konnte eine effiziente Prolinendopeptidase-Aktivität in diese, als Cyproase bezeichnete, Cyclophilinmutante eingeführt werden (Quemeneur et al., 1998).

Obwohl die genannten Experimente keine einheitliche Aussage liefern, stützen sie doch Überlegungen, den Reaktionsmechanismus der Isomerisierungs-Katalyse als einen redundanten Proteasemechanismus zu betrachten. In diesem Zusammenhang wurden einige Experimente durchgeführt, die klären sollten, ob unter gewissen Umständen eine Proteaseaktivität des rekombinant erzeugten, humanen cytosolischen Cyclophilin 18 beobachtet werden kann. Zu diesem Zweck wurde als potentiell Substrat das Thioxopeptid-Derivat Ala-Gly- ψ [CS-N]-Pro-Phe-NH-Np gewählt, dessen Thioxocarbonylgruppe eine erhöhte Reaktivität besitzt, wie aus den spontanen Zyklisierungsreaktionen unter Bildung von 2-Keto-5-amino-4,5-Dehydropiperazin-Derivaten (vgl. Kap.2.2.2.) gefolgert wurde. Dieses Derivat bindet mit der entsprechenden Oxo-Substrate vergleichbaren Affinität an Cyp, ist jedoch kein Substrat für die *cis/trans* Isomerisierung. Es konnte weder bei Inkubation unter schwach basischen (35 mM HEPES, pH 7.8) noch unter schwach sauren Bedingungen (50 mM Natriumacetat, pH 5.0) eine Peptidbindungshydrolyse beobachtet werden. Unter der Annahme, daß ein potentieller Protonen-Donor fehlt, wurden als Hilfskatalysatoren je 0.5 M His, Imidazol bzw. NaN_3 zugesetzt. Auch hier wurde keine Bindungshydrolyse beobachtet.

Des Weiteren wurden unter gleichen Versuchsbedingungen die Derivate Ala-Gly-Pro- ψ [CS-NH]-Phe-NH-Np und Ala- ψ [CS-NH]-Gly-Pro-Phe-NH-Np auf potentielle Substrateigenschaften untersucht. Diese enthalten in Nachbarschaft der Peptidyl-Prolyl-Bindung eine thioxylierte Peptidbindung, und sind Substrate des Cyclophilins. Eine Veränderung der chemischen Eigenschaften der -Gly-Pro- Bindung durch induktive Einflüsse der benachbarten Thioxopeptidbindungen kann als wahrscheinlich angenommen werden. Eine Cyp-katalysierte Hydrolyse der Peptidyl-Prolyl-Bindung wurde jedoch auch hier nicht gefunden. Obwohl diese Ergebnisse keine neuen Hinweise auf einen Protease-ähnlichen Mechanismus der Cyclophilin-Katalyse liefern, kann ein solcher auf Grund der hier erzielten Resultate auch nicht ausgeschlossen werden.

4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zu physikalisch-chemischen Eigenschaften von Thiopeptid-Derivaten und deren Verhalten in der proteasekatalysierten Reaktion durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit denen, die für die parallel untersuchten unsubstituierten Oxo-Derivate erhalten wurden, verglichen, und die Bedeutung der Thioxosubstitution sowohl für physikalisch-chemische als auch enzymologische Fragestellungen bewertet.

Die Untersuchung thioxylierter Peptide ist aus mehreren Gründen interessant. Das charakteristische UV/VIS und CD-Spektrum der Thiopeptidbindung bietet bei nur minimaler Veränderung der Ausgangsstruktur (Ein-Atom-Substitution) Möglichkeiten zur spezifischen Detektion, und verleiht entsprechend modifizierten Peptidderivaten die Eigenschaften von Sonden. Mit der Thioxosubstitution wird das bislang begrenzte Arsenal an Peptidrückgrat-Modifikationen erweitert, während Seitenkettenwechselwirkungen weitgehend unbeeinflusst bleiben. Durch spezifische Thioxylierung können einzelne, genau definierte Peptidbindungen substituiert, deren Auswirkungen eindeutig zugewiesen und von anderen Effekten getrennt werden. Die erhöhte Reaktivität der Thiopeptidbindung läßt diese als Intermediat für weiterführende, wiederum hochspezifische chemische Modifikationen an Polypeptiden, z.B. in Form von Verzweigungen, die vom Peptidrückgrat ausgehen, interessant erscheinen. Schließlich eröffnen Möglichkeiten zur Modulation von Proteaseaktivitäten ein weites Feld potentieller medizinischer Applikationen.

Thiopeptidbindungen besitzen einen, auf $\pi-\pi^*$ Übergänge zurückzuführenden, charakteristischen Chromophor im Bereich zwischen 260 und 280 nm, der mit Extinktionskoeffizienten um 10 000 sehr intensiv ist, sich in CD-Messungen außerhalb des Fern-UV-Absorptionsbereiches von Sekundärstrukturelementen befindet, und somit die Möglichkeit zur Verfolgung singulärer Prozesse innerhalb komplexer Peptidstrukturen eröffnet. In CD-Messungen am Thioxodipeptid Ala- ψ [CS-N]-Pro konnte erstmals gezeigt werden, daß sich CD-Spektren von Lösungen mit unterschiedlichem *cis*-Gehalt voneinander unterscheiden, und diese Differenzen zur Messung der Isomerisierungsgeschwindigkeit genutzt werden können. Gleiches wurde für das Thiopeptid-4-nitroanilid Ala-Gly- ψ [CS-N]-Pro-Phe-NH-Np gefunden. Während UV/VIS-Signale im Absorptionsmaximum des Thiopeptidchromophors kaum sensitiv für *cis/trans* Isomerisierungen sind, gibt das CD-Signal die chirale Umgebung des Thiopeptides in der *cis* und *trans*-Konformation wieder. Der *cis*-Gehalt einer wäßrigen Lösung von Ala-Gly- ψ [CS-N]-Pro-Phe-NH-Np kann durch Einstrahlen von UV-Licht mit Wellenlängen im Absorptionsbereich des Thiochromophors erhöht werden kann. Auf diesem Wege könnten durch die Thioxosubstitution definierte

Bindungen „geschaltet“, und *cis/trans* Gleichgewichte von Prolyl-, wahrscheinlich aber auch von sekundären Amid-Peptidbindungen, gezielt verschoben werden.

Thioxozeptidderivate der Struktur H-Xaa- ψ [CS-NH]-R; (R: Aminosäure, 4-Nitroanilin), zeigen eine unerwartete Reaktivität der Aminogruppe, die sich in schwach alkalischen (pH 7.5 - 7.8) wäßrigen Puffern in Anwesenheit stöchiometrischer Mengen Formaldehyd in einer Umwandlung zum Azomethin N-Methyliden-Xaa- ψ [CS-NH]-R widerspiegelt. Die Thioxylierung der Position 2 innerhalb einer Peptidkette (H-Xaa-Yaa- ψ [CS-NH]-R) begünstigt eine nucleophile Reaktion der Aminogruppe mit dem Thioxocarbonyl-Kohlenstoff. Dabei bilden sich, unter H₂S-Abspaltung und Erhalt der Bindung zu -R, zyklische 2-Keto-5-amino-4,5-Dehydropiperazin-Derivate. Beide Reaktionen werden unter identischen Bedingungen für die entsprechenden Oxo-Derivate nicht beobachtet.

Außergewöhnlich ist die hohe Basenstabilität von Thioxozeptid-4-nitroaniliden der Struktur R-Yaa- ψ [CS-NH]-Np und R-Xaa- ψ [CS-NH]-Yaa-NH-Np. Erstere zeigen eine leichte Dissoziierbarkeit des Amidprotons der aktivierten Thioxozeptidbindung, sie stabilisieren das hydrolyse stabile Thioxoamid-Anion. Eine transanulare Stabilisierung über eine zyklische Struktur, in die der Schwefel des Thioxocarbonyls involviert sein muß, wäre für letztere zu diskutieren.

Die veränderten chemischen Eigenschaften der Thioxozeptidbindung reflektieren sich auch in der Wechselwirkung von Thioxozeptid-Derivaten mit Proteasen. Die Serinproteasen α -Chymotrypsin aus Rinderpankreas und Subtilisin Carlsberg aus *Bacillus licheniformis* sind nur dann in der Lage die Thioxozeptidbindung zu hydrolysieren, wenn diese wie in Thioxozeptid-4-Nitroaniliden aktiviert ist. Die k_{cat} -Werte sind, verglichen zu den Oxo-Substraten, jedoch um mehr als 3 Größenordnungen niedriger. Sie bilden ein intermediäres Thioxoacylzym und können den Thioxoacylrest unter Ausbildung einer „echten“ Thioxozeptidbindung, d.h. einer thioxylierten Peptidbindung zwischen zwei proteinogenen Aminosäureresten, auf einen geeigneten Akzeptor (Aminosäureamid, Peptid) transferieren. Die so generierten Thioxozeptide sind resistent gegenüber der Hydrolyse durch die Protease, die deren Synthese katalysiert hat. Jedoch bilden sie Michaelis-Komplexe, und hemmen die Hydrolyse des Substrates Ala-Ala-Pro-Phe-NH-Np reversibel mit K_i - bzw. IC_{50} -Werten im millimolaren Bereich.

Die Cysteinprotease Papain hydrolysiert aktivierte Thioxozeptide sogar effizienter als die entsprechenden Oxo-Derivate, vorwiegend wegen der niedrigeren K_m -Werte. Durch einen kinetisch kontrollierten Thioxoacyltransfer können ebenfalls „echte“ Thioxozeptide erzeugt werden, auch diese sind beständig gegenüber der Hydrolyse durch Papain. Die Fähigkeit des

Papains auch längere Peptide als Acylakzeptoren zu verwenden, kann für die Synthese mehrfach thioxylierter Tandemsequenzen ausgenutzt werden.

Die Hydrolyse der aktivierten Thiopeptidbindung im Substrat Suc-Ala-Pro- ψ [CS-NH]-Np durch Prolylloligopeptidase aus humaner Plazenta bzw. *Flavobacterium meningosepticum* konnte qualitativ belegt, ein Thioxoacyltransfer auf Leu-NH₂ hingegen nicht nachgewiesen werden. Für nichtaktivierte Thiopeptide wurde keine Proteolyse, aber eine kompetitive Inhibierung des Enzyms durch Ala-Xaa-Pro- ψ [CS-NH]-Phe-NH-Np mit K_i-Werten von 12 μ M (Xaa: Gly) bzw. 44 μ M (Xaa: Ala) gefunden.

Nur die Dipeptidylpeptidase IV, nicht jedoch die Dipeptidylpeptidase II, erwies sich in der Lage, die nichtaktivierte Thiopeptidbindung im Derivat Ala-Pro- ψ [CS-NH]-Phe-NH-Np zu hydrolysieren, und den Thioxoacylrest in einer thermodynamisch kontrollierten Synthesereaktion auf das Dipeptid Ala-Tyr zu transferieren. Dieser Unterschied kann zur Differenzierung zwischen beiden Enzymformen auf Basis ihrer Substratspezifität herangezogen werden. Das nichtenzymatische Umwandlungsprodukt des potentiellen Substrates Ala-Pro- ψ [CS-NH]-Np, ein 2-Keto-5-amino-4,5-Dehydropiperazin-Derivat, hemmt das Enzym reversibel mit einem IC₅₀-Wert von 62 μ M, und könnte somit die Leitstruktur einer neuen Gruppe proteolyseresistenter Dipeptidylpeptidase IV Inhibitoren darstellen.

Während die Thioxylierung der Sekundärbindungsstellen P₄ bis P₂ die α -Chymotrypsin katalysierte Hydrolyse von Derivaten der Struktur Ala-Xaa-Pro-Phe-NH-Np (Xaa: Gly, Ala) nicht nennenswert beeinflusst, wird für Subtilisin C. eine 20-fache Reduktion der katalytischen Effizienz bei Thioxylierung der P₃-Position gefunden, die auf die Störung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Enzym und Substrat zurückgeführt werden kann.

Für die Prolylloligopeptidase und die Dipeptidylpeptidase IV beobachtet man eine Reduktion der k_{cat}/K_m-Werte von P₂-thioxylierten Derivaten um 2-3 Größenordnungen, für Papain sogar um bis zu 4 Größenordnungen. Diese Proteasen besitzen für den Katalyseprozeß essentielle P₂-S₂ Wasserstoffbrückenbindungen. Für die Prolylloligopeptidase wurden weiterhin P₃-P₂-Kooperativitätseffekte gefunden, die im Falle des Derivates Ala- ψ [CS-NH]-Gly-Pro-Phe-NH-Np zu einer fünffach höheren Proteolysegeschwindigkeit führten. Im Gegensatz zu der allgemeinen Annahme, daß die Thioxosubstitution die Proteolyseempfindlichkeit verringert, zeigt dieses Beispiel, daß in Einzelfällen auch gegenteilige Effekte beobachtet werden können. Die Ergebnisse machen deutlich, daß die Einflüsse von Sekundärbindungsstellen-Thioxylierungen sehr verschieden sind, und nicht vorausgesagt oder verallgemeinert werden können. Im Einzelfall können sie aber wichtige Hinweise auf Enzym-Substrat Wechselwirkungen in Form von Wasserstoffbrückenbindungen geben.

5. Experimenteller Teil

5.1. Synthese der verwendeten Peptidderivate

Alle in den Experimenten verwendeten Peptidderivate wurden von Dr. Mike Schutkowski von der Max-Planck-Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“ synthetisiert, und für die hier durchgeführten Untersuchungen freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Synthesevorschriften sind unter (Schutkowski et al., 1994, 1995, 1997) publiziert.

Die basisch katalysierte Esterhydrolyse der Peptidderivate Ala-Ala-Pro-Phe-Ala-OMe und Ala-Ala-Pro-Phe- ψ [CS-NH]-Ala-OMe wurde wie folgt durchgeführt:

5 mg jedes Peptidesters wurden in einer Konzentration von 5 mM in Wasser gelöst. Unter Rühren wurde 0.1 M KOH zugetropft bis ein pH von 12 erreicht war. Die Esterhydrolyse wurde mittels analytischer HPLC verfolgt, sie verlief innerhalb einer Stunde bei 25°C vollständig und ohne Bildung von Nebenprodukten. Für die Analyse wurde eine analytische HPLC von Sycam (Gilchingen, Deutschland) verbunden mit einer MERCK LiChrospher RP18 Säule (125*4 mm, 5 μ m) verwendet. Als Eluent diente eine Mischung aus 40% Acetonitril und 60% 50 mM Kaliumdihydrogenphosphat, pH 3. Im Abstand von 15 min wurden 10 μ l Probe aus dem Reaktionsansatz entnommen und in einem isokratischen Lauf mit einem Fluß von 1 ml/min analysiert. Die Detektionswellenlänge war 220 nm. Nach vollständiger Esterhydrolyse wurde der Reaktionsansatz mit 0.1 M HCl neutralisiert und über eine präparative HPLC (Gilchingen, Deutschland), ausgerüstet mit einer präparativen RP18 Säule (25 * 250 mm, 7 μ m) entsalzt. Als Eluent diente eine Mischung aus Acetonitril / Wasser + 0.05% TFA. Der gesamte Reaktionsansatz wurde über eine 5 ml Probenschleife auf die mit Wasser äquilibrierte Säule appliziert. Anschließend wurde 5 min mit Wasser gewaschen, nach Elution der Salze wurde das gebundene Peptid mit 40% Acetonitril eluiert. Nach Entfernen des Acetonitrils am Rotationsverdampfer wurde das Eluat eingefroren und lyophilisiert. Die Reinheit des jeweiligen Produktes wurde entsprechend Methode **B** durch HPCE-Analyse geprüft und die Identität durch massespektrometrische Messung bestätigt.

5.2. Allgemeine Bemerkungen

5.2.1 Puffer und Peptidlösungen

Alle Puffer wurden vor Einstellung des pH-Wertes entgast und steril filtriert. Die fertigen Pufferlösungen wurden bei 4°C aufbewahrt.

Die 1 ml Stammlösungen der Peptidderivate wurden nach dem Lösen zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5415C, 14 000 rpm, 10 min) und anschließend durch einen 0.45 μ m Filteraufsatz filtriert (ALLTECH, Unterhaching, Deutschland). Die exakte Konzentration chromogener Stammlösungen wurde im Falle von 4-Nitroaniliden an Hand der Extinktion des

nach Totalhydrolyse freigesetzten 4-Nitroanilins (ϵ_{390} : 11 800) ermittelt. Bei nichtchromogenen Verbindungen wurde die an Hand der Einwaage berechnete Konzentration verwendet. Die Peptid-Stammlösungen wurden bei -20°C eingefroren, während der Messungen wurden sie auf Eis aufbewahrt.

5.2.2. Stabilitätsuntersuchungen

Die Stabilität aller Derivate wurde durch 24 h Inkubation (25°C) im entsprechenden Puffer getestet und entsprechend den Methoden **B** und **C** an Hand der Retentionsprofile und Peakspektren der analytischen HPLC auf mögliche Umwandlungsprodukte in Folge nichtenzymatischer Reaktionen untersucht.

5.2.3. Untersuchung der Hydrolyse- und Umwandlungsprodukte

Für die Analyse der Hydrolyse- und Umwandlungsprodukte wurden alle Reaktionsansätze der kinetischen Experimente gesammelt und über 20h bei 25°C aufbewahrt. Nach vollständigem Verlauf der jeweiligen Reaktion wurden die Proben mittels einer Spritze über eine entsprechend äquilibrierte Millipore C18-light Kartusche (Waters, Milford, USA) gepumpt. Nach Auswaschen aller Pufferionen mit 2 ml destilliertem Wasser wurden die gebundenen Hydrolyseprodukte mit 500 μl ACN in 5 Fraktionen zu je 100 μl eluiert. Diese Fraktionen wurden mittels HPCE entsprechend Methode **B** auf ihren Gehalt an Hydrolyseprodukten untersucht. Die Identität der Peptide dieser Fraktionen wurde anschließend mittels analytischer HPLC nach Methode **C** und durch Elektrospray-Massespektrometrie analysiert.

5.2.4. Beeinflussung der kinetischen Konstanten durch DMSO im Reaktionsansatz

Den Meßansätzen zugesetztes DMSO beeinflusst die Enzym-Substrat Wechselwirkungen und somit die kinetischen Konstanten. Um vergleichbare Meßergebnisse zu bekommen, ist eine gleiche Endkonzentration DMSO in allen Meßansätzen notwendig. Im Falle der α -Chymotrypsin und Subtilisin C. katalysierten Hydrolyse von Ala-Ala-Pro-Phe-NH-Np wurde dessen Einfluß näher untersucht. In beiden Fällen bewirkt eine Erhöhung der DMSO-Konzentration eine Vergrößerung der k_{cat} und der K_{m} -Werte, wobei der Anstieg der K_{m} -Werte stärker ist als der der k_{cat} -Werte, was letztlich eine Verringerung des Quotienten $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ nach sich zieht (vgl. Abb.29). Beim Subtilisin C. betrug der Abfall von $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ca. 7 % pro 1Vol.% DMSO und verlief annähernd linear bis zu einer Endkonzentration von 8 Vol.% DMSO im Reaktionsansatz. Beim α -Chymotrypsin war der Abfall der katalytischen Effizienz mit 3% pro 1Vol.% DMSO geringer, er verlief bis ca. 15 Vol.% DMSO im Ansatz linear.

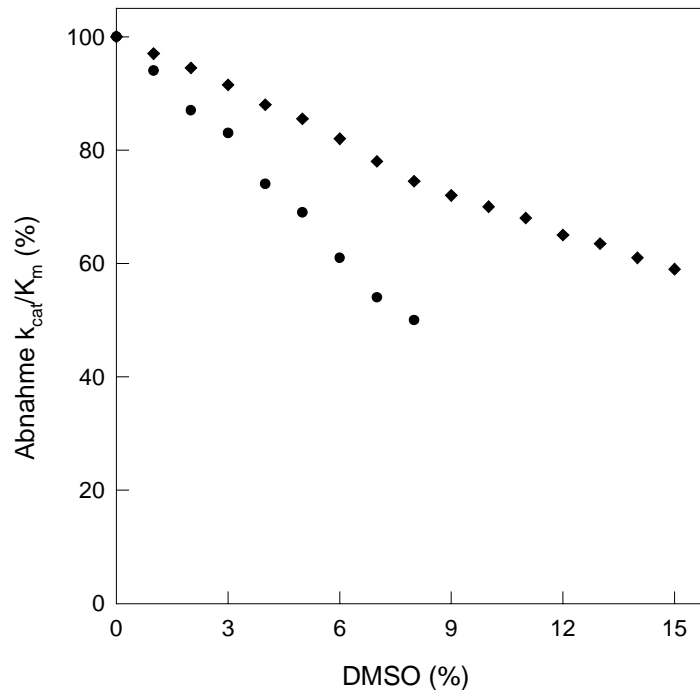


Abb.5: Darstellung der Abnahme von k_{cat}/K_m in der α -Chymotrypsin (◆) bzw. Subtilisin C. (●) katalysierten Hydrolyse von Ala-Ala-Pro-Phe-NH-Np mit steigender DMSO-Konzentration. Die Messungen erfolgten in 35 mM HEPES, pH 7.8 bei 25°C mit 50 μ M Substrat unter der Bedingung $[S_0] \ll K_m$. Unter diesen Bedingungen kann k_{cat}/K_m aus dem Quotienten $v_{ini}/[S_0] \cdot [E_0]$ berechnet werden, wobei v_{ini} die Initialgeschwindigkeit der Reaktion darstellt.

Vergleichbare Effekte wurden bei kinetischen Messungen mit Subtilisin BPN in Gegenwart von Formamid beobachtet, 15% des organischen Lösungsmittels verachteten den K_m -Wert bei der Hydrolyse von Z-Gly-Leu-NH₂ und reduzierten k_{cat} auf die Hälfte (Robertus et al., 1972a). Beim Vergleich kinetischer Konstanten verschiedener Substrate und Inhibitoren sollte deshalb neben den physikalischen Meßbedingungen auch der Gehalt an organischen Lösungsmitteln im Meßansatz berücksichtigt werden. Die in der Literatur häufig beschriebenen großen K_m -Werte von N-geschützten Substraten, die wegen ihrer schlechten Löslichkeit in wäßrigem Puffer in Gegenwart hoher organischer Lösungsmittelanteile gemessen wurden, sind so erklärbar.

5.3. Messungen zu physikalisch-chemischen Eigenschaften der Thiopeptide

Die UV/VIS- und CD-spektroskopischen Messungen wurden entsprechend den Methoden A und E durchgeführt. Die nichtenzymatischen Nebenreaktionen wurden mit den Methoden A, B und C untersucht. Die konkreten Meßbedingungen sind in den jeweiligen Ergebnisteilen (vgl. Kap. 2.1. und 2.2.) mit angegeben.

5.4. Enzymatische Untersuchungen

5.4.1. α -Chymotrypsin

5.4.1.1. Isolierung, Aufbewahrung und Aktivitätsbestimmung

Das verwendete α -Chymotrypsin aus Rinderpankreas (zweifach kristallisiert) ist kommerziell von der Firma MERCK (Darmstadt, Deutschland) erhältlich. Es wurde eine 200 μ M Stammlösung in 1 mM HCl (pH 3) hergestellt und bei 4°C aufbewahrt. Diese ist für mindestens 6 Monate ohne Aktivitätsverlust stabil. Zum Messen wurden Aliquots von der Stammlösung entnommen und mit entsprechenden Mengen 35 mM Hepes, pH 7.8 verdünnt. Der Gehalt an katalytisch aktivem Enzym wurde über die Hydrolyse von 4-Nitrophenylacetat spektrophotometrisch (Hartley & Kilby, 1954) unter Verwendung des Dioden-Array Spektrophotometers HP8452A (Hewlett Packard, Waldbronn, Deutschland) bestimmt. Unmittelbar nach Zusatz einer definierten Enzymmenge zu einer 4-Nitrophenylacetatlösung in 35 mM Hepes, pH 7.8 tritt in Folge unmittelbarer Acetylenzymbildung, und damit einhergehender Freisetzung von 4-Nitrophenol, ein Extinktionssprung auf. Der Anstieg dieser „burst“-Phase unterscheidet sich deutlich von dem der sich anschließenden Hydrolyse. Aus der Extinktionsdifferenz vom Beginn bis zum Ende der schnellen Phase (ϵ_{404} : 15 375) läßt sich die Konzentration des initial freigesetzten 4-Nitrophenols berechnen, diese entspricht der Konzentration an aktiven Zentren im Enzym.

5.4.1.2. Puffer, Reaktionsbedingungen und Meßmethoden

Alle Messungen wurden in 35 mM Hepes-Puffer, pH 7.8, bei 25 °C durchgeführt. Die Peptidderivate wurden in 20 μ l DMSO gelöst und mit 980 μ l Puffer auf eine Endkonzentration von 1 mM verdünnt. Für die kinetischen Messungen wurde dem Puffer 2% (v/v) DMSO zugesetzt.

Die kinetischen Konstanten von 4-Nitroaniliden wurden UV/VIS-spektroskopisch nach Methode **A** bestimmt. Die Proteasekonzentrationen lagen zwischen 20 und 100 nM, bei Derivaten mit thioxylierter Spaltstelle bei 4 μ M.

Die Untersuchungen zur Hydrolyse der Peptide Ala-Ala-Pro-Phe-Ala, Ala-Ala-Pro-Phe-Ala-OMe, Ala-Ala-Pro-Phe- ψ [CS-NH]-Ala und Ala-Ala-Pro-Phe- ψ [CS-NH]-Ala-OMe wurden mittels Kapillarelektrophorese nach Methode **B** vorgenommen. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze war identisch mit denen der spektrophotometrischen Messungen. 3 Minuten nach Start der Reaktion durch Enzymzugabe wurde die erste Probe aus dem Reaktionsansatz entnommen und in der HPCE getrennt, gefolgt von 4 weiteren Läufen im Abstand von je 15 Minuten. Die Enzymkonzentrationen wurden so gewählt, daß der Umsatz über 1h 10% nicht überstieg. Aus dem Anstieg der Auftragung des prozentualen Umsatzes gegen die Zeit, kann

nach Multiplikation mit S_0 die Initialgeschwindigkeit ermittelt werden. Die Linearität der Auftragung zeigte, daß während der Meßzeit weder Produkthemmung noch Enzyminaktivierung auftraten. Das im Fall von Peptidbindungshydrolyse detektierte Hydrolyseprodukt Ala-Ala-Pro-Phe hat innerhalb des Meßfehlerbereiches bei 200 nm den gleichen Extinktionskoeffizienten wie Ala-Ala-Pro-Phe-Ala bzw. dessen Ester, ein Korrekturfaktor bei der Bestimmung des prozentualen Umsatzes war somit nicht notwendig. Die Reaktionsansätze zur enzymkatalysierten Peptidsynthese (vgl. Methode **D**) enthielten keine Lösungsmittelzusätze. Die Proteasekonzentration betrug 2 μM . Es wurde je 1 mM Ala-Ala-Pro-Phe- ψ [CS-NH]-Np eingesetzt, die verwendbaren Nucleophilkonzentrationen waren durch deren Löslichkeit bestimmt, und sind im Ergebnisteil mit angegeben.

Die IC_{50} -Werte wurden spektrometrisch nach Methode **A** mit 50 μM ($= 1/10 K_m$) Ala-Ala-Pro-Phe-NH-Np als Substrat bestimmt.

Der K_i -Wert wurden bestimmt, indem die Inhibierung bei vier verschiedenen Inhibitor- und Substratkonzentrationen gemessen wurde. Es wurde bei Substratkonzentrationen von 0.26, 0.51, 1.02 und 2.04 mM, entsprechend dem 0.5, 1, 2 und 4-fachen des K_m Wertes von Ala-Ala-Pro-Phe-NH-Np, und bei Inhibitorkonzentrationen von 0, 1.6, 4.8, 6.4 und 9.6 mM Ala-Ala-Pro-Phe- ψ [CS-NH]-Ala gemessen. Der K_i -Wert und Hemmtyp wurde durch Dixon-Auftragung der Meßwerte ermittelt.

5.4.2. Subtilisin Carlsberg

5.4.2.1. Isolierung, Aufbewahrung und Aktivitätsbestimmung

Subtilisin Carlsberg aus *Bacillus licheniformis* wurde kommerziell von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen. Es wurde eine 50 μM Stammlösung in 35 mM HEPES, pH 7.8 hergestellt. Diese wurde aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Die eingefrorenen Proben sind für mindestens 3 Monate stabil, nach dem Auftauen wird die volle Ausgangsaktivität wiedergefunden. Ala-Ala-Pro-Phe-NH-Np diente als Referenzsubstrat bei der Aktivitätsbestimmung.

5.4.2.2. Puffer, Reaktionsbedingungen und Meßmethoden

Für alle Experimente gelten die gleichen Bedingungen wie unter 5.4.1.2. für α -Chymotrypsin beschrieben.

Die IC_{50} -Werte wurden mit 50 μM ($= 1/30 K_m$) Ala-Ala-Pro-Phe-NH-Np als Substrat entsprechend Methode **A** bestimmt.

Der K_i -Wert wurde mit Substratkonzentrationen von 0.65, 1.3, 1.95 und 2.6 mM, entsprechend dem 0.5, 1, 1.5 und 2-fachen des K_m Wertes von Ala-Ala-Pro-Phe-NH-Np und

Inhibitorkonzentrationen von 0, 0.8, 1.6, 2,4 und 3.2 mM Ala-Ala-Pro-Phe- ψ [CS-NH]-Ala ermittelt.

5.4.3. Dipeptidylpeptidase IV

5.4.3.1. Isolierung, Aufbewahrung und Aktivitätsbestimmung

Die Dipeptidylpeptidase IV wurde aus Schweineniere isoliert und von Dr. Jens Rahfeld, Max-Planck Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“, freundlicherweise für die hier durchgeführten Experimente zur Verfügung gestellt. Das Enzym ist bei 4°C über mehrere Monate stabil, die genaue Aktivität wurde über Ala-Pro-NH-Np als Referenzsubstrat ermittelt.

5.4.3.2. Puffer, Reaktionsbedingungen und Meßmethoden

Alle Messungen wurden in 35 mM Hepes-Puffer, pH 7.8, bei 25°C ohne Lösungsmittelzusätze durchgeführt.

Die Hydrolyse der Substrate Ala-Pro-Phe-NH-Np und Ala-Pro- ψ [CS-NH]-Phe-NH-Np durch DP IV wurde spektrometrisch nach Methode A im gekoppelten optischen Test an Hand der Aminopeptidase K katalysierten 4-Nitroanilin Freisetzung aus dem DP IV Hydrolyseprodukt Phe-NH-Np bei 390 nm (ϵ_{390} : 11800) verfolgt. Zu diesem Zweck wurde dem Reaktionsansatz 1 μ l der Hilfsprotease zugesetzt. In Kontrollexperimenten mit 1/3 bzw. dem dreifachen der Hilfsproteasekonzentration wurde abgesichert, das die Aminopeptidase K katalysierte Reaktion nicht geschwindigkeitsbestimmend ist. Die DP IV-Konzentrationen im Ansatz betragen ca. 1 nM für Ala-Pro-Phe-NH-Np und 50 nM für Ala-Pro- ψ [CS-NH]-Phe-NH-Np.

Die Versuche zur enzymkatalysierten Peptidsynthese wurden mit 1mM Ala-Pro- ψ [CS-NH]-Phe-NH-Np und 20 mM Ala-Tyr in Gegenwart von 20 nM DP IV durchgeführt. In 30 min Abständen wurden 100 μ l Aliquots eines 500 μ l Reaktionsansatzes nach Methode C über eine analytische HPLC getrennt und alle eluierenden Verbindungen mit einer Thioxo-peptidbindung aufgefangen. Diese Fraktionen (je ca. 1.5 ml) wurden lyophilisiert, in 50 μ l ACN/H₂O (50/50) resuspendiert und massespektrometrisch analysiert.

Die IC₅₀-Werte der zyklischen Umwandlungsprodukte wurden mit 1 μ M (= 1/10 K_m) Ala-Pro-NH-Np als Substrat nach Methode A bestimmt.

5.4.4. Dipeptidylpeptidase II

5.4.4.1. Isolierung, Aufbewahrung und Aktivitätsbestimmung

Die Dipeptidylpeptidase II wurde aus Schweineniere isoliert und von Dr. Jens Rahfeld, Max-Planck Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“, freundlicherweise für die hier durchgeführten Experimente zur Verfügung gestellt. Die Enzymstammlösung wurde

aliquotiert und bei -20°C eingefroren, die Aktivität wurde über Ala-Pro-NH-Np als Referenzsubstrat ermittelt.

5.4.4.2. Puffer, Reaktionsbedingungen und Meßmethoden

Alle Messungen wurden in 100 mM Citrat-Puffer, pH 4.5 bzw. 5.5, bei 25°C ohne Lösungsmittelzusätze durchgeführt.

Die Versuche zur Hydrolyse des Derivates Ala-Pro-ψ[CS-NH]-NH-Np wurden bei pH 4.5 in Anwesenheit von ca. 5 nM Enzym spektroskopisch nach Methode A durchgeführt. Die Untersuchungen zur Hydrolyse und enzymkatalysierten Peptidsynthese von Ala-Pro-ψ[CS-NH]-Phe-NH-Np durch die DP II wurden mit gleicher DP II Konzentration bei pH 5.5 durch Langzeitinkubation über 24 h getätigt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz (100 µl) über eine analytische HPLC nach Methode C getrennt, und alle eluierenden Verbindungen mit einer Thioxopeptidbindung aufgefangen, lyophilisiert, in 50 µl ACN/H₂O (50/50) resuspendiert und massenspektrometrisch analysiert.

5.4.5. Prolyl oligopeptidase

5.4.5.1. Isolierung, Aufbewahrung und Aktivitätsbestimmung

Die POP wurde aus humaner Plazenta isoliert und von Dr. Grit Landgraf, Max-Planck Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“, freundlicherweise für die hier durchgeführten Experimente zur Verfügung gestellt. Die POP aus *Flavobacterium meningosepticum* war ein Produkt von Seikagaku Kogyo Inc. (Japan). Die Enzymstammlösungen der POP waren in 100 mM TRIS / 1 mM DTT, pH 7.5 gelöst, sie wurden aliquotiert und bei -20°C eingefroren, die Aktivität wurde über Suc-Ala-Pro-NH-Np als Referenzsubstrat ermittelt.

5.4.5.2. Puffer, Reaktionsbedingungen und Meßmethoden

Alle Messungen wurden in 100 mM TRIS / 1 mM DTT, pH 7.5 bei 30°C ohne Lösungsmittelzusätze durchgeführt.

Die POP hydrolysiert die Tetrapeptid-4-Nitroanilid-Derivate zu einem Tripeptid und einem Aminosäure-4-Nitroanilid. Da die Reaktion nicht mit spektralen Änderungen des Chromophors einhergeht, ist eine spektrometrische Verfolgung nicht möglich. Alternativ wurde eine diskontinuierliche HPLC-Methode entwickelt (Jakob, 1994). Es wurde eine Merck-Hitachi HPLC Anlage verwendet, ausgerüstet mit einem Autosampler und temperierbarem Probenblock, kombiniert mit einer analytischen Säule (Merck LiChrospher RP18 125 * 4 mm; 5µM). Als Eluent diente eine Mischung aus Acetonitril und 50 mM Phosphat, pH 3. Durch Variation des Acetonitrilgehaltes zwischen 30 und 40 % (isokratischer

Fluß) konnte für alle Derivate eine Trennung von Ausgangsverbindung und chromophorhaltigem Hydrolyseprodukt innerhalb einer Gesamtlaufzeit von 6 min erreicht werden.

In Abständen von 6, 12, 18, 24 und 30 min wurde eine Probe aus einem 200 µl Reaktionsansatz entnommen und aufgetrennt. Aus dem Verhältnis der Flächenintegrale läßt sich der prozentuale Umsatz zum Zeitpunkt der Probenahme berechnen. Da beide Molekülspezies bei der verwendeten Meßwellenlänge von 320 nm gleiche Extinktionskoeffizienten besitzen, war eine Korrektur der Prozentwerte nicht notwendig. Aus der Auftragung des prozentualen Umsatzes gegen die Zeit erhält man eine Gerade, aus deren Anstieg, multipliziert mit der Substratkonzentration, die Initialgeschwindigkeit ermittelt wird. Die Auswertung erfolgte wie unter Methode A beschrieben.

Die POP-Konzentration wurde so gewählt, daß 10% Umsatz über 30 min nicht überschritten wurden, sie betrug zwischen 33 nM und 3.3 µM im Ansatz.

Die K_i -Werte wurden mit Substratkonzentrationen von 0.25, 0.5, 1, 2 und 3.3 mM, entsprechend dem 0.45, 0.9, 1, 1.8, 3.6 und 6-fachen des K_m Wertes von Suc-Ala-Pro-NH-Np und Inhibitorkonzentrationen von 2.5, 5 und 7.5 µM für Ala-Gly-Pro-ψ[CS-NH]-Phe-NH-Np und 17, 34 und 51 µM für Ala-Ala-Pro-ψ[CS-NH]-Phe-NH-Np ermittelt. Die K_i -Werte und Hemmtypen wurde durch Dixon-Auftragung der Meßwerte bestimmt.

Die Hydrolyse von Suc-Ala-Pro-NH-Np wurde für beide Formen der POP spektrometrisch entsprechend Methode A verfolgt. Die Hydrolyse von Suc-Ala-Pro-ψ[CS-NH]-Np und dessen Eignung zur enzymkatalysierten Peptidsynthese wurden durch Langzeitinkubation (24 h, 25°C) mit anschließender analytischer HPLC und massespektrometrischer Analyse der Hydrolyseprodukte nach Methode C untersucht. Als Nucleophil wurden 50 mM Leu-NH₂ eingesetzt.

Die IC₅₀-Werte für die zyklischen Umwandlungsprodukte wurden mit 60 µM (= 1/10 K_m) Suc-Ala-Pro-NH-Np als Substrat entsprechend Methode A bestimmt.

5.4.6. Papain

5.4.6.1. Isolierung, Aufbewahrung und Aktivitätsbestimmung

Papain, kristallisiert aus *Papaya latex* ist ebenfalls kommerziell bei Sigma (Deisenhofen, Deutschland) erhältlich. Entsprechend dem Proteingehalt des Lyophilisates wurde eine 80 µM Stammlösung in 100 mM Phosphat, pH 6.5 hergestellt. Durch Zugabe von 5mM DTT und 5 mM EDTA wurde die Protease aktiviert. Die Enzymlösungen wurden an jedem Meßtag neu zubereitet und auf Eis aufbewahrt.

5.4.6.2. Puffer, Reaktionsbedingungen und Meßmethoden

Alle Messungen wurden in 100 mM Phosphat, pH 6.5 bei 25°C ohne Lösungsmittelzusätze durchgeführt.

Die Hydrolyse von Ala-Phe-Gly-NH-Np und dessen Thioxoderivaten wurde spektrometrisch entsprechend Methode **A** verfolgt. Die Enzymkonzentration im Ansatz betrug 8 µM. Die Eignung von Ala-Phe-Gly-ψ[CS-NH]-Np zur enzymkatalysierten Peptidsynthese wurde durch Langzeitinkubation (24 h, 25°C) mit anschließender analytischer HPLC und massespektrometrischer Analyse der Produkte nach Methode **C** untersucht. Die Proteasekonzentration betrug 4 µM. Die verwendeten Nucleophile sind im Ergebnisteil angegeben. Das doppelt thioxylierte Nonapeptid Ala-Phe-Gly-ψ[CS-NH]-Ala-Ala-Pro-Phe-ψ[CS-NH]-Gly-Gly wurde nach Methode **D** im präparativen Maßstab hergestellt.

5.4.7. Untersuchungen mit Cyclophilin und Thiopeptiden

Die Untersuchungen zur Wechselwirkung von Cyclophilin mit verschiedenen Thiopeptiden wurden durch Langzeitinkubation entsprechender Reaktionsansätze für 24h bei 25°C durchgeführt. Die Cyp-Konzentration betrug ca. 10 µM im Ansatz, die Thiopeptide hatten eine Endkonzentration von 200 µM. Als Puffer wurden 35 mM Hepes, pH 7.8 und 50 mM Natriumacetat, pH 5 verwendet. Die Additive Imidazol, His und Natriumazid wurden vor Verwendung als 10-fach konzentrierte Stammlösungen in den entsprechenden Puffern hergestellt und im Testansatz in einer Endkonzentration von 0.5 M zugesetzt. Die Gesamtreaktionsansätze betragen je 50 µl. Die Auswertung erfolgte nach den Methoden **B** und **C**.

5.5. Beschreibung der allgemeinen Meß- und Analysemethoden

5.5.1. Methode A - UV/VIS-spektroskopische Messung der kinetischen Konstanten

Die enzymkatalysierte Hydrolyse von Peptid- und Thiopeptid-4-Nitroanilid-Derivaten wurde spektrophotometrisch bei 390 nm verfolgt (ϵ_{390} : 11 800), im Falle von Derivaten mit einer Thioxyarylamidbindung (R-Xaa-ψ[CS-NH]-Np) war es auf Grund der in den langwelligen Bereich verschobenen Extinktion der Ausgangsverbindung (λ_{\max} : 344 nm) notwendig, bei höheren Wellenlängen zu detektieren. Es wurde, je nach Substratkonzentration, bei 410 nm (ϵ_{410} : 6 040), 430 nm (ϵ_{410} : 2 680) und 450 nm (ϵ_{410} : 725) gemessen. Dazu wurde ein M500 Spektrophotometer von ZEISS (Jena, Deutschland) verwendet, die Temperierung der Meßzelle erfolgte über einem Kryostaten von COLORA WK 14-1 DS (Lorach, Deutschland).

Die Messungen wurden in 100 µl Probenvolumen erfordernden Quarzglaszküvetten (d: 1 cm) durchgeführt. Die Reaktionsansätze setzten sich aus

90-x-y µl Puffer,

x µl Substrat und

10 µl Enzym

zusammen. Alle Lösungen wurden auf Eis aufbewahrt, die in die Küvette pipettierten Reaktionsansätze wurden in der Meßzelle 5 min äquilibriert, anschließend wurde durch Zugabe des Enzyms die Reaktion gestartet. Die Hydrolyse wurde über 1 min verfolgt, die Proteasekonzentration im Ansatz wurde so gewählt, daß der Umsatz innerhalb dieser Zeit 10% nicht überstieg. Aus dem durch lineare Regression berechneten Initialanstieg wurde, nach Multiplikation mit der Substratkonzentration, die Initialgeschwindigkeit für den Umsatz ermittelt. Die Auftragung der für verschiedene Substratkonzentrationen ermittelten Initialgeschwindigkeiten ergab einen hyperbolen Kurvenverlauf, die kinetischen Konstanten k_{cat} und K_m wurden durch nichtlineare Regression unter Verwendung der Michaelis-Menten Gleichung ermittelt. Zur Datenauswertung wurden das Programm „Sigma Plot“ (Jandel Inc.) verwendet.

Bei Substraten, deren Löslichkeit so weit unterhalb des K_m -Wertes des Enzyms lag, daß eine nichtlineare Regression der Datenpunkte nicht möglich war, wurde der Wert für k_{cat}/K_m an Hand des Anfangsanstieges des v/S Diagramms ermittelt. Wählt man eine Substratkonzentration, die mindestens 10-fach kleiner als der K_m Wert ist, so läßt sich die Michaelis-Menten Gleichung, unter Vernachlässigung von $[S_0]$ im Nenner, vereinfachen und umstellen:

Ausgehend von
$$v = \frac{V_{max} \cdot [S_0]}{K_m}$$

und nach Ersetzen von V_{max} durch $V_{max} = k_{cat} [E_0]$

resultiert die Gleichung
$$\frac{k_{cat}}{K_m} = \frac{v}{[S_0][E_0]}$$

Die Inhibierung der Hydrolyse wurde unter Verwendung des gleichen Meßgerätes gemessen. Ein Teil des Puffers wurde durch entsprechende Volumina an Inhibitorstammlösung im Reaktionsansatz ersetzt. Die IC_{50} -Werte wurden für 6 verschiedene Konzentrationen des potentiellen Inhibitors durch Doppelbestimmung ermittelt. Es wurden nur Meßwertpaare verwendet, die nicht mehr als 5% voneinander abwichen. Die Meßdaten wurden im Bereich von 10 bis 70 % Inhibierung aufgenommen. Die IC_{50} -Werte wurden unter der Bedingung $S_0 \ll K_m$ entsprechend der Gleichung

$$ki = ke / (1 + \frac{I_0}{IC_{50}})$$

berechnet, wobei k_e und k_i die Initialgeschwindigkeiten der Umsetzung in Ab- bzw. Anwesenheit des Inhibitors repräsentieren.

5.5.2. Methode B - HPCE Messungen

Für die HPCE Messungen wurde das High Throughput Capillary Electrophoresis System, Modell 270A-HT, von Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland) in Verbindung mit unbeschichteten Silica Kapillaren (72 cm * 50 μ m) verwendet. Als Laufpuffer diente 70 mM Na-citrat, pH 2.3. Folgende Geräteparameter wurden gewählt: Druckinjektion: 1s, Spannung: 30 kV, Stromstärke (resultierend): 21 μ A, Temperatur: 30°C, Laufzeit: 12 min bei kinetischen Messungen, 30 min bei qualitativer Analytik (Migrationszeit der Neutralfront unter diesen Bedingungen: ca. 25 min), Detektion: λ : 200 nm. Zwischen den Läufen wurde die Kapillare 1 min mit 100 mM NaOH und 2 min mit Laufpuffer gespült. Die Datenauswertung erfolgte computergestützt unter Verwendung der Software Kontron Instruments PC Integration Pack (Mailand, Italien).

5.5.3. Methode C - analytische HPLC Messungen

Für die analytischen HPLC-Analysen wurde eine mit einem schnellscannenden UV-Detektor ausgerüstete analytische HPLC (Sycam, Gilchingen) in Kombination mit MERCK Lichrospher RP18 Säulen (125*4 mm, 5 μ m) verwendet. Als Eluent dienten Acetonitril-Wasser Mischungen, die jeweils 0.05% TFA enthielten. Es wurde ein Gradient von 15 auf 60 % ACN über 45 min mit einem Fluß von 1 ml/min gefahren. Die Peakspektren wurden im Wellenlängenbereich von 220 bis 365 nm aufgenommen. Zur Datenauswertung wurde das zum Gerät gehörende Software-Paket von Sycam verwendet.

5.5.4. Methode D - Enzymkatalysierte Synthese von Thioxozeptiden

Analytischer Maßstab: Es wurden Reaktionsmischungen mit einem Gesamtvolumen von 1 ml bereitet, die 0.5 bis 1 mM des Thioxoarylamids (Ala-Ala-Pro-Phe- ψ [CS-NH]-Np, Ala-Phe-Gly- ψ [CS-NH]Np), 20 bis 50 mM Nucleophil und 0.5 bis 5 μ M Protease enthielten. Diese Reaktionsansätze wurden zwischen 4 und 24 h bei 25°C inkubiert. Die Hydrolyse wurde diskontinuierlich an Hand des freigesetzten 4-Nitroanilins bei 390 nm spektrophotometrisch verfolgt. Nach Ablauf der Reaktion wurden die Proben über Millipore C18-light Kartuschen entsalzt, mit ACN eluiert und mittels HPCE, analytischer HPLC und Elektrospray-Massespektrometrie analysiert.

Präparativer Maßstab: 40 mg des Thioxoarylamides (c: 1 mM) wurden in 35 mM Hepes, pH 7.8 gelöst, anschließend Nucleophil und Protease bis zu einer Endkonzentration von 50 mM bzw. 2 μ M zugesetzt. Nach Ablauf der Reaktion über 20 h bei 25°C wurde der gesamte Reaktionsansatz (ca.70 ml) lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in 5 ml ACN/H₂O (20/80)

resuspendiert, filtriert und über eine präparative HPLC (Sycam, Gilchingen), ausgerüstet mit einer präparativen RP18 HPLC-Säule (25 * 250 mm, 7 µM) getrennt. Überschüssiges Nucleophil, Hydrolyse- und Syntheseprodukte eluierten in einem Acetonitril Gradienten von 20 bis 60 % über 60 min bei einem Fluß von 7 ml/min. Die eluierenden Fraktionen wurden nach den Methoden **B** und **C** analysiert, die Thioxozeptidfraktionen wurden nach entfernen des Acetonitrils am Rotationsverdampfer lyophilisiert und mittels Elektrospray-Massespektrometrie und NMR untersucht.

5.5.5. Methode E - CD-Messungen

Für diese Untersuchungen wurde das CD-Spektropolarimeter J-710 der Firma Jasco (Groß Umstadt, Deutschland) verwendet. Die Proben für CD-spektroskopische Messungen wurden in 10 mM Phosphat, pH 2 bzw. pH 7.5 gelöst, und bei den jeweils angegebenen Temperaturen (s. Ergebnisteil Kap.2.1) untersucht. Bei den Experimenten am Ala-ψ[CS-N]-Pro wurden 1 bzw. 2 mM des Thioxozeptides im Meßansatz verwendet, die Endkonzentration Ala-Gly-ψ[CS-N]-Pro-Phe-NH-Np nach 1:100 Verdünnung aus DMSO betrug 0.5 mM.

Die Spektren wurden mit 1mm CD-Küvetten bei der jeweils angegebenen Temperatur im Wellenlängenbereich von 190 bis 390 nm aufgenommen. Die Meßkammer wurde 3 min vor und während der Messungen mit 3 l/min N₂ (5.0) gespült. Es wurden jeweils 8-16 Akkumulationen mit einer Geschwindigkeit von 100-200 nm/min bei einer Response-Zeit von 0.5 s durchgeführt, die Rohdaten wurden nach Subtraktion der Pufferspektren mittels Fourier-Transformation geglättet.

Die kinetischen CD-Messungen wurden bei konstanter Wellenlänge mit variablen Meßzeiten (s. Ergebnisteil Kap.2.1) durchgeführt. Die Response-Zeit betrug zwischen 1 und 4 s bei einem Datenintervall von 2-10 s. Die k_{obs} -Werte der Isomerisierung wurden durch eine I.Ordnungsregression gemäß

$$A = A_0 \times e^{-k \cdot t} + C \quad \text{bei Abnahme des Meßsignals bzw.}$$

$$A = A_0 \times (1 - e^{-k \cdot t}) + C \quad \text{bei Zunahme des Meßsignals}$$

ermittelt, wobei A der Meßwert für die Elliptizität $[\Theta]$ zum Zeitpunkt t, A_0 die Gesamtamplitude der Isomerisierung und C die Verschiebung der I.Ordnungsfunktion auf der $[\Theta]$ -Achse darstellt. Die kinetischen Messungen zur punktweisen Bestimmung der CD-Spektren von Ala-Pro nach dem pH-Sprung und vor Beginn der Isomerisierung (vgl.Kap.2.2.) wurden genau 2 min nach dem Mischen der Komponenten gestartet. Die Werte für $[\Theta]_{t=0}$ entsprachen bei Abnahme des Meßsignals der Summe $A_0 + C$, bei Zunahme des Meßsignals war $[\Theta]_{t=0} = C$.

Literaturverzeichnis:

- Abbond JLM.** Roussel C. Gentric E. Sradi K. Lauransan J. Guiheneuf G. Kamlet MJ. Taft R. Studies on amphiprotic compounds 3. Hydrogen-binding basicity of oxygen and sulfur compounds. *Journal of Organic Chemistry* 53(7): 1545-1550, 1988
- Abbond JLM.** Mo O. dePaz JLG. Yanez M. Esseffar M. Bouab W. Mouhtadi ME. Moklisse R. Ballesteros E. Herreros M. Homan H. Lopez-Mardomingo C. Notario R. Thiocarbonyl versus Carbonyl Compounds: A comparison of intrinsic reactivities. *Journal of the American Chemical Society*. 115: 12468-12476, 1993
- Abrahamsen L.** Tom J. Burnier J. Butcher KA. Kossiakoff A. Wells JA. Engineering subtilisin and its substrates for efficient ligation of peptide bonds in aqueous solution. *Biochemistry*. 30: 4151-4159, 1991
- Alber T.** Sun D P. Wilson K. Wozniak J A. Cook S P. Matthews B W. Contributions of hydrogen bonds of threonine 157 to the thermodynamic stability of phage t4 lysozyme. *Nature*. 330 (6143). 41-46. 1987.
- Almond HR.** Manning DT. Niemann C. Interaction of α -chymotrypsin with several α -methyl- α -acylamino acid methyl esters. *Biochemistry*. 1: 243ff., 1962
- Angus RH.** Carey PR. Lee H. Storer AC. Conformational activation of acylpapains and acylcathepsin B's: resonance Raman and kinetic evidence. *Biochemistry*. 25(11):3304-10, 1986 Jun 3.
- Angus RH.** Lee H. Storer AC. Carey PR. Conformational variability in an enzyme's active site: resonance Raman evidence for different acyl group conformations in N-acylglycine and N-acylalanine dithioacyl papains. *Biochemistry*. 27(1):258-63, 1988 Jan 12.
- Angyal R.** Strbak V. Alexandrova M. Kruszynski M. TRH analogue with C-terminal thioamide group: rapid degradation by plasma and its biological effects. *Endocrinologia Experimentalis*. 19(4):213-9, 1985 Dec.
- Asboth B.** Polgar L. Transition-state stabilization at the oxyanion binding sites of serine and thiol proteinases: hydrolyses of thiono and oxygen esters. *Biochemistry*. 22(1):117-22, 1983 Jan 4.
- Asboth B.** Majer Z. Polgar L. Cysteine proteases: the S2P2 hydrogen bond is more important for catalysis than is the analogous S1P1 bond. *FEBS Letters* 233(2) 339-341, 1988 June
- Ashworth DM. (a)** Atrash B. Baker GR. Baxter AJ. Jenkins PD. Jones DM. Szelke M. 2-cyanopyrrolidides as potent, stable inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 6(10):1163-1166, 1996 May 21.
- Ashworth DM. (b)** Atrash B. Baker GR. Baxter AJ. Jenkins PD. Jones DM. Szelke M. 4-cyanothiazolidides as very potent, stable inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 6(22):2745-2748, 1996 Nov
- Baca M.** Kent SB. Catalytic contribution of flap-substrate hydrogen bonds in "HIV-1 protease" explored by chemical synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90(24):11638-42, 1993 Dec
- Baggio R.** Shi YQ. Wu YQ. Abeles RH. From poor substrates to good inhibitors - design of inhibitors for serine and thiol proteases. *Biochemistry*. 35(11):3351-3353, 1996 Mar 19.
- Ballinger MD.** Tom J. Wells JA. Designing subtilisin bpn' to cleave substrates containing dibasic residues. *Biochemistry*. 34(41):13312-13319, 1995 Oct 17.
- Ballinger MD.** Tom J. Wells JA. Furlisin - a variant of subtilisin BPN' engineered for cleaving tribasic substrates. *Biochemistry*. 35(42):13579-13585, 1996 Oct 22.
- Bardi R.** Piazzesi A M. Toniolo C. Jensen O E. Omar R S. Senning A. Molecular and crystal structures of three monothiated analogues of the terminally blocked ala-aib-ala sequence of peptaibol antibiotics. *Biopolymers* 27 (5). 747-762. 1988.
- Barrett J.** Deghaidy FS. *Spectrochim. Acta*. Part A: 31: 707-713, 1975
- Barrett AJ.** Rawlings ND. Oligopeptidases and the emergence of the prolyl oligopeptidase family. *Biol.Chem. Hoppe-Seyler*. 373: 353-360, 1992 Jul.
- Barrett AJ.** Rawlings ND. Families and clans of serine peptidases. [Review] *Archives of Biochemistry & Biophysics*. 318(2):247-50, 1995 Apr 20.
- Barth A.** Schulz H. Neubert K. Studies on the purification and characterization of dipeptidyl aminopeptidase IV. *Acta Biologica et Medica Germanica*. 32(2-3):157-74, 1974.
- Barth A.** Oehme P. *Beiträge zur Wirkstoffforschung*. Vol.11 Oehme P. Lowe H. Gores E. Eds. Friedrichsfelde, Berlin, 1981
- Barth A.** Heins J. Fischer G. Neubert K. Schneeweiss B. *Wiss. Beitr. Martin-Luther-Univ. Halle-Wittenberg* (Mol. Cell. Regul. Enzyme Act., Pt1). 46: 297-339, 1984

- Bartlett PA.** Spear KL. Jacobsen NE. A thioamide substrate of carboxypeptidase A. *Biochemistry*. 21(7):1608-11, 1982 Mar 30.
- Bauer CA.** The active centers of *Streptomyces griseus* protease 3 and alpha-chymotrypsin. Enzyme-substrate interactions beyond subsite S'1. *Biochimica et Biophysica Acta*. 438(2):495-502, 1976 Jul 8.
- Bauer CA. (a)** Thompson RC. Blout ER. The active centers of *Streptomyces griseus* protease 3, alpha-chymotrypsin, and elastase: enzyme-substrate interactions close to the scissile bond. *Biochemistry*. 15(6):1296-9, 1976 Mar 23.
- Bauer CA. (b)** Thompson RC. Blout ER. The active centers of *Streptomyces griseus* protease 3 and alpha-chymotrypsin: enzyme-substrate interactions remote from the scissile bond. *Biochemistry*. 15(6):1291-5, 1976 Mar 23.
- Bauer CA.** Active centers of α -chymotrypsin and of *Streptomyces griseus* protease 1 and 3. S2-P2 Enzyme-Substrate Interactions. *European Journal of Biochemistry*. 105: 565-570, 1980
- Baumann WK.** Bizzozero SA. Dutler H. Kinetic investigation of the alpha-chymotrypsin-catalyzed hydrolysis of peptide substrates. The relationship between peptide-structure N-terminal to the cleaved bond and reactivity. *European Journal of Biochemistry*. 39(2):381-91, 1973 Nov 15.
- Beattie RE.** Elmore DT. Williams CH. Guthrie DJ. The behaviour of leucine aminopeptidase towards thionopeptides. *Biochemical Journal*. 245(1):285-8, 1987 Jul 1.
- Beckpiotraschke K.** Jakubke HD. Protease-catalysed synthesis of peptides containing histidine and lysine. *Tetrahedron-Asymmetry*. 9(9):1505-1518, 1998 May 8.
- Bender ML.** Begue-Canton ML. Blakeley RL. Brubacher LJ. Feder J. Gunter CR. Kezdy FJ. Killheffer JV Jr. Marshall TH. Miller CG. Roeske RW. Stoops JK. The determination of the concentration of hydrolytic enzyme solutions: alpha-chymotrypsin, trypsin, papain, elastase, subtilisin, and acetylcholinesterase. *Journal of the American Chemical Society*. 88(24):5890-913, 1966 Dec 20.
- Bender ML.** Kezdy FJ. Mechanism of action of proteolytic enzymes. *Annual Review of Biochemistry*. 49-76, 1967.
- Benkovic SJ.** Catalytic antibodies. [Review] *Annual Review of Biochemistry*. 61:29-54, 1992.
- Benkovic SJ.** Antibody catalysis. The key is in the pocket. *Nature*. 383(6595):23-4, 1996 Sep 5.
- Bergmann M.** Fruton JS. *Journal of Biological Chemistry*. 118: 405ff., 1938
- Berti PJ.** Faerman CH. Storer AC. Cooperativity of papain-substrate interaction energies in the S2 to S2' subsites. *Biochemistry*. 30(5):1394-402, 1991 Feb 5.
- Bertrand JA.** Oleksyszyn J. Kam CM. Boduszek B. Presnell S. Plaskon RR. Suddath FL. Powers JC. Williams LD. Inhibition of trypsin and thrombin by amino(4-amidinophenyl)methanephosphonate diphenyl ester derivatives: x-ray structures and molecular models. *Biochemistry*. 35(10):3147-55, 1996 Mar 12.
- Bizzozero SA.** Zweifel BO. The importance of the conformation of the tetrahedral intermediate for the alpha-chymotrypsin-catalyzed hydrolysis of peptide substrates. *FEBS Letters*. 59(1):105-8, 1975 Nov 1.
- Bizzozero SA.** Dutler H. *Bioorg. Chem.* 10: 46-62, 1981
- Bizzozero SA.** Baumann WK. Dutler H. Kinetic investigation of the alpha-chymotrypsin-catalyzed hydrolysis of peptide substrates. The relationship between the peptide structure C-terminal to the cleaved bond and reactivity. *European Journal of Biochemistry*. 122(2):251-8, 1982 Feb.
- Blow DM.** The structure of chymotrypsin. In Boyer PD: *The Enzymes*. Third edition. Volume III (Hydrolysis) 185-212; Academic Press New York and London, 1971
- Blumberg S.** Teichberg VI. Charli JL. Hersh LB. McKelvy JF. Cleavage of substance P to an N-terminal tetrapeptide and a C-terminal heptapeptide by a post-proline cleaving enzyme from bovine brain. *Brain Research*. 192(2):477-86, 1980 Jun 23.
- Bode W.** Papamokos E. Musil D. The high-resolution X-ray crystal structure of the complex formed between subtilisin Carlsberg and eglin c, an elastase inhibitor from the leech *Hirudo medicinalis*. Structural analysis, subtilisin structure and interface geometry. *European Journal of Biochemistry*. 166(3):673-92, 1987 Aug 3.
- Bode W.** Papamokos E. Musil D. Seemueller U. Fritz H. Refined 1.2 Å crystal structure of the complex formed between subtilisin Carlsberg and the inhibitor eglin c. Molecular structure of eglin and its detailed interaction with subtilisin. *EMBO Journal*. 5(4):813-8, 1986 Apr.
- Bond JS.** Butler PE. Intracellular proteases. [Review] *Annual Review of Biochemistry*. 56:333-64, 1987.
- Bondi A.** van der Waals volumes and radii. *J.Phys.Chem.* 68: 441-451, 1964

- Bongers J.** Heimer EP. Recent applications of enzymatic peptide synthesis. [Review] *Peptides*. 15(1):183-93, 1994 Jan.
- Bordusa F.** Ullmann D. Elsner C. Jakubke HD. Substrate mimetic mediated peptide synthesis - an irreversible ligation strategy that is independent of substrate specificity. *Angewandte Chemie. International Ed. in English*. 36(22):2473-2475, 1997 Dec 1.
- Bou-Gharios G.** Osman J. Atherton A. Monaghan P. Vancheeswaran R. Black C. Olsen I. Expression of ectopeptidases in scleroderma. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 54(2):111-116, 1995 Feb.
- Brandt W.** Ludwig O. Thondorf I. Barth A. A new mechanism in serine proteases catalysis exhibited by dipeptidyl peptidase IV (DP IV): Results of PM3 semiempirical thermodynamic studies supported by experimental results. *European Journal of Biochemistry* 236(1). 109-114. 1996.
- Braxton S.** Wells JA. The importance of a distal hydrogen bonding group in stabilizing the transition state in subtilisin BPN'. *Journal of Biological Chemistry*. 266(18):11797-800, 1991 Jun 25.
- Brenner S.** The molecular evolution of genes and proteins: a tale of two serines. *Nature*. 334(6182):528-30, 1988 Aug 11.
- Briggs GE.** Haldane JBS. A note on the kinetics of enzyme action. *Biochem.J.* 19; 338-339, 1925
- Brocklehurst K.** Carey PR. Lee HH. Salih E. Storer AC. Comparative resonance Raman spectroscopic and kinetic studies of acyl-enzymes involving papain, actinidin and papaya peptidase II. *Biochemical Journal*. 223(3):649-57, 1984 Nov 1.
- Bromme D.** Peters K. Fink S. Fittkau S. Enzyme-substrate interactions in the hydrolysis of peptide substrates by thermitase, subtilisin bpn', and proteinase K. *Archives of Biochemistry & Biophysics*. 244(2):439-46, 1986 Feb 1.
- Bromme D.** Klaus JL. Okamoto K. Rasnick D. Palmer JT. Peptidyl vinyl sulphones - a new class of potent and selective cysteine protease inhibitors - S2P2 specificity of human cathepsin O2 in comparison with cathepsins S and L. *Biochemical Journal*. 315(Part 1):85-89, 1996 Apr 1.
- Bromme D.** Bonneau PR. Purisima E. Lachance P. Hajnik S. Thomas DY. Storer AC. Contribution to activity of histidine-aromatic, amide-aromatic, and aromatic-aromatic interactions in the extended catalytic site of cysteine proteinases. *Biochemistry*. 35(13):3970-3979, 1996 Apr 2.
- Brown DW.** Campbell MM. Walker CV. Endothiopeptides. *Tetrahedron* 39(7): 1075-1083, 1983
- Bruice PY.** Mautner HG. Intramolecular catalysis and the involvement of tetrahedral intermediate partitioning in the hydrolysis of benzoylcholine, benzoylthionocholine and their dimethyl amino analogs. *Journal of the American Chemical Society* 95. 1582-1586. 1973.
- Bryan P.** Pantoliano MW. Quill SG. Hsiao HY. Poulos T. Site-directed mutagenesis and the role of the oxyanion hole in subtilisin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 83(11):3743-5, 1986 Jun.
- Callabaut C.** Krust B. Jacotot E. Hovanessian AG. T cell activation antigen CD26 as a cofactor for entry of HIV in CD4+ cells. *Science*. 264: 1159-1160, 1993
- Campbell P.** Lapinskas BA. Aminolysis of thioesters. *Journal of the American Chemical Society* 99 (16). 5378-5382. 1976
- Campbell P.** Nashed NT. Carboxypeptidase A catalyzed hydrolysis of thiopeptide and thioester analogues of specific substrates. An effect on kcat for peptide, but not ester substrates. *Journal of the American Chemical Society* 104 (19). 5221-5226.1982.
- Carafoli E.** Molinari M. Calpain - a protease in search of a function. [Review] *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 247 (2): 193-203, 1998
- Carey PR.** Carriere RG. Phelps DJ. Schneider H. Charge effects in the active site of papain: resonance Raman and absorption evidence for electron polarization occurring in the acyl group of some acylpapains. *Biochemistry*. 17(6):1081-7, 1978 Mar 21.
- Carey PR.** Ozaki Y. Storer AC. Comparison of the substrate conformations in the active sites of papain, chymopapain, ficin and bromelain by resonance Raman spectroscopy. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 117(3):725-31, 1983 Dec 28.
- Carey PR.** Angus RH. Lee HH. Storer AC. Identity of acyl group conformations in the active sites of papain and cathepsin B by resonance Raman spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry*. 259(23):14357-60, 1984 Dec 10.
- Carey PR.** Storer AC. Characterization of transient enzyme-substrate bonds by resonance Raman spectroscopy. *Annual Review of Biophysics & Bioengineering*. 13:25-49, 1984.
- Carter P.** Wells JA. Dissecting the catalytic triad of a serine protease. *Nature*. 332(6164):564-8, 1988 Apr 7.

- Cassidy CS.** Lin J. Frey PA. A new concept for the mechanism of action of chymotrypsin - the role of the low-barrier hydrogen bond. *Biochemistry*. 36(15):4576-4584, 1997 Apr 15.
- Cerovsky V. (a)** Jakubke HD. Enzymatic approach to the synthesis of taurine-containing peptides. *International Journal of Peptide & Protein Research*. 44(5):466-471, 1994
- Cerovsky V. (b)** Jakubke HD. Peptide synthesis catalyzed by crosslinked alpha-chymotrypsin in water dimethylformamide solvent system. *Biocatalysis*. 11(3):233-240, 1994.
- Cerovsky V. (c)** Jakubke HD. Acyl transfer reactions catalyzed by native and modified alpha-chymotrypsin in acetonitrile with low water content. *Enzyme & Microbial Technology*. 16(7):596-601, 1994
- Cerovsky V.** Jakubke HD. Nucleophile specificity of subtilisin in an organic solvent with low water content - investigation via acyl transfer reactions. *Biotechnology & Bioengineering*. 49(5):553-558, 1996 Mar 5.
- Chang T K.** Jackson D Y. Burnier J P. Wells J A. Subtiligase: A tool for semisynthesis of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (26). 12544-12548. 1994.
- Chang TK.** Chiang Y. Guo HX. Kresge AJ. Mathew L. Powell MF. Wells JA. Solvent isotope effects in H₂O-D₂O mixtures (proton inventories) on serine-protease-catalyzed hydrolysis reactions - influence of oxyanion hole interactions and medium effects. *Journal of the American Chemical Society*. 118(37):8802-8807, 1996 Sep 18.
- Chappell MC.** Tallant E A. Brosnihan K B. Ferrario C M. Processing of angiotensin peptides by ng108-15 neuroblastoma x glioma hybrid cell line. *Peptides (Elmsford)* 11 (2). 375-380. 1990.
- Chasan R.** Anderson KV. The role of easter, an apparent serine protease, in organizing the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo. *Cell*. 56(3):391-400, 1989 Feb 10.
- Chen ST.** Tu CC. Chen SY. Huang HC. Wang KT. Investigating the S-2 subsite selectivity of alkaline proteases in hydrolysis of diastereo-peptide esters and molecular-modeling interpretation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 1(5):361-7, 1993 Nov.
- Chiang Y.** Kresge AJ. Chang TK. Powell MF. Wells JA. Solvent isotope effects on a hydrolysis reaction catalysed by subtilisin and its N155G mutant - failure of the proton inventory method to report hydrogen-bonding interactions in the oxyanion hole. *Journal of the Chemical Society - Series Chemical Communications*. (15):1587-1588, 1995 Aug 7.
- Chikuma T.** Hama T. Nagatsu T. Kumegawa M. Kato T. Purification and properties of dipeptidyl peptidase IV from human urine. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 371 (4). 325-330. 1990.
- Christensen U.** Ipsen HH. Steady-state kinetics of plasmin- and trypsin-catalysed hydrolysis of a number of tripeptide-p-nitroanilides. *Biochimica et Biophysica Acta*. 569(2):177-83, 1979 Aug 15.
- Cleland WW.** Kreevoy MM. Low-barrier hydrogen bonds and enzymic catalysis. *Science*. 264(5167):1887-90, 1994 Jun 24.
- Cleland WW.** Kreevoy MM. On low barrier hydrogen bonds and enzyme catalysis. *Science*. 269: 104, 1995
- Cornish VW.** Mendel D. Schultz PG. Probing protein structure and function with an expanded genetic code [review]. *Angewandte Chemie*. International Ed. in English. 34(6):621-633, 1995 Mar 31.
- Coutts SJ.** Kelly TA. Snow RJ. Kennedy CA. Barton RW. Adams J. Krolikowski DA. Freeman DM. Campbell SJ. Ksiazek JF. Bachovchin WW. Structure-activity relationships of boronic acid inhibitors of dipeptidyl peptidase IV .1. Variation of the p-2 position of x(aa)-boropro dipeptides. *Journal of Medicinal Chemistry*. 39(10):2087-2094, 1996 May 10.
- Coux O.** Tanaka K. Goldberg AL. Structure and functions of the 20s and 26s proteasomes [Review]. *Annual Review of Biochemistry*. 65:801-847, 1996.
- Craik CS.** Roczniak S. Largman C. Rutter WJ. The catalytic role of the active site aspartic acid in serine proteases. *Science*. 237(4817):909-13, 1987 Aug 21.
- Cunningham DF.** Oconnor B. Proline specific peptidases [Review]. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure & MolecularEnzymology*. 1343(2):160-186, 1997 Dec 5.
- Cunningham DF.** Oconnor B. A study of prolyl endopeptidase in bovine serum and its relevance to the tissue enzyme. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 30(1):99-114, 1998 Jan.
- Dahlen JR.** Foster DC. Kisiel W. Human proteinase inhibitor 9 (p19) is a potent inhibitor of subtilisin A. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 238(2):329-333, 1997 Sep18.
- David F.** Bernard A M. Pierres M. Marguet D. Identification of serine-624 aspartic acid-702 and histidine 734 as the catalytic triad residues of mouse dipeptidyl-peptidase IV CD26 a member of a novel family of nonclassical serine hydrolases. *Journal of Biological Chemistry* 268 (23). 1993. 17247-17252.

- Davie EW.** Fujikawa K. Kisiel W. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. [Review] *Biochemistry*. 30(43):10363-70, 1991 Oct 29.
- Demeester I.** Belyaev A. Lambeir AM. Demeyer GRY. Vanosselaer N. Haemers A. Scharpe S. Vivo inhibition of dipeptidyl peptidase IV activity by pro-pro-diphenyl-phosphonate (prodipine). *Biochemical Pharmacology*. 54(1):173-179, 1997 Jul 1.
- Demuth HU.** Heins J. Fujihara H. Mordy C W. Barth A. Schowen R L. Molecular interactions in intermediate and transition states in the self-stimulated inhibition of enzymes. *Pharmazie* 43 (4). 262-264. 1988.
- Demuth HU.** Schonlein C. Barth A. Potent and selective inactivation of proteinases with N-peptidyl-O-acylhydroxylamines. *Biochimica et Biophysica Acta*. 996(1-2):19-22, 1989 Jun 13.
- Derewenda ZS.** Derewenda U. Kobos PM. (His)C epsilon-H...O=C < hydrogen bond in the active sites of serine hydrolases. *Journal of Molecular Biology*. 241(1):83-93, 1994 Aug 5.
- Dery O.** Corvera CU. Steinhoff M. Bunnett NW. Proteinase-activated receptors - novel mechanisms of signaling by serine proteases [Review] *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 43(6):C1429-C1452, 1998 Jun.
- DeSantis G.** Berglund P. Stabile MR. Gold M. Jones JB. Site-directed mutagenesis combined with chemical modification as a strategy for altering the specificity of the s-1 and s-1' pockets of subtilisin bacillus lentus. *Biochemistry*. 37(17):5968-5973, 1998 Apr 28.
- Dong RP.** Kameoka J. Hegen M. Tanaka T. Xu XH. Schlossman SF. Morimoto C. Characterization of adenosine deaminase binding to human cd26 on t cells and its biologic role in immune response. *Journal of Immunology*. 156(4):1349-1355, 1996 Feb 15
- Doran JD.** Carey PR. Alpha-helix dipoles and catalysis - absorption and raman spectroscopic studies of acyl cysteine proteases. *Biochemistry*. 35(38):12495-12502, 1996 Sep 24.
- Drenth J.** Jansonius JN. Koekoek R. Swen HM. Wolthers BG. Structure of papain. *Nature*. 218(45):929-32, 1968 Jun 8.
- Drenth J.** Jansonius JN. Koekoek R. Wolthers BG. The structure of papain. [Review] *Advances in Protein Chemistry*. 25:79-115, 1971.
- Drenth J.** Kalk KH. Swen HM. Binding of chloromethyl ketone substrate analogues to crystalline papain. *Biochemistry*. 15(17):3731-8, 1976 Aug 24.
- Dudeck EP.** Dudeck G. The proton magnetic resonance spectra of thiocarboxamides. *J.Org.Chem*. 32: 823-824, 1967
- Dufour E. (a)** Storer AC. Menard R. Engineering nitrile hydratase activity into a cysteine protease by a single mutation. *Biochemistry*. 34(50):16382-16388, 1995 Dec 19.
- Dufour E. (b)** Storer AC. Menard R. Peptide aldehydes and nitriles as transition state analog inhibitors of cysteine proteases. *Biochemistry*. 34(28):9136-9143, 1995 Jul 18.
- Eichhorn U.** Beck-Piotraschke K. Schaaf R. Jakubke HD. Solid-phase acyl donor as a substrate pool in kinetically controlled protease-catalysed peptide synthesis. *Journal of Peptide Science*. 3(4):261-6, 1997 Jul-Aug.
- Ermiler U.** Grabarse W. Shima S. Goubeaud M. Thauer RK. Crystal structure of methyl-coenzyme M reductase: The key of biological methane formation. *Science*. 278: 1457-1462. 1997 Nov.
- Estrada S.** Nycander M. Hill NJ. Craven CJ. Waltho JP. Bjork I. The role of Gly-4 of human cystatin a (Stefin a) in the binding of target proteinases - characterization by kinetic and equilibrium methods of the interactions of cystatin a Gly-4 mutants with papain, cathepsin b, and cathepsin l *Biochemistry*. 37(20):7551-7560, 1998 May 19.
- Fan H.** Meng WM. Kilian C. Grams S. Reutter W. Domain-specific n-glycosylation of the membrane glycoprotein dipeptidylpeptidase IV (cd26) influences its subcellular trafficking, biological stability, enzyme activity and protein folding. *European Journal of Biochemistry*. 246(1):243-251, 1997 May 15.
- Fersht AR.** Shi JP. Knill-Jones J. Lowe DM. Wilkinson AJ. Blow DM. Brick P. Carter P. Waye MM. Winter G. Hydrogen bonding and biological specificity analysed by protein engineering. *Nature*. 314(6008):235-8, 1985 Mar 21-27.
- Fischer J.** Lange L. Jakubke HD. Enzymatic attack on immobilized substrates. 2. Diffusional limitations in the α -chymotrypsin catalyzed hydrolysis of polyacrylamide-bound l-phenylalanine 4-nitroanilide. *European Journal of Biochemistry*. 88(2): 453-457, 1978 Aug.
- Fischer G.** & Barth A. Kinetische Untersuchungen der Peptidhydrolyse durch Dipeptidyl-Peptidase IV - Ein Beitrag zum Katalysemechanismus der Serinproteasen. In: Oehme P. Löwe H. Göres E.: *Beiträge zur Wirkstoffforschung, Heft Nr.11. Akademie-Industrie-Komplex Arzneimittelforschung*. 105-133, 1981

- Fischer G. (a)** Demuth HU. Barth A. N,O-diacylhydroxylamines as enzyme-activated inhibitors for serine proteases. *Pharmazie*. 38(4):249-50, 1983 Apr.
- Fischer G. (b)** Heins J. Barth A. The conformation around the peptide bond between the P1- and P2-positions is important for catalytic activity of some proline-specific proteases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 742(3):452-62, 1983 Feb 15.
- Fischer G.** Bang H. Mech C. Determination of enzymatic catalysis for the *cis-trans*-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides. *Biomedica Biochimica Acta*. 43(10):1101-11, 1984.
- Fischer G.** Berger E. Bang H. Kinetic beta deuterium isotope effects suggest a covalent mechanism for the protein folding enzyme peptidylprolyl *cis-trans* isomerase. *FEBS Letters* 250 (2). 1989. 267-270.
- Fischer G.** Über Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen und ihre Effektoren. *Angewandte Chemie*.106: 1479-1501, 1994
- Foje KL.** Hanzlik RP. Peptidyl thioamides as substrates and inhibitors of papain, and as probes of the kinetic significance of the oxyanion hole. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. 1201(3):447-453, 1994 Dec15.
- Freer ST.** Kraut J. Robertus JD. Wright HT. Xuong NH. Chymotrypsinogen: 2.5-angstrom crystal structure, comparison with alpha-chymotrypsin, and implications for zymogen activation. *Biochemistry*. 9(9):1997-2009, 1970 Apr 28.
- Frey PA.** Whitt SA. Tobin JB. A low-barrier hydrogen bond in the catalytic triad of serine proteases. *Science*. 264(5167):1927-30, 1994 Jun 24.
- Frey PA.** On low barrier hydrogen bonds and enzyme catalysis. *Science*. 269: 104-106, 1995
- Friedman TC.** Orlowski M. Wilk S. Prolyl endopeptidase: inhibition in vivo by N-benzyloxycarbonyl-prolyl-prolinal. *Journal of Neurochemistry*. 42(1):237-41, 1984 Jan.
- Frohman LA.** Downs TR. Heimer EP. Felix AM. Dipeptidylpeptidase IV and trypsin-like enzymatic degradation of human growth hormone-releasing hormone in plasma. *J.Clin.Invest*. 83: 1533-1540, 1989
- Fukasawa KM.** Fukasawa K. Harada M. Dipeptidyl- aminopeptidase IV, a glycoprotein from pig kidney. *Biochim. Biophys. Acta* 535: 161-166, 1978
- Fülöp V.** Bocskei Z. Polgar L. Prolyl oligopeptidase - an unusual beta-propeller domain regulates proteolysis. *Cell*. 94(2):161-170, 1998 Jul 24.
- Galla HJ.** Spektroskopische Methoden für Biochemiker. Georg Thieme Verlag Stuttgart – New York, 1988
- Garcia-Echeverria C.** Rich DH. Effect of p2' substituents on kinetic constants for hydrolysis by cysteine proteinases. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 187(2):615-9, 1992 Sep 16.
- Gerisch S.** Ullmann G. Stubenrauch K. Jakubke HD. Enzymatic peptide synthesis in frozen aqueous systems: influence of modified reaction conditions on the peptide yield. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*. 375(12):825-8, 1994 Dec.
- Glazer AN.** Smith EL. In Boyer PD: Papain and other plant sulfhydryl proteolytic enzymes. *The Enzymes*. Third edition. Volume III (Hydrolysis) 502-546; Academic Press New York and London, 1971
- Glendening ED.** Hrabal JA. Resonance in formamide and its chalcogen replacement analogues - a natural population analysis natural resonance theory viewpoint. *Journal of the American Chemical Society*. 119(52):12940-12946, 1997 Dec 31.
- Goldberg AL.** Akopian TN. Kisselev AF. Lee DH. Rohrwild M. New insights into the mechanisms and importance of the proteasome in intracellular protein degradation [Review]. *Biological Chemistry*. 378(3-4):131-140, 1997 Mar-Apr.
- Gololobov MYu (a).** Morozova IP. Vojushina TL. Timokhina EA. Stepanov VM. Subtilisin from *Bacillus subtilis* strain 72. The influence of substrate structure, temperature and pH on catalytic properties. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1118(3):267-76, 1992 Feb 1.
- Gololobov MYu. (b)** Voyushina TL. Stepanov VM. Adlercreutz P. Nucleophile specificity in alpha-chymotrypsin- and subtilisin-(*Bacillus subtilis* strain 72) catalyzed reactions. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1160(2):188-92, 1992 Nov 20.
- Goossens F.** Demeester I. Vanhoof G. Hendriks D. Vriend G. Scharpe S. The purification, characterization and analysis of primary and secondary-structure of prolyl oligopeptidase from human lymphocytes - evidence that the enzyme belongs to the alpha/beta hydrolase fold family. *European Journal of Biochemistry*. 233(2):432-441, 1995 Oct 15.
- Goossens F.** Demeester I. Vanhoof G. Scharpe S. Distribution of prolyl oligopeptidase in human peripheral tissues and body fluids. *European Journal of Clinical Chemistry & Clinical Biochemistry*. 34(1):17-22, 1996 Jan.
- Goossens F.** Vanhoof G. Demeester I. Augustyns K. Borloo M. Tourwe D. Haemers A. Scharpe S. Development and evaluation of peptide-based prolyl oligopeptidase inhibitors - introduction of n-benzyloxycarbonyl-prolyl-3-fluoropyrrolidine as a lead in inhibitor design. *European Journal of Biochemistry*. 250(1):177-183, 1997 Nov 15.

- Grathwohl C. (a)** Wütrich K. NMR studies of the molecular conformations in the linear oligopeptides H-(L-Ala)_n-L-Pro-OH. *Biopolymers*. 15: 2043-2057, 1976
- Grathwohl C. (b)** Wütrich K. The X-Pro peptide bond as an NMR probe for conformational studies of flexible linear peptides. *Biopolymers*. 15: 2025-2041, 1976
- Grathwohl C.** Wütrich K. NMR studies of the rates of proline *cis-trans* isomerization in oligopeptides. *Biopolymers*. 20: 2623-2633, 1981
- Grisaro V.** Sharon N. N-Benzoyloxycarbonyl amino acids as virtual substrates for papain. *Biochimica et Biophysica Acta*; 89, 152 (1964)
- Gron H.** Breddam K. Interdependency of the binding subsites in subtilisin. *Biochemistry*. 31(37):8967-71, 1992 Sep 22.
- Gron H.** Meldal M. Breddam K. Extensive comparison of the substrate preferences of two subtilisins as determined with peptide substrates which are based on the principle of intramolecular quenching. *Biochemistry*. 31(26):6011-8, 1992 Jul 7.
- Gutfreund H.** Sturtevant JM. *Biological Journal* 63; 656, 1956
- Hama T.** Okada M. Kojima K. Kato T. Matsuyama M. Nagatsu T. Purification of dipeptidyl- aminopeptidase IV from human kidney by anti-dipeptidyl- aminopeptidase IV affinity chromatography. *Mol. Cell. Biochem.* 43: 35-42, 1982
- Hänsler M.** Ullmann G. Jakubke HD. The application of papain, ficin and clostripain in kinetically controlled peptide synthesis in frozen aqueous solutions. *Journal of Peptide Science*. 1(5):283-7, 1995 Sep-Oct.
- Hänsler M (a).** Jakubke HD. Reverse action of hydrolases in frozen aqueous solutions. *Amino Acids*. 11(3-4):379-395, 1996.
- Hänsler M (b).** Jakubke HD. Nonconventional protease catalysis in frozen aqueous solutions. *Journal of Peptide Science*. 2: 279-289, 1996
- Hänsler M.** Gerisch S. Rettelbusch J. Jakubke HD. Application of immobilized α -chymotrypsin to peptide synthesis in frozen aqueous systems. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 68(2): 202-208, 1997
- Haensler M.** Jakubke HD. Endoproteinase pro-c-catalyzed peptide bond formation in frozen aqueous systems. *Enzyme & Microbial Technology*. 22(7):617-620, 1998 May 15.
- Harada M.** Fukasawa KM. Fukasawa K. Nagatsu T. Inhibitory action of proline containing peptides on Xaa-Pro-dipeptidylaminopeptidase. *Biochim. Biophys. Acta*. 705: 288-290, 1982
- Harada M.** Hiraoka BY. Fukasawa K M. Fukasawa K. Chemical modification of dipeptidyl peptidase IV EC-3.4.14.5 involvement of an essential tryptophan residue at the substrate binding site. *Archives of Biochemistry & Biophysics* 234 (2). 622-628. 1984.
- Hartke K.** New aspects of dithio and thiono esters. *Phosphorus, Sulfur and Silicon*. Vol.58. 223-253, 1991
- Hartley BS.** Kilby BA. *Biochemical Journal*. 56: 288ff., 1954
- Hartley BS.** Amino acid sequence of bovine chymotrypsinogen-A. *Nature*. 201: 1284ff., 1964
- Harwood VJ.** Denson JD. Robinsonbidle KA. Schreier HJ. Overexpression and characterization of a prolyl endopeptidase from the hyperthermophilic archaeon *pyrococcus furiosus*. *Journal of Bacteriology*. 179(11):3613-3618, 1997 Jun.
- Hedstrom L.** Szilagyi L. Rutter WJ. Converting trypsin to chymotrypsin: the role of surface loops. *Science*. 255(5049):1249-53, 1992 Mar 6.
- Heiduschka P.** Dittrich J. Barth A. Enzymatic peptide synthesis – a review. [Review]. *Pharmazie*. 45(3): 164-173, 1990
- Hegen M.** Kameoka J. Dong RP. Schlossman SF. Morimoto C. Cross-linking of cd26 by antibody induces tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinase. *Immunology*. 90(2):257-264, 1997 Feb.
- Heins J.** Welker P. Schoenlein C. Born I. Hartrodt B. Neubert K. Tsuru D. Barth A. Mechanism of proline-specific proteinases i. Substrate specificity of dipeptidyl peptidase IV from pig kidney and proline-specific endopeptidase from *flavobacterium-meningosepticum*. *Biochimica et Biophysica Acta* 954 (2). 161-169. 1988.
- Heinz DW.** Hyberts SG. Peng JW. Priestle JP. Wagner G. Grutter MG. Changing the inhibitory specificity and function of the proteinase inhibitor eglin c by site-directed mutagenesis: functional and structural investigation. *Biochemistry*. 31(37):8755-66, 1992 Sep 22.
- Henderson R.** Structure of crystalline alpha-chymotrypsin. IV. The structure of indoleacryloyl-alpha-chyotrypsin and its relevance to the hydrolytic mechanism of the enzyme. *Journal of Molecular Biology*. 54(2):341-54, 1970 Dec 14.

- Hersh LB.** McKelvy JF. Enzymes involved in the degradation of thyrotropin releasing hormone (TRH) and luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH) in bovine brain. *Brain Research*. 168(3):553-64, 1979 Jun 8.
- Hersh LB.** Immunological, physical, and chemical evidence for the identity of brain and kidney post-proline cleaving-enzyme. *Journal of Neurochemistry*. 37(1):172-8, 1981 Jul.
- Heymann E.** Mentlein R. Liver dipeptidyl aminopeptidase IV hydrolyzes substance P. *FEBS Letters*. 91(2):360-4, 1978 Jul 15.
- Hill CR.** Tomalin G. The kinetics of hydrolysis of some extended N-aminoacyl-L-phenylalanine methyl esters by bovine chymotrypsin A-alpha. Evidence for enzyme subsite S5. *Biochimica et Biophysica Acta*. 660(1):65-72, 1981 Jul 24.
- Hitotsuyanagi Y.** Matsumoto Y. Sasaki S. Suzuki J. Takeya K. Yamaguchi K. Itokawa H. Studies on rubia akane (ra) derivatives .10. Backbone transformation of ra-vii, an antitumour cyclic hexapeptide, through thionation - x-ray crystal structure of [tyr-3-psi(ch2nh)-ala-4]ra-vii. *Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions 1*. (14):1749-1755, 1996 Jul 21.
- Hol WG.** van Duijnen PT. Berendsen HJ. The alpha-helix dipole and the properties of proteins. *Nature*. 273(5662):443-6, 1978 Jun 8.
- Hollosi M.** Majer Z. Zewdu M. Ruff F. Kajtar M. Kover K E. Mixed intramolecular h-bonds of secondary thioamides. *Tetrahedron* 44 (1). 195-202. 1988.
- Homandberg GA.** Laskowski M. Enzymatic Resynthesis of the hydrolyzed peptide bond(s) in ribonuclease S. *Biochemistry*. 18(4): 586-592, 1979
- Hopsu-Havu VK.** Glenner GG. A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycyl-prolyl-beta-naphthylamide. *Histochemie*. 7(3):197-201, 1966.
- Houbart V.** Ribadeau-Dumas B. Chich JF. Synthesis of enterostatin-amide by the Xaa-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Lactococcus lactis subsp. lactis* N.C.D.O.763. *Biotechnol.Appl.Biochem*. 21: 149-159, 1995
- Imperiali B.** Abeles RH. Extended binding inhibitors of chymotrypsin that interact with leaving group subsites S1'-S3'. *Biochemistry*. 26(14):4474-7, 1987 Jul 14.
- Ishino T.** Ohtsuki S. Homma K. Natori S. cDNA cloning of mouse prolyl endopeptidase and its involvement in DNA synthesis by swiss 3t3 cells. *Journal of Biochemistry*. 123(3):540-545, 1998 Mar.
- Itoh K.** Sekizaki H. Toyota E. Fujiwara N. Tanizawa K. Application of inverse substrates to trypsin-catalyzed peptide synthesis. *Bioorganic Chemistry* 24(1). 59-68. 1996.
- Itoh K.** Sekizaki H. Toyota E. Tanizawa K. Methyltrypsin-catalyzed peptide coupling -comparison of alkyl ester and guanidinophenyl ester derivatives as acyl donor component. *Bioorganic Chemistry*. 25(5-6):307-319, 1997.
- Jackson SE.** Fersht AR. Contribution of long-range electrostatic interactions to the stabilization of the catalytic transition state of the serine protease subtilisin BPN'. *Biochemistry*. 32(50):13909-16, 1993 Dec 21.
- Jackson D Y.** Burnier J. Quan C. Stanley M. Tom J. Wells J A. A designed peptide ligase for total synthesis of ribonuclease A with unnatural catalytic residues. *Science*. 266 (5183). 1994. 243-247.
- Jakob M.** Untersuchungen zur Substratspezifität der Prolylendopeptidase aus humaner Plazenta. Diplomarbeit. Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg. 1994
- Jakubke HD:** In: Udenfried S. Meienhofer J. The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. 103-165 Academic Press, New York, 1987
- Jakubke HD.** Konnecke A. Peptide synthesis using immobilized proteases. *Methods in Enzymology*. 136:178-88, 1987.
- Jakubke HD.** Eichhorn U. Hansler M. Ullmann D. Non-conventional enzyme catalysis - application of proteases and zymogens in biotransformations [Review]. *Biological Chemistry*. 377(7-8):455-464, 1996 Jul-Aug.
- Jansen EF.** Nutting MDF. Jang R. Balls AK. Inhibition of the proteinase and esterase activities of trypsin and chymotrypsin by diisopropyl fluorophosphate: crystallization of inhibited chymotrypsin. *Journal of Biological Chemistry*. 179: 189ff., 1949
- Jiang JD.** Wilk S. Li J. Zhang H. Bekesi JG. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infection in a t-cell line (cem) by new dipeptidyl-peptidase IV (cd26) inhibitors. *Research in Virology*. 148(4):255-266, 1997 Jul-Aug.
- Johnson WC.** Circular Dichroism and its empirical application to biopolymers. *Methods of biochemical analysis*. Vol.31, 1995

- Jones JB.** Kunitake T. Niemann C. Hein GE. The primary specificity of α -chymotrypsin. Acylated amino acid esters with normal alkyl side chains. *Journal of the American Chemical Society*. 87: 1777ff., 1965
- Kahne T.** Neubert K. Ansorge S. Enzymatic activity of dpiv/cd26 is involved in pma-induced hyperphosphorylation of p56(lck). *Immunology Letters*. 46(1-2):189-193, 1995 May.
- Kahyaoglu A.** Haghjoo K. Guo FS. Jordan F. Kettner C. Felfoldi F. Polgar L. Low barrier hydrogen bond is absent in the catalytic triads in the ground state but is present in a transition-state complex in the prolyl oligopeptidase family of serine proteases. *Journal of Biological Chemistry*. 272(41):25547-25554, 1997 Oct 10.
- Kajtar M.** Hollosi M. Kajtar J. Majer ZS. Köver KE. Chiroptical properties and solution conformations of protected endothiodipeptide esters. *Tetrahedron*. 42(14): 3931-3942, 1986
- Kalwant S.** Porter A G. Purification and characterization of human brain prolyl endopeptidase. *Biochemical Journal* 276 (1). 237-244. 1991.
- Kameoka J.** Tanaka T. Nojima Y. Schlossman S F. Morimoto C. Direct association of adenosine deaminase with a t cell activation antigen CD26. *Science (Washington D C)* 261 (5120). 1993. 466-469.
- Kanai K.** Erdo S. Susan E. Feher M. Sipos J. Podanyi B. Szappanos A. Hermecz I. Prolyl endopeptidase inhibitors - N-acyl derivatives of l-thioproline-pyrrolidine. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 7(13):1701-1704, 1997 Jul 8.
- Karasaki Y.** Ohno M. Interactions of BPN' and Carlsberg subtilisins with peptides containing aromatic amino acids at the C-terminus. Specific rate enhancement due to the secondary enzyme-substrate interaction. *Journal of Biochemistry*. 86(2):563-7, 1979 Aug.
- Kato T.** Nagatsu T. Fukasawa K. Harada M. Nagatsu I. Sakakibara S. Successive cleavage of N-terminal Arg-Pro and Lys-Pro from substance P but not release of Arg-Pro from bradykinin by α -Pro dipeptidyl-aminopeptidase. *Biochim.Biophys.Acta*. 525: 417-422, 1978
- Kato T.** Nakano T. Kojima K. Nagatsu T. Sakakibara S. Changes in prolyl endopeptidase during maturation of rat brain and hydrolysis of substance P by the purified enzyme. *Journal of Neurochemistry*. 35(3):527-35, 1980 Sep.
- Kato C.** Hamaguchi HO. Tasumi M. Transient resonance raman study on the *trans-cis* photoisomerization of N-methylthioacetamide. *The Journal of Physical Chemistry*. 89: 1984
- Kato A.** Fukunari A. Sakai Y. Nakajima T. Prevention of amyloid-like deposition by a selective prolyl endopeptidase inhibitor, Y-29794, in senescence-accelerated mouse. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*. 283(1):328-335, 1997 Oct.
- Katz BA.** Clark JM. Finer-Moore JS. Jenkins TE. Johnson CR. Ross MJ. Luong C. Moore WR. Stroud RM. Design of potent selective zinc-mediated serine protease inhibitors. *Nature*. 391(6667):608-12, 1998 Feb 5.
- Ke H.** Mayrose D. Cao W. Crystal structure of cyclophilin A complexed with the substrate Ala-Pro suggests a solvent assisted mechanism of cis-trans isomerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90:3324ff., 1993
- Kenny AJ.** Booth AG. George SG. Ingram J. Kershaw D. Wood EJ. Young AR. Dipeptidyl peptidase IV, a kidney brush-border serine peptidase. *Biochemical Journal*. 157(1):169-82, 1976 Jul 1.
- Kessler H.** Geyer A. Matter H. Kock M unusual thionation of a cyclic hexapeptide. Conformational changes and dynamic. *International Journal of Peptide & Protein Research*. 40(1):25-40, 1992 Jul.
- Kezdy FJ.** Clement GE. Bender ML. The observation of acyl enzyme intermediates in the α -chymotrypsin catalyzed reaction of N-Acetyl-L-typtophan derivates at low pH. *Journal of the American Chemical Society*. 86: 3690ff., 1964
- Khmelnitsky YL.** Welch SH. Clark DS. Dordick JS. Sals dramatically enhance activity of enzymes suspended in organic solvents. *Journal of the American Chemical Society* 116 (6). 2647-2648. 1994.
- Kidd VJ.** Proteolytic activities that mediate apoptosis [Review] *Annual Review of Physiology*. 60:533-573, 1998.
- Kikuchi M.** Fukuyama K. Epstein W L. Soluble dipeptidylpeptidase IV from terminal differentiated rat epidermal cells purification and its activity on synthetic and natural peptides. *Archives of Biochemistry & Biophysics* 266 (2). 369-376. 1988.
- Kimmel JR.** Smith EL. The properties of papain. *Advan. Enzymol*. 19: 267ff., 1957
- Kise H.** Hayakawa A. Noritomi H. Protease catalyzed synthetic reactions and immobilization-activation of the enzymes in hydrophilic organic solvents. [Review] *Journal of Biotechnology*. 14(3-4): 239-254, 1990
- Knisatschek H.** Bauer K. Characterization of "thyroliberin-deamidating enzyme" as a post-proline-cleaving enzyme. Partial purification and enzyme-chemical analysis of the enzyme from anterior pituitary tissue. *Journal of Biological Chemistry*. 254(21):10936-43, 1979 Nov 10.

- Knisatschek H.** Bauer K. Specific inhibition of post proline cleaving enzyme by benzyloxycarbonyl-Gly-Pro-diazomethyl ketone. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 134(2):888-94, 1986 Jan 29.
- Kojima S.** Kumagai I. Miura K. Effect of inhibitory activity of mutation at reaction site p4 of the streptomyces subtilisin inhibitor, SSI. *Protein Engineering*. 3(6):527-30, 1990 May.
- Kowlessur D.** Topham CM. Thomas EW. O'Driscoll M. Templeton W. Brocklehurst K. Identification of signalling and non-signalling binding contributions to enzyme reactivity. Alternative combinations of binding interactions provide for change in transition-state geometry in reactions of papain. *Biochemical Journal*. 258(3):755-64, 1989 Mar 15.
- Kowlessur D.** Thomas EW. Topham CM. Templeton W. Brocklehurst K. Dependence of the P2-S2 stereochemical selectivity of papain on the nature of the catalytic-site chemistry. Quantification of selectivity in the catalysed hydrolysis of the enantiomeric N-acetylphenylalanyl-glycine 4-nitroanilides. *Biochemical Journal*. 266(3):653-60, 1990 Mar 15.
- Kraut J. (a)** Chymotrypsinogen: X-ray structure. In Boyer PD: *The Enzymes. Third edition. Volume III (Hydrolysis)* 165-184; Academic Press New York and London, 1971
- Kraut J. (b)** Subtilisin: X-ray structure. In Boyer PD: *The Enzymes. Third edition. Volume III (Hydrolysis)* 547-561; Academic Press New York and London, 1971
- Kraut J.** Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. [Review] *Annual Review of Biochemistry*. 46:331-58, 1977.
- Kreil G.** Haiml L. Suchanek G. Stepwise cleavage of the pro part of promelittin by dipeptidylpeptidase IV. Evidence for a new type of precursor-product conversion. *European Journal of Biochemistry*. 111(1):49-58, 1980 Oct.
- Krieg F.** Wolf N. Enzymatic peptide synthesis by the recombinant proline specific endopeptidase from flavobacterium meningosepticum and its mutationally altered cys-556 variant. *Applied Microbiology & Biotechnology*. 42(6):844-852, 1995 Mar.
- Kofron JL.** Kuzmic P. Kishore V. Colon-Bonilla E. Rich DH. Determination of kinetic constants for peptidyl prolyl cis-trans isomerases by an improved spectrophotometric assay. *Biochemistry*. 30(25):6127-34, 1991 Jun.
- Krueger PJ.** Intramolecular NH \cdots O and NH \cdots S hydrogen bonds in *o*-aminophenols and *o*-aminothiophenols. *Tetrahedron*. 26: 4753-4764, 1970
- Kuhl P.** Posselt S. Jakubke HD. α -Chymotrypsin-katalysierte Synthese von Tripeptidamiden im wässrig-organischen Zweiphasensystem. *Pharmazie*. 36: 463-465, 1981
- Kuhl P.** Walpuski J. Jakubke HD. Untersuchungen zum Einfluß der Reaktionsbedingungen auf die α -Chymotrypsin-katalysierte Peptidsynthese im wässrig-organischen Zweiphasensystem. *Pharmazie*. 37: 766-768, 1982
- Kuhl P.** Halling PJ. Jakubke HD. Chymotrypsin suspended in organic solvents with salt hydrates is a good catalyst for peptide synthesis from mainly undissolved reactants. *Tetrahedron Letters*. 31(36): 5213-5216, 1990
- Kuhl P.** Jakubke HD. Protease-catalyzed synthesis of peptides in biphasic aqueous-organic systems. *Pharmazie*. 45(6):393-400, 1990 Jun.
- Küllertz G.** Barth A. Fischer G. Determination of dipeptidylpeptidase IV in biological materials. *Journal of Clinical Chemistry & Clinical Biochemistry* 24 (8). 1986. 551-558.
- Kumagaye KY.** Inui T. Nakajima K. Kimura T. Sakakibara S. Suppression of a side reaction associated with n(im)-benzyloxymethyl group during synthesis of peptides containing cysteinyl residue at the n-terminus. *Peptide Research*. 4(2):84-7, 1991 Mar-Apr.
- Kuo LC.** Fukuyama JM. Makinen MW. Catalytic conformation of carboxypeptidase A. The structure of a true reaction intermediate stabilized at subzero temperatures. *Journal of Molecular Biology*. 163(1):63-105, 1983
- Kurth T.** Ullmann D. Jakubke HD. Hedstrom L. Converting trypsin to chymotrypsin - structural determinants of s1' specificity. *Biochemistry*. 36(33):10098-10104, 1997 Aug 19.
- La Cour TFM.** Stereochemistry of peptides containing a thioacyl group. *Int.J.Peptide Protein Res*. 30: 564-571, 1987
- Laidig KE.** Cameron LM. Barrier to rotation in thioformamide - implications for amide resonance. *Journal of the American Chemical Society*. 118(7):1737-1742, 1996 Feb 21.
- Laskowski M.** Kato I. Protein Inhibitors of proteinases. *Ann. Rev. Biochem*. 49: 593-626, 1980
- Laurence C.** Berthelot M. Lequestel JY. Elghomari MJ. Hydrogen-bond basicity of thioamides and thioureas. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions II*. (11):2075-2079, 1995 Nov.
- Lautie A.** Novak A. *Chem.Phys.Lett*.71: 290-293, 1980

- Lambeir AM.** Borloo M. Demeester I. Belyaev A. Augustyns K. Hendriks D. Scharpe S. Haemers A. Dipeptide-derived diphenyl phosphonate esters - mechanism-based inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. 1290(1):76-82, 1996 May 21.
- Lankiewicz L.** Bowers CY. Reynolds GA. Labroo V. Cohen LA. Vonhof S. Siren AL. Spatola AF. Biological activities of thionated thyrotropin-releasing hormone analogs. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 184(1):359-66, 1992 Apr 15.
- Lauvergnat D.** Hiberty PC. Role of conjugation in the stabilities and rotational barriers of formamide and thioformamide - an ab initio valence-bond study. *Journal of the American Chemical Society*. 119(40):9478-9482, 1997 Oct 8.
- Lee H.** Angus RH. Storer AC. Varughese KI. Carey PR. Conformational states of N-acylalanine dithio esters: correlation of resonance Raman spectra with structures. *Biochemistry*. 27(1):250-7, 1988 Jan 12.
- Lenarcic B.** Bevec T. Thyropins - new structurally related proteinase inhibitors. [Review] *Biological Chemistry*. 379(2):105-111, 1998 Feb.
- Li JR.** Wilk E. Wilk S. Aminoacylpyrrolidine-2-nitriles - potent and stable inhibitors of dipeptidyl-peptidase IV (CD 26). *Archives of Biochemistry & Biophysics*. 323(1):148-154, 1995 Oct 20.
- Li JR.** Wilk E. Wilk S. Inhibition of prolyl oligopeptidase by fmoc-aminoacylpyrrolidine-2-nitriles. *Journal of Neurochemistry*. 66(5):2105-2112, 1996 May.
- Liang PH.** Brun KA. Feild JA. Odonnell K. Doyle ML. Green SM. Baker AE. Blackburn MN. Abdelmeguid SS. Site-directed mutagenesis probing the catalytic role of arginines 165 and 166 of human cytomegalovirus protease. *Biochemistry*. 37(17):5923-5929, 1998 Apr 28.
- Lin Y.** Welsh WJ. Molecular modeling of substrate-enzyme reactions for the cysteine protease papain. *Journal of Molecular Graphics*. 14(2):62 ff., 1996 Apr.
- Linderstrom-Lang K.** Ottesen M. *Nature*. 159: 807ff., 1947
- Liu CF.** Rao C. Tam JP. Acyl disulfide-mediated intramolecular acylation for orthogonal coupling between unprotected peptide segments - mechanism and application. *Tetrahedron Letters*. 37(7):933-936, 1996 Feb 12.
- Lowe G.** Williams A. Direct evidence for an acylated thiol as an intermediate in papain- and ficin- catalysed hydrolysis. *Biochemical Journal*. 96: 189-193, 1965
- Lu W.** Qasim MA. Laskowski M Jr. Kent SB. Probing intermolecular main chain hydrogen bonding in serine proteinase-protein inhibitor complexes: chemical synthesis of backbone-engineered turkey ovomucoid third domain. *Biochemistry*. 36(4):673-9, 1997 Jan 28.
- Lumbroso H.** Amato ME. Lombardo GM. Grassi A. Mesomeric and pi-moments in some hetero-conjugated compounds. *Journal of Molecular Structure*. 442(1-3):183-194, 1998 Feb 3.
- Machleidt W.** Thiele U. Assfalg-Machleift I. Forger D. Auerswald EA. Molecular mechanism of inhibition of cysteine proteases by their inhibitors: kinetic studies with natural and recombinant variants of cystatins and stefins. *Biomedica Biochimica Acta*. 50(6): 13-20, 1991
- Maciejewski A.** Steer RP. The photolysis, physical photochemistry and related spectroscopy of thiocarbonyls. *Chemical Review*. 93: 67ff., 1993
- Mackenzie NE.** Grant SK. Scott AI. Malthouse JP. ¹³C NMR study of the stereospecificity of the thiohemiacetals formed on inhibition of papain by specific enantiomeric aldehydes. *Biochemistry*. 25(8):2293-8, 1986 Apr 22.
- Markland FS.** Smith EL. Subtilisins: Primary structure, chemical and physical properties. In Boyer PD: *The Enzymes. Third edition. Volume III (Hydrolysis)* 562-608; Academic Press New York and London, 1971
- Matsumoto K.** Murata M. Sumiya S. Kitamura K. Ishida. Clarification of substrate specificity of papain by crystal analyses of complexes with covalent-type inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1208(2):268-76, 1994 Oct 19.
- Matthews BW.** Sigler PB. Henderson R. Blow DM. Three-dimensional structure of tosyl-alpha-chymotrypsin. *Nature*. 214(89):652-6, 1967 May 13.
- Matthews DJ.** Wells JA. Substrate phage: selection of protease substrates by monovalent phage display. *Science*. 260(5111):1113-7, 1993 May 21.
- Maziak L.** Lajoie G. Belleau B. Productive conformation in the bound state and hydrolytic behavior of thiopeptide analogs of angiotensin-converting enzyme substrates. *Journal of the American Chemical Society* 108 (1). 182-183. 1986.

- McPhalen CA.** James MN. Structural comparison of two serine proteinase-protein inhibitor complexes: eglin-c-subtilisin Carlsberg and CI-2-subtilisin Novo. *Biochemistry*. 27(17):6582-98, 1988 Aug 23.
- Medrano FJ.** Alonso J. Garcia JL. Romero A. Bode W. Gomis-Rüth FX. Structure of proline iminopeptidase from *Xanthomonas campestris* PV. *citri*: a prototype for the prolyl oligopeptidase family. *EMBO Journal* 17(1): 1-9, 1998
- Meldal M.** Svendsen I. Breddam K. Auzanneau FI. Portion-mixing peptide libraries of quenched fluorogenic substrates for complete subsite mapping of endoprotease specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91(8):3314-8, 1994 Apr 12.
- Menard R.** Carriere J. Laflamme P. Plouffe C. Khouri HE. Vernet T. Tessier DC. Thomas DY. Storer AC. Contribution of the glutamine 19 side chain to transition-state stabilization in the oxyanion hole of papain. *Biochemistry*. 30(37):8924-8, 1991 Sep 17.
- Menard R.** Storer AC. Oxyanion hole interactions in serine and cysteine proteases. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 373 (7). 1992. 393-400.
- Menard R.** Carmona E. Plouffe C. Bromme D. Konishi Y. Lefebvre J. Storer AC. The specificity of the S1' subsite of cysteine proteases. *FEBS Letters*. 328(1-2):107-110, 1993 Aug 9.
- Menard R.** Plouffe C. Laflamme P. Vernet T. Tessier DC. Thomas DY. Storer AC. Modification of the electrostatic environment is tolerated in the oxyanion hole of the cysteine protease papain. *Biochemistry*. 34(2):464-471, 1995 Jan 17.
- Mendel D.** Cornish VW. Schultz PG. Site-directed mutagenesis with an expanded genetic code. [Review] *Annual Review of Biophysics & Biomolecular Structure*. 24:435-62, 1995.
- Mentlein R.** Rix H. Feller A C. Heymann E. Characterization of dipeptidyl peptidase IV from lymphocytes of chronic lymphocytic leukemia of T type. *Biomedica Biochimica Acta* 45 (5). 1986. 567-574.
- Mentlein R.** Struckhoff G. Purification of two dipeptidyl aminopeptidases II from rat brain and their action on proline containing neuropeptides. *Journal Neurochem*. 52: 1284-1293, 1989
- Michel AG.** Lajoie G. Hassani CA. Crystal and molecular structure of two geometrically restricted chemotactic tripeptides, analogues of formyl-methionine-leucine-phenylalanine. *International Journal of Peptide & Protein Research*. 36(6):489-98, 1990 Dec.
- Mignotte B.** Vayssiere JL. Mitochondria and apoptosis [Review] *European Journal of Biochemistry*. 252(1):1-15, 1998 Feb 15.
- Milewska MJ.** Gdaniec M. Polonski T. Chiroptical spectra of 1,2-cyclopropanedicarboxylic monothioimides. *Journal of Organic Chemistry*. 62(6):1860-1862, 1997 Mar 21.
- Miller M.** Baca M. Rao JKM. Kent SBH. Probing the structural basis of the catalytic activity of hiv-1 pr through total chemical protein synthesis. [Article] *Theochem-Journal of Molecular Structure*. 423(1-2):137-152, 1998 Jan 26.
- Misumi Y.** Hayashi Y. Arakawa F. Ikehara Y. Molecular cloning and sequence analysis of human dipeptidyl peptidase IV a serine proteinase on the cell surface. *Biochimica et Biophysica Acta* 1131 (3). 1992. 333-336.
- Miyamoto Y.** Ganapathy V. Barlas A. Neubert K. Barth A. Leibach F H. Role of dipeptidyl peptidase IV in uptake of peptide nitrogen from beta casomorphin in rabbit renal BBMV. *American Journal of Physiology* 252 (4 Part 2). F670-F677. 1987.
- Mock WL.** Chen JT. Tsang JW. Hydrolysis of a thiopeptide by cadmium carboxypeptidase A. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 102(1): 389-396, 1981 Sep.
- Morihara K.** Oka T. Tsuzuki H. Subtilisin BPN': kinetic study with oligopeptides. *Archives of Biochemistry & Biophysics*. 138(2):515-25, 1970 Jun.
- Morihara K.** Comparative specificity of microbial proteinases. [Review] *Advances in Enzymology & Related Areas of Molecular Biology*. 41(0):179-243, 1974.
- Morihara K.** Oka T. alpha-Chymotrypsin as the catalyst for peptide synthesis. *Biochemical Journal*. 163(3):531-42, 1977 Jun 1.
- Morimoto C.** Schlossman SF. The structure and function of cd26 in the t-cell immune response [Review]. *Immunological Reviews*. 161:55-70, 1998 Feb.
- Morita H. (a)** Nagashima S. Takeya K. Itokawa H. Thionation of an antitumour cyclic pentapeptide, astin b, from aster tataricus. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 5(7):677-680, 1995 Apr 6.

- Morita H.(b)** Nagashima S. Takeya K. Itokawa H. Cyclic peptides from higher plants 21. thionation of the antitumour cyclic pentapeptides, astins a, b and c, from aster tataricus. *Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions 1.* (18):2327-2331, 1995 Sep 21.
- Morita H.** Yun YS. Takeya K. Itokawa H. Shirota O. Thionation of segetalins a and b, cyclic peptides with estrogen-like activity from seeds of vaccaria segetalis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 5(3):631-6, 1997 Mar.
- Moriyama A.** Nakanishi M. Takenaka O. Sasaki M. Porcine muscle prolyl endopeptidase limited proteolysis of tryptic peptides from hemoglobin beta-chains at prolyl and alanyl bonds. *Biochimica et Biophysica Acta* 956 (2). 151-155. 1988.
- Nakatsuka T.** Sasaki T. Kaiser ET. Peptide segment coupling catalyzed by the semisynthetic enzyme thiolsubtilisin. *Journal of the American Chemical Society.*109(12): 3808 -3810, 1987
- Nakayama K.** Furin - a mammalian subtilisin/kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins [Review] .*Biochemical Journal.* 327(Part 3):625-635, 1997 Nov 1.
- Nausch I.** Mentlein R. Heymann E. The degradation of bioactive peptides and proteins by dipeptidyl peptidase IV from human placenta. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 371 (11). 1113-1118. 1990.
- Neet KE.** Koshland DE Jr. The conversion of serine at the active site of subtilisin to cysteine: a "chemical mutation". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 56(5):1606-11, 1966 Nov.
- Neurath H.** Evolution of proteolytic enzymes. [Review] *Science.* 224(4647):350-7, 1984 Apr 27.
- Neurath H.** Proteolytic processing and physiological regulation. [Review] *Trends in Biochemical Sciences.* 14(7):268-71, 1989 Jul.
- Nicholson H.** Anderson DE. Daopin S. Matthews BW. *Biochemistry.* 30: 9816ff., 1991
- Nomura K.** Specificity of prolyl endopeptidase. *FEBS Letters.* 209(2): 235-237, 1986 Dec.
- Noula C.** Kokotos G. Barth T. Tzougraki C. New fluorogenic substrates for the study of secondary specificity of prolyl oligopeptidase. *The Journal of Peptide Research.* 49(1):46-51, 1997 Jan.
- Oconnell TP.** Day RM. Torchilin EV. Bachovchin WW. Malthouse JPG., A C-13-NMR study of the role of Asn-155 in stabilizing the oxyanion of a subtilisin tetrahedral adduct. *Biochemical Journal.* 326(Part 3):861-866, 1997 Sep 15
- Ogata S.** Misumi Y. Ikehara Y. Primary structure of rat liver dipeptidyl peptidase IV deduced from its complementary DNA and identification of the amino-terminal signal sequence as the membrane-anchoring domain. *Journal of Biological Chemistry* 264 (6). 3596-3601. 1989.
- Ogata S.** Misumi Y. Tsuji E. Takami N. Oda K. Ikehara Y. Identification of the active site residues in dipeptidyl peptidase IV by affinity labeling and site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 31 (9). 1992. 2582-2587.
- Ohno M.** Saruwatari J. Watanabe M. Studies on papain catalysis with substrates containing the trans-p-phenylazobenzoyl group as a probe for hydrophobic interaction. *Journal of Biochemistry.* 82(3):645-51, 1977
- Ohtsuki S.** Homma K. Kurata S. Natori S. Nuclear localization and involvement in dna synthesis of sarcophaga prolyl endopeptidase. *Journal of Biochemistry.* 121(6):1176-1181, 1997 Jun.
- Ohtsuki T.** Hosono O. Kobayashi H. Munakata Y. Souta A. Shioda T. Morimoto C. Negative regulation of the anti-human immunodeficiency virus and chemotactic activity of human stromal cell-derived factor 1-alpha by cd26/dipeptidyl peptidase iv. *FEBS Letters.* 431(2):236-240, 1998 Jul 17.
- Oleary RM.** Oconnor B. A study of a synaptosomal thyrotropin releasing hormone-inactivating pyroglutamate aminopeptidase from bovine brain. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 27(9):881-890, 1995
- Oleary RM.** Gallagher SP. Oconnor B. Purification and characterization of a novel membrane-bound form of prolyl endopeptidase from bovine brain. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 28(4):441-449, 1996 Apr.
- Oliveira EB.** Martins AR. Camargo AC. Isolation of brain endopeptidases: influence of size and sequence of substrates structurally related to bradykinin. *Biochemistry.* 15(9):1967-74, 1976 May 4
- Orlowski M.** Wilk E. Pearce S. Wilk S. Purification and properties of a prolyl endopeptidase from rabbit brain. *Journal of Neurochemistry.* 33(2):461-9, 1979 Aug.
- Ou MC.** Chu SY. Protonation sites and rotational barriers calculation for formamide and thioformamide. *Journal of Physical Chemistry.* 99(2):556-562, 1995 Jan 12.
- Paetzel M.** Dalbey RE. Catalytic hydroxyl/amine dyads within serine proteases. *Trends in Biochemical Sciences.* 22(1):28-31, 1997 Jan.

- Paradkar VM.** Dordick JS. Aqueous-like activity of α -chymotrypsin dissolved in nearly anhydrous organic solvents. *Journal of the American Chemical Society*. 116(11):5009-5010, 1994
- Pargellis CA.** Campbell SJ. Pav S. Graham ET. Pitner TP. Inhibition of dipeptidyl peptidase IV (CD26) by peptide boronic acid dipeptides. *Journal of Enzyme Inhibition*. 11(3):151-169, 1997.
- Patel M.** Kayani IS. Templeton W. Mellor GW. Thomas EW. Brocklehurst K. Evaluation of hydrogen-bonding and enantiomeric P2-S2 hydrophobic contacts in dynamic aspects of molecular recognition by papain. *Biochemical Journal*. 287 (Pt 3):881-9, 1992 Nov 1.
- Perona JJ.** Craik CS. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases [Review]. *Protein Science*. 4(3):337-360, 1995 Mar.
- Peterson RL.** Hubele KW. Niemann C. The α -chymotrypsin catalyzed hydrolysis of \square -N and O-Alkyl derivatives of \square -N-Acetyl-L-tyrosine methyl ester. *Biochemistry*. 2: 942ff., 1963
- Peterson EB.** Hilvert D. Selenosubtilisins peroxidase activity does not require an intact oxyanion hole. *Tetrahedron*. 53(36):12311-12317, 1997 Sep 8.
- Petkov DD.** Detection of a tetrahedral intermediate in the trypsin-catalysed hydrolysis of specific ring-activated anilides. *Biochimica et Biophysica Acta*. 523(2):538-41, 1978 Apr 12.
- Pfeifer T.** Schierhorn A. Friedemann R. Jakob M. Frank R. Schutkowski M. Fischer G. Specific fragmentation of thioxo peptides facilitates the assignment of the thioxylated amino acid. *Journal of Mass Spectrometry*. 32: 1064-1071, 1997
- Philipp M.** Bender ML. Kinetics of subtilisin and thiolsubtilisin. [Review] *Molecular & Cellular Biochemistry*. 51(1):5-32, 1983.
- Piccini-Leopardi C.** Fabre O. Zimmerman D. Reisse J. Cornea F. Fulea C. *Can. J. Chem*. 55: 2649-2655, 1977
- Pinitglang S.** Watts AB. Patel M. Reid JD. Noble MA. Gul S. Bokth A. Naeem A. Patel H. Thomas EW. Sreedharan SK. Verma C. Brocklehurst K. A classical enzyme active center motif lacks catalytic competence until modulated electrostatically. *Biochemistry*. 36(33):9968-9982, 1997 Aug 19.
- Polgar L.** Bender ML. A new enzyme containing a synthetically formed active site. Thiol-subtilisin. *Journal of the American Chemical Society*. 88(13):3153-3154, 1966 July 5
- Polgar L.** On the role of hydrogen-bonding system in the catalysis by serine proteases. *Acta Biochimica et Biophysica Academiae Scientiarum Hungaricae*. 7(1):29-34, 1972.
- Polgar L.** Asboth B. On the stereochemistry of catalysis by serine proteases. *Journal of Theoretical Biology*. 46(2):543-58, 1974 Aug.
- Polgar L.** Prolyl endopeptidase catalysis. A physical rather than a chemical step is rate-limiting. *Biochemical Journal*. 283 (Pt 3):647-8, 1992 May 1.
- Polgar L.** Szabo E. Prolyl endopeptidase and dipeptidyl peptidase IV are distantly related members of the same family of serine proteases. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*. 373(7):361-6, 1992 Jul.
- Polgar L.** Koltt E. Hollosi M. Prolyl oligopeptidase catalysis. Reactions with thiono substrates reveal substrate-induced conformational change to be the rate-limiting step. *FEBS Letters*. 322(3):227-30, 1993 May 17.
- Polgar L.** Effects of ionic strength on the catalysis and stability of prolyl oligopeptidase. *Biochemical Journal*. 312(Part 1):267-271, 1995 Nov 15.
- Poulos TL.** Alden RA. Freer ST. Birktoft JJ. Kraut J. Polypeptide halomethyl ketones bind to serine proteases as analogs of the tetrahedral intermediate. X-ray crystallographic comparison of lysine- and phenylalanine-polypeptide chloromethyl ketone-inhibited subtilisin. *Journal of Biological Chemistry*. 251(4):1097-103, 1976 Feb 25.
- Prasad BV.** Uppal P. Bassi PS. Barrier to C-N rotation in selenoformamide - an ab initio study. *Chemical Physics Letters*. 276(1-2):31-38, 1997 Sep 12.
- Puschel G.** Mentlein R. Heymann E. Isolation and characterization of dipeptidyl peptidase IV from human placenta. *European Journal of Biochemistry*. 126(2):359-65, 1982 Aug.
- Qasim MA.** Ganz PJ. Saunders CW. Bateman KS. James MNG. Laskowski M. Interscaffolding additivity - association of p-1 variants of eglin c and of turkey ovomucoid third domain with serine proteinases. *Biochemistry*. 36(7):1598-1607, 1997 Feb 18.
- Quemeneur E.** Moutiez M. Charbonnier JB. Menez A. Engineering cyclophilin into a proline-specific endopeptidase. *Nature*. 391(6664):301-304, 1998 Jan 15.

- Rahfeld J.** Schutkowski M. Faust J. Neubert K. Barth A. Heins J. Extended investigation of the substrate specificity of dipeptidyl peptidase IV from pig kidney. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 372 (5). 1991. 313-318.
- Rajaratnam K.** Sykes BD. Kay CM. Dewald B. Geiser T. Baggiolini M. Clark-Lewis I. Neutrophil activation by monomeric interleukin-8. *Science*. 264(5155):90-2, 1994 Apr 1.
- Ranganathan R.** Lu KP. Hunter T. Noel JP. Structural and functional analysis of the mitotic rotamase Pin1 suggests substrate recognition is phosphorylation dependent. *Cell*. 89: 875-886, 1997
- Rao SN.** Singh UC. Bash PA. Kollman PA. Free energy perturbation calculations on binding and catalysis after mutating Asn 155 in subtilisin. *Nature*. 328(6130):551-4, 1987 Aug 6-12.
- Rasnick D.** Small synthetic inhibitors of cysteine proteases [Review]. *Perspectives in Drug Discovery & Design*. 6:47-63, 1996.
- Rawlings ND.** Polgar L. Barrett AJ. A new family of serine-type peptidases related to prolyl oligopeptidase. *Biochemical Journal*. 279 (Pt 3): 907-8, 1991 Nov 1.
- Rawlings ND.** Barrett AJ. Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal*. 290 (Pt 1):205-18, 1993 Feb 15.
- Reinhold D.** Bank U. Buhling F. Lendeckel U. Faust J. Neubert K. Ansorge S. Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor-beta(1) in pwm-stimulated pbmc and t cells. *Immunology*. 91(3):354-360, 1997 Jul.
- Reinhold D.** Hemmer B. Gran B. Born I. Faust J. Neubert K. Mcfarland HF. Martin R. Ansorge S. Inhibitors of dipeptidyl peptidase iv/cd26 suppress activation of human mbp-specific cd4+t cell clones. *Journal of Neuroimmunology*. 87(1-2):203-209, 1998 Jul 1.
- Rennex D.** Hemmings B A. Hofsteenge J. Stone S R. Complementary dna cloning of porcine brain prolyl endopeptidase and identification of the active-site seryl residue. *Biochemistry* 30 (8). 2195-2203. 1991.
- Rheinnecker M.** Baker G. Eder J. Fersht AR. Engineering a novel specificity in subtilisin BPN'. *Biochemistry*. 32(5):1199-203, 1993 Feb 9.
- Rheinnecker M.** Eder J. Pandey PS. Fersht AR. Variants of subtilisin BPN' with altered specificity profiles. *Biochemistry*. 33(1):221-5, 1994 Jan 11.
- Robertus JD. (a)** Alden RA. Birktoft JJ. Kraut J. Powers JC. Wilcox PE. An x-ray crystallographic study of the binding of peptide chloromethyl ketone inhibitors to subtilisin BPN'. *Biochemistry*. 11(13):2439-49, 1972 Jun.
- Robertus JD. (b)** Kraut J. Alden RA. Birktoft JJ. Subtilisin; a stereochemical mechanism involving transition state stabilization. *Biochemistry*. 11(23):4293-4303, 1972 Jun.
- Rollandfulcrand V.** May N. Viallefont P. Lazaro R. Enzymatic peptide synthesis by new supported biocatalysts. *Amino Acids*. 6(3): 311-314, 1994
- Rouille Y.** Duguay SJ. Lund K. Furuta M. Gong QM. Lipkind G. Oliva AA. Chan SJ. Steiner DF. Proteolytic processing mechanisms in the biosynthesis of neuroendocrine peptides - the subtilisin-like proprotein convertases [Review] *Frontiers in Neuroendocrinology*. 16(4):322-361, 1995 Oct.
- Rullmann JAC.** Bellido MN. van Duilnen PT. *J. Mol. Bio.* 206: 101ff., 1989
- Rupnow JH.** Taylor WL. Dixon JE. Purification and characterization of a thyrotropin-releasing hormone deamidase from rat brain. *Biochemistry*. 18(7):1206-12, 1979 Apr 3.
- Sanger F.** Shaw DC. Amino acid sequence about the reactive serine of a proteolytic enzyme from *Bacillus subtilis*. *Nature*. 187: 872ff., 1960
- Sasaki T.** Kise H. Effects of calcium ion on the catalytic activity of α -chymotrypsin in organic solvents. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58(6): 1050-1053, 1994
- Satterthwait AC.** Jencks WP. The mechanism of the aminolysis of acetate esters. *Journal of the American Chemical Society*. 96(22):7018-7031, 1974 Oct 30.
- Schechter I.** Berger A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 27: 157-162, 1967
- Scheithauer S.** Mayer R. Physicochemical and spectral properties of thiocarboxylic acids and their derivatives. *Topics in Sulfur Chemistry*. 4: 184-219, 1979
- Schellenberger A.** Enzymkatalyse. In: Schellenberger A. *Enzymkatalyse*. 1.Auflage. 269-279. Gustav Fischer Verlag, Jena, 1989

Schellenberger V. Schellenberger U. Mitin YV. Jakubke HD. Characterization of the S'-subsite specificity of bovine pancreatic alpha-chymotrypsin via acyl transfer to added nucleophiles. *European Journal of Biochemistry*. 187(1):163-7, 1990 Jan 12.

Schellenberger V. Jakubke HD. Protease catalyzed kinetically controlled peptide synthesis. *Angewandte Chemie International Ed. in English*. 30:1437-1449, 1991

Schellenberger V. (a) Schellenberger U. Jakubke HD. Zapevalova N P. Mitin Y V. Protease-catalyzed peptide synthesis using inverse substrates the synthesis of pro-xaa-bonds by trypsin. *Biotechnology & Bioengineering*. 38 (3). 319-321. 1991.

Schellenberger V. (b) Jakubke HD. Zapevalova N P. Mitin Y V. Protease-catalyzed peptide synthesis using inverse substrates the influence of reaction conditions on the trypsin acyl transfer efficiency. *Biotechnology & Bioengineering* 38 (1).104-108. 1991

Schellenberger V. (c) Braune K. Hofmann HJ. Jakubke HD. The specificity of chymotrypsin. A statistical analysis of hydrolysis data. *European Journal of Biochemistry*. 199(3):623-36, 1991 Aug 1.

Schellenberger V. Turck CW. Hedstrom L. Rutter WJ. Mapping the s' subsites of serine proteases using acyl transfer to mixtures of peptide nucleophiles. *Biochemistry*. 32(16):4349-53, 1993 Apr 27.

Schellenberger V. Turck CW. Rutter WJ. Role of the S' subsites in serine protease catalysis. Active-site mapping of rat chymotrypsin, rat trypsin, alpha-lytic protease, and cercarial protease from *Schistosoma mansoni*. *Biochemistry*. 33(14):4251-7, 1994 Apr 12.

Schirmeister T. Aziridine-2,3-dicarboxylic acid derivatives as inhibitors of papain. *Archiv der Pharmazie*. 329(5):239-244, 1996 May.

Schneider J. Kent SB. Enzymatic activity of a synthetic 99 residue protein corresponding to the putative HIV-1 protease. *Cell*. 54(3):363-8, 1988 Jul 29.

Schnolzer M. Kent SB. Constructing proteins by dovetailing unprotected synthetic peptides: backbone-engineered HIV protease. *Science*. 256(5054):221-5, 1992 Apr 10.

Schön E. Born I. Demuth H U. Faust J. Neubert K. Steinmetzer T. Barth A. Ansorge S. Dipeptidyl peptidase IV in the immune system effects of specific enzyme inhibitors on activity of dipeptidyl peptidase IV and proliferation of human lymphocytes. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 372 (5). 305-312. 1991.

Schönlein C. Heins J. Barth A. Purification and characterization of prolyl endopeptidase from pig brain. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 371 (12). 1159-1164. 1990.

Schroder E. Phillips C. Garman E. Harlos K. Crawford C. X-ray crystallographic structure of a papain-leupeptin complex. *FEBS Letters*. 315(1):38-42, 1993 Jan 2.

Schultz PG. Lerner RA. From molecular diversity to catalysis. Lessons from the immune system. *Science*. 269: 1835-1842, 1996

Schulzeosthoff K. Ferrari D. Los M. Wesselborg S. Peter ME. Apoptosis signaling by death receptors [Review] *European Journal of Biochemistry*. 254(3):439-459, 1998 Jun 15.

Schuster M. Jakubke HD. Kasche V. Nucleophile specificity in papain-catalyzed acyl transfer reactions. *Biomedica Biochimica Acta*. 50(10-11):S122-6, 1991.

Schuster M. Kasche V. Jakubke HD. Contributions to the s'-subsite specificity of papain. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1121(1-2):207-12, 1992 May 22.

Schutkowski M. Dissertation. Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg. 1992

Schutkowski M. Neubert K. Fischer G. Influence on proline-specific enzymes of a substrate containing the thiooxaminoacyl-prolyl peptide bond. *European journal of biochemistry*. 221(1):455-61, 1994 Apr 1.

Schutkowski M. Wöllner S. Fischer G. Inhibition of peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity by substrate analog structures - thioxo tetrapeptide-4-nitroanilides. *Biochemistry*. 34(40):13016-13026, 1995 Oct 10.

Schutkowski M. Jakob M. Landgraf G. Born I. Neubert K. Fischer G. Probing substrate backbone function in prolyl oligopeptidase catalysis--large positional effects of peptide bond monothioxylation. *European Journal of Biochemistry*. 245(2):381-5, 1997 Apr 15.

Sears P. Schuster M. Wang P. Witte K. Wong CH. Engineering subtilisin for peptide coupling. Studies on the effects of counterions and site-specific modifications on the stability and specificity of the enzyme. *Journal of the American Chemical Society*. 116(15):6521-6530, 1994

- Seebach D.** Ko S Y. Kessler H. Koeck M. Reggelin M. Schmieder P. Walkinshaw M D. Bolsterli J J. Bevec D. Thiocyclosporins preparation solution and crystal structure and immunosuppressive activity. *Helvetica Chimica Acta* 74 (8). 1991. 1953-1990.
- Segal DM.** Powers JC. Cohen GH. Davies DR. Wilcox PE. Substrate binding site in bovine chymotrypsin A-gamma. A crystallographic study using peptide chloromethyl ketones as site-specific inhibitors. *Biochemistry*. 10(20):3728-38, 1971 Sep 28.
- Segal DM.** A kinetic investigation of the crystallographically deduced binding subsites of bovine chymotrypsin A. *Biochemistry*. 11(3):349-56, 1972 Feb 1.
- Sekizaki H.** Itoh K. Toyota E. Tanizawa K. Trypsin-catalyzed peptide synthesis with various p-guanidinophenyl esters as acyl donors. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 44(8):1585-1587, 1996 Aug.
- Sekizaki H.** Itoh K. Toyota E. Tanizawa K. Synthesis and tryptic hydrolysis of p-guanidinophenyl esters derived from amino acids and peptides. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 44(8):1577-1579, 1996 Aug.
- Sekizaki H.** Itoh K. Toyota E. Tanizawa K. Enzymatic peptide synthesis with p-guanidinophenyl and p-(guanidinomethyl)phenyl esters as acyl donors. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 46(5):846-849, 1998 May.
- Shaw E.** Peptidyl diazomethanes as inhibitors of cysteine and serine proteinases. *Methods in Enzymology*. 244:649-56, 1994
- Shaw RA.** Kollat E. Hollosi M. Mantsch HH. Hydrogen bonding and isomerization in thioamide peptide derivatives. *Spectrochimica Acta Part A-Molecular Spectroscopy*. 51(8):1399-1412, 1995 Jul.
- Shinde UP.** Liu JJ. Inouye M. Protein memory through altered folding mediated by intramolecular chaperones. *Nature*. 389(6650):520-522, 1997 Oct 2.
- Shinoda M.** Toide K. Ohsawa I. Kohsaka S. Specific inhibitor for prolyl endopeptidase suppresses the generation of amyloid beta protein in ng108-15 cells. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 235(3):641-645, 1997 Jun 27.
- Shioda T.** Kato H. Ohnishi Y. Tashiro K. Ikegawa M. Nakayama EE. Hu HL. Kato A. Sakai Y. Liu HL. Honjo T. Nomoto A. Iwamoto A. Morimoto C. Nagai Y. Anti-HIV-1 and chemotactic activities of human stromal cell-derived factor 1-alpha (sdf-1-alpha) and sdf-1-beta are abolished by cd26/dipeptidyl peptidase iv-mediated cleavage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95(11):6331-6336, 1998 May 26.
- Shirasawa Y.** Osawa T. Hirashima A. *J.Biochem*. 115: 724-729, 1994
- Shishida Y.** Furushiro M. Tanabe S. Nishiyama S. Hashimoto S. Ohno M. Yamamoto T. Watanabe S. ZTTA, a postproline cleaving enzyme inhibitor, improves cerebral ischemia-induced deficits in a three-panel runway task in rats. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*. 55(3):333-338, 1996 Nov.
- Smith SG.** O'Leary M. The kinetic of the acidic and alkaline hydrolysis of ethyl thiobenzoate. *J.Org.Chem*. 28:2825-2828, 1963
- Smith EL.** DeLange RJ. Evans WH. Landon M. Markland FS. Subtilisin Carlsberg. V. The complete sequence; comparison with subtilisin BPN⁺; evolutionary relationships. *Journal of Biological Chemistry*. 243(9):2184-91, 1968 May 10.
- Snow RJ.** Bachovchin WW. Barton RW. Campbell SJ. Coutts SJ. Freeman DM. Gutheil WG. Kelly TA. Kennedy CA. Krolikowski DA. Leonard SF. Pargellis CA. Tong L. Adams J. Studies on proline boronic acid dipeptide inhibitors of dipeptidyl peptidase IV - identification of a cyclic species containing a B-N bond. *Journal of the American Chemical Society*. 116(24):10860-10869, 1994 Nov 30.
- Soeda S.** Yamakawa N. Ohyama M. Shimeno H. Nagamatsu A. An inhibitor of proline endopeptidase. Purification from rat brain and characterisation. *Chem.Pharm.Bull*. 33: 2445-2451, 1985
- Sorimachi H.** Ishiura S. Suzuki K. Structure and physiological function of calpains [Review]. *Biochemical Journal*. 328(Part 3):721-732, 1997 Dec 15.
- Stano J.** Kovacs P. Nemeč P. Neubert K. Dipeptidyl peptidase IV in gherkin seedlings *cucumis sativus* l cv palava. *Biologia*. 49(6):905-910, 1994 Dec.
- Stano J.** Kovacs P. Psenak M. Gajdos J. Erdelsky K. Kakoniova D. Neubert K. Distribution of dipeptidyl peptidase IV in organs and tissue cultures of poppy plants *papaver somniferum* l cv amarum. *Pharmazie*. 52(4):319-321, 1997 Apr.
- Steiner DF.** The proprotein convertases. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2(1):31-39, 1998 Feb.
- Steinmetz ACU.** Demuth HU. Ringe D. Inactivation of subtilisin carlsberg by N-((tert.-Butyloxycarbonyl)alanyl-prolyl-phenylalanyl)-O-benzoylhydroxylamine: Formation of a covalent enzyme-inhibitor linkage in the form of a carbamate derivative. *Biochemistry*. 33: 10535-10544, 1994

- Steitz TA.** Henderson R. Blow DM. Structure of crystalline alpha-chymotrypsin. 3. Crystallographic studies of substrates and inhibitors bound to the active site of alpha-chymotrypsin. *Journal of Molecular Biology*. 46(2):337-48, 1969 Dec 14.
- Stone SR.** Rennex D. Wikstrom P. Shaw E. Hofsteenge J. Inactivation of prolyl endopeptidase by a peptidylchloromethane kinetics of inactivation and identification of sites of modification. *Biochemical Journal* 276 (3). 837-840. 1991.
- Storer AC.** Murphy WF. Carey PR. The use of resonance Raman spectroscopy to monitor catalytically important bonds during enzymic catalysis. Application to the hydrolysis of methyl thionhippurate by papain. *Journal of Biological Chemistry*. 254(9):3163-5, 1979 May 10.
- Storer AC.** Carey PR. Comparison of the kinetics and mechanism of the papain-catalyzed hydrolysis of esters and thiono esters. *Biochemistry*. 24(24):6808-18, 1985 Nov 19.
- Storer AC.** Angus RH. Carey PR. Comparison of the kinetics of the papain-catalyzed hydrolysis of glycine- and alanine-based esters and thiono esters. *Biochemistry*. 27(1):264-8, 1988 Jan 12.
- Storer AC.** Menard R. Catalytic mechanism in papain family of cysteine peptidases. *Methods in Enzymology*. 244:486-500, 1994.
- Storer AC.** Menard R. Recent insights into cysteine protease specificity - lessons for drug design. [Review]. *Perspectives in Drug Discovery & Design*. 6:33-46, 1996.
- Stoll VS.** Eger BT. Hynes RC. Martichonok V. Jones JB. Pai EF. Differences in binding modes of enantiomers of 1-acetamido boronic acid based protease inhibitors: crystal structures of gamma-chymotrypsin and subtilisin Carlsberg complexes. *Biochemistry*. 37(2):451-62, 1998 Jan 13.
- Stubbs TM.** Laber B. Bode W. Huber R. Jerala R. Lenac B. Turk V. The refined 2.4 Angstrom x-ray crystal structure of recombinant human stefin b in complex with the cysteine protease papain. *EMBO Journal*. 9: 1939-1947, 1990
- Sugawara Y.** Hamaguchi H. Harada I. Shimanouchi T. *Chem.Phys.Lett*. 52: 323-326, 1977
- Suzuki Y.** Erickson R H. Sedlmayer A. Chang S K. Ikehara Y. Kim Y S. Dietary regulation of rat intestinal angiotensin-converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV. *American Journal of Physiology* 264 (6 Part 1). G1153-G1159. 1993.
- Suzuki K.** Sorimachi H. Yoshizawa T. Kinbara K. Ishiura S. Calpain - novel family members, activation, and physiological function [Review] *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*. 376(9):523-529, 1995 Sep.
- Syed R.** Wu ZP. Hogle JM. Hilvert D. Crystal structure of selenosubtilisin at 2.0-a resolution. *Biochemistry*. 32(24):6157-64, 1993 Jun 22.
- Szokan G.** Majer Z. Kollat E. Kajtar M. Hollosi M. Peredykajtar M. Chromatographic studies on the racemization of thiopeptides. *Journal of Liquid Chromatography*. 18(5):941-964, 1995.
- Takeuchi Y.** Satow Y. Nakamura KT. Mitsui Y. Refined crystal structure of the complex of subtilisin BPN' and Streptomyces subtilisin inhibitor at 1.8 A resolution. *Journal of Molecular Biology*. 221(1):309-25, 1991 Sep 5.
- Tanaka S.** Murakami T. Horikawa H. Sugiura M. Kawashima K. Sugita T. Suppression of arthritis by the inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. *International Journal of Immunopharmacology*. 19(1):15-24, 1997 Jan.
- Tanaka K.** Proteasomes - structure and biology. [Review] *Journal of Biochemistry*. 123(2):195-204, 1998 Feb
- Tanizawa K.** Kanaoka Y. Lawson W. *Acc. Chem. Res*. 20: 337ff., 1977
- Taylor WL.** Dixon JE. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 94: 9-15, 1980
- Templeton W.** Kowlessur D. Thomas EW. Topham CM. Brocklehurst K. A re-appraisal of the structural basis of stereochemical recognition in papain. Insensitivity of binding-site-catalytic-site signalling to P2-chirality in a time-dependent inhibition. *Biochemical Journal*. 266(3):645-51, 1990 Mar 15.
- Thompson SA.** Andrews PR. Hanzlik RP. Carboxyl-modified amino acids and peptides as protease inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*. 29(1):104-11, 1986 Jan.
- Thuncke F.** Kalman A. Kalman F. Ma S. Rathore A S. Horvath C. Kinetic study on the cis-trans isomerization of peptidyl-proline dipeptides. *Journal of Chromatography*. 744(1-2). 1996. 259-272.
- Tirupathi C.** Miyamoto Y. Ganapathy V. Leibach FH. *Am.J. Physiol*. 265: G81-89, 1993
- Tonge PJ.** Gour-Salin B. Lachance P. Storer AC. Carey PR. Resonance Raman spectroscopic and kinetic consequences of a nitrogen ... sulphur enzyme-substrate contact in a series of dithioacylpapains. *Biophysical Journal*. 63(1):191-6, 1992 Jul.

- Tozser J.** Szabo G. Pozsgay M. Aurell L. Elodi P. Active centre studies on bovine pancreatic chymotrypsin with tripeptidyl-p-nitroanilide substrates. *Acta Biochimica et Biophysica Hungarica*. 21(4):335-48, 1986.
- Travis J.** Salvesen GS. Human plasma proteinase inhibitors. *Ann. Rev. Biochem.* 52: 655-709, 1983
- Tsuru D.** Yoshimoto T. Koriyama N. Furukawa S. Thiazolidine derivatives as potent inhibitors specific for prolyl endopeptidase. *Journal of Biochemistry* (Tokyo) 104 (4). 580-586. 1988.
- Turk B.** Turk V. Turk D. Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors [Review]. *Biological Chemistry*. 378(3-4):141-150, 1997 Mar-Apr.
- Turk D.** Guncar G. Podobnik M. Turk B. Revised definition of substrate binding sites of papain-like cysteine proteases. *Biological Chemistry*. 379(2):137-147, 1998 Feb.
- Umezawa H.** Aoyagi T. Ogawa K. Naganawa H. Hamada M. Takeuchi T. Diprotins A and B , inhibitors of dipeptidyl aminopeptidase IV , produced by bacteria. *J. Antibiotics*. 37: 422-425, 1984
- Unverzagt C.** Geyer A. Kessler H. Racemisierungsfreie Kettenverlängerung von Thiopeptiden mit Proteasen. *Angewandte Chemie*. 104(9): 1231-1233, 1992
- Valenzuela A.** Blanco J. Callebaut C. Jacotot E. Lluís C. Hovanessian AG. Franco R. Adenosine deaminase binding to human CD26 is inhibited by HIV-1 envelope glycoprotein gp120 and viral particles. [Article] *Journal of Immunology*. 158(8):3721-3729, 1997 Apr 15.
- Vanunen DJ.** Engbersen JFJ. Reinhoudt DN. Large acceleration of alpha-chymotrypsin-catalyzed dipeptide formation by 18-crown-6 in organic solvents. *Biotechnology & Bioengineering*. 59(5):553-556, 1998 Sep 5.
- Vernet T.** Tessier DC. Chatellier J. Plouffe C. Lee TS. Thomas DY. Storer AC. Menard R. Structural and functional roles of asparagine 175 in the cysteine protease papain. *Journal of Biological Chemistry*. 270(28):16645-16652, 1995 Jul 14.
- Vogel K.** Cook J. Chmielewski J. Subtilisin-catalyzed religation of proteolyzed hen egg-white lysozyme - investigation of the role of disulfides. *Chemistry & Biology*. 3(4):295-299, 1996 Apr.
- Wallace AC.** Laskowski RA. Thornton JM. Derivation of 3D coordinate templates for searching structural databases: Application to Ser-Asp-His catalytic triades in the serine proteases and lipases. *Protein Science*. 5: 1001-1013, 1996
- Walter W.** Voss J. in: The chemistry of amides. (Zabicky, J., ed.) 383-475, Interscience, New York, 1970
- Walter R.** Yoshimoto T. Postproline cleaving enzyme: kinetic studies of size and stereospecificity of its active site. *Biochemistry*. 17(20):4139-44, 1978 Oct 3.
- Walter R.** Yoshimoto T. Postproline cleaving enzyme: kinetic studies of size and stereospecificity of its active site. *Biochemistry* 17: 4139-4144, 1978
- Wangikar PP.** Michels PC. Clark DS. Dordick JS. Structure and function of subtilisin BPN' solubilized in organic solvents. *Journal of the American Chemical Society*. 119(1):70-76, 1997 Jan 8.
- Warshel A.** Russell S. Theoretical correlation of structure and energetics in the catalytic reaction of trypsin. *Journal of the American Chemical Society* 108 (21). 6569-6579. 1986.
- Warshel A.** Naray-Szabo G. Sussman F. Hwang JK. How do serine proteases really work? [Review] *Biochemistry*. 28(9):3629-37, 1989 May 2.
- Warshel A.** Papazyan A. Kollman PA. On low barrier hydrogen bonds and enzyme catalysis. *Science*. 269: 102-104, 1995
- Welches WR.** Brosnihan K B. Ferrario C M. A comparison of the properties and enzymatic activities of three angiotensin processing enzymes angiotensin converting enzyme prolyl endopeptidase and neutral endopeptidase. *Life Sciences*. 52 (18). 1461-1480. 1993.
- Whisstock J.** Skinner R. Lesk AM. An atlas of serpin conformations [Review]. *Trends in Biochemical Sciences*. 23(2):63-67, 1998 Feb.
- White AJ.** Wharton CW. Hydrogen-bonding in enzyme catalysis. Fourier-transform infrared detection of ground-state electronic strain in acyl-chymotrypsins and analysis of the kinetic consequences. *Biochemical Journal*. 270(3):627-37, 1990 Sep 15.
- White AJ.** Drabble K. Ward S. Wharton CW. Analysis and elimination of protein perturbation in infrared difference spectra of acyl-chymotrypsin ester carbonyl groups by using ¹³C isotopic substitution. *Biochemical Journal*. 287 (Pt 1):317-23, 1992 Oct 1.
- Whiting AK.** Peticolas WL. Details of the acyl-enzyme intermediate and the oxyanion hole in serine protease catalysis. *Biochemistry*. 33(2):552-61, 1994 Jan 18.

- Wiberg KB.** Breneman CM. Resonance interactions in acyclic systems 3. Formamide internal rotation revisited charge and energy redistribution along the c-n bond rotational pathway. *Journal of the American Chemical Society* 114 (3). 1992. 831-840
- Wiberg KB.** Rablen PR. Why does thioformamide have a larger rotational barrier than formamide. *Journal of the American Chemical Society*. 117(8):2201-2209, 1995 Mar 1.
- Wilk S.** Prolyl endopeptidase. [Review] *Life Sciences*. 33(22):2149-57, 1983 Nov 28.
- Wilk S.** Orłowski M. Inhibition of rabbit brain prolyl endopeptidase by n-benzyloxycarbonyl-prolyl-prolinal, a transition state aldehyde inhibitor. *Journal of Neurochemistry*. 41(1):69-75, 1983 Jul.
- Wolf B.** Fischer G. Barth A. Kinetics of dipeptidyl-peptidase IV. *Acta Biologica et Medica Germanica*. 37(3):409-20, 1978.
- Wolf GB.** Scherberich JE. Fischer P. Schoeppe W. Isolation and characterization of dipeptidyl aminopeptidase IV from human kidney cortex. *Clin.Chim.Acta*. 179: 61-72, 1989
- Wrenger S.** Reinhold D. Hoffmann T. Kraft M. Frank R. Faust J. Neubert K. Ansorge S. The N-terminal X-X-Pro sequence of the HIV-1 tat protein is important for the inhibition of dipeptidyl peptidase IV (dp IV/cd26) and the suppression of mitogen-induced proliferation of human T cells. *FEBS Letters*. 383(3):145-149, 1996 Apr 1.
- Wright CS.** Alden RA. Kraut J. Structure of subtilisin BPN' at 2.5 angstrom resolution. *Nature*. 221(177):235-42, 1969 Jan 18.
- Xing R.** Hanzlik RP. Azapeptides as inhibitors and active site titrants for cysteine proteases. *Journal of Medicinal Chemistry*. 41(8):1344-1351, 1998
- Yao S.** Zutshi R. Chmielewski J. Endothiopeptide inhibitors of HIV-1 protease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 8(6):699-704, 1998 Mar 17.
- Yaron A.** Naider F. Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins. *Critical Reviews in Biochemistry & Molecular Biology* 28 (1). 31-81. 1993.
- Yokosawa H.** Ito J. Nishikata M. Ishii S I. Isolation and characterization of prolyl endopeptidase from eggs of the solitary ascidian halocynthia-roretzi comparison with the sperm enzyme. *Comparative Biochemistry & Physiology - B: Comparative Biochemistry* 86 (4). 809-814. 1987.
- Yoshimoto T.** Orłowski RC. Walter R. Postproline cleaving enzyme: identification as serine protease using active site specific inhibitors. *Biochemistry*. 16(13):2942-8, 1977 Jun 28.
- Yoshimoto T.** Simmons WH. Kita T. Tsuru D. Post-proline cleaving enzyme from lamb brain. *Journal of Biochemistry*. 90(2):325-34, 1981 Aug.
- Yoshimoto T.** Tsuru D. Proline-specific dipeptidyl aminopeptidase from *Flavobacterium meningosepticum*. *Journal of Biochemistry*. 91(6):1899-906, 1982 Jun.
- Yoshimoto T.** Tsukumo K. Takatsuka N. Tsuru D. An inhibitor for post-proline cleaving enzyme; distribution and partial purification from porcine pancreas. *Journal of Pharmacobio-Dynamics*. 5(9):734-40, 1982 Sep.
- Yoshimoto T.** Nishimura T. Kita T. Tsuru D. Post-proline cleaving enzyme (prolyl endopeptidase) from bovine brain. *Journal of Biochemistry*. 94(4):1179-90, 1983 Oct.
- Yoshimoto T.** Kado K. Matsubara F. Koriyama N. Kaneto H. Tsuru D. Specific inhibitors for prolyl endopeptidase and their anti-amnesic effect. *Journal of Pharmacobio-Dynamics* 10 (12). 730-735. 1987.
- Yoshizumi K.** Kamiyama K. Shieh TC. Tanaka S. Ohno M. Interactions of alpha-chymotrypsin and Carlsberg subtilisin with methyl N alpha-acetyl-2-(alkylthio)-L-tryptophanoates. *Journal of Biochemistry*. 100(5):1201-6, 1986 Nov.
- Zerner B.** Bond RIM. Bender ML. Kinetic evidence for the formation of acyl enzyme intermediates in the α -chymotrypsin catalyzed hydrolysis of specific substrates. *Journal of the American Chemical Society*. 86: 3674-3679, 1964
- Zhao Q.** Kovach IM. Bencsura A. Papatianassiu A. Enantioselective and reversible inhibition of trypsin and alpha-chymotrypsin by phosphonate esters. *Biochemistry*. 33(26):8128-38, 1994 Jul 5.
- Zhou GW.** Guo J. Huang W. Fletterick RJ. Scanlan TS. Crystal structure of a catalytic antibody with a serine protease active site. *Science*. 265(5175):1059-64, 1994 Aug 19.

Dank:

Herrn Professor Dr. Fischer danke ich für die Möglichkeit dieses interessante Thema in seiner Arbeitsgruppe bearbeiten zu können, für sein Interesse am Fortgang der Arbeit, für die stete Diskussionsbereitschaft und wissenschaftliche Betreuung der Arbeit.

Allen Kolleginnen und Kollegen der Max-Planck Forschungsstelle "Enzymologie der Proteinfaltung" danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die Bereitschaft zur Diskussion und konstruktiven Zusammenarbeit.

Dr. Mike Schutkowski sage ich Dank für die praktische Betreuung der Arbeit, für seine Diskussionsbereitschaft und sein Interesse am Fortgang der Arbeit.

Dr. Mike Schutkowski und den Chemikern unserer Labors danke ich für die Bereitstellung der Peptidderivate. Mein besonderer Dank gilt der Arbeit unserer Chemisch-Technischen Assistentinnen Frau Birgit Hökelmann und Frau Ilona Kunze, die sich mit sehr viel Engagement der Synthese und Reinigung der Thioxopeptidderivate gewidmet haben.

Dr. Jens Rahfeld danke ich für die Bereitstellung der Enzyme rhCyp18 und der Dipeptidylpeptidasen II und IV. Meinen Dank auch an Frau Hella Clemens, die maßgeblich an der Gewinnung des rhCyp18 beteiligt war.

Dr. Grit Landgraf danke ich für die Bereitstellung der Prolylloligopeptidase.

Dr. Frank Thuncke gilt mein Dank für die Zusammenarbeit bei den kapillarelektrophoretischen Messungen.

Bei Susanne Füssel bedanke ich mich für die Zusammenarbeit bei den UV/VIS- und CD-spektroskopischen Messungen an den Dipeptiden.

Des weiteren bedanke ich mich bei den Kollegen von der Analytik, bei Dr. Angelika Schierhorn, Thomas Pfeifer und Marc Kipping für die massespektrometrischen Analysen,

Dr. Gerd Scherer und Dr. Ulf Reimer sage ich Dank für die NMR-Messungen.

Lebenslauf:

Mario Jakob, geb. 06.10.1967 in Heiligenstadt

1974 - 1984 Polytechnische Oberschule Lutter

1984 – 1986 Abitur an der Erweiterten Oberschule (Staatliches Gymnasium) Heiligenstadt

1986 – 1989 Armeedienst im Thomas-Müntzer Regiment Mühlhausen

1989 – 1994 Studium im Fach Biochemie, Spezialisierungsrichtung: Allgemeine Biochemie an der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg

Sept. 1994 Abschluß des Studiums mit einer Diplomarbeit zum Thema: “Substratspezifität der Prolylendopeptidase aus humaner Plazenta” in der Arbeitsgruppe “Naturstoff-Biochemie” am Fachbereich Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg unter Leitung von Prof. Dr. Neubert.

seit

Okt. 1994 Anfertigung einer Dissertation zum Thema: “Untersuchungen zur Konformation und proteolytischen Stabilität von thioxylierten Oligopeptiden” in der Max-Planck Forschungsstelle “Enzymologie der Proteinfaltung” in Halle unter Leitung von Prof. Dr. Fischer.

Eidesstattliche Erklärung:

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der genannten Hilfsmittel und angeführten Literaturzitate angefertigt habe. Die Arbeit wurde an keiner anderen Universität zur Promotion eingereicht.

Halle, 10.09.1998

Mario Jakob