

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Physikalisch-Chemische Eigenschaften von Thioxopeptidderivaten	9
2.1. UV/VIS und CD-spektroskopische Untersuchungen an Thioxopeptiden	9
2.2. Nichtenzymatische Reaktionen von Thioxopeptid-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-