

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.

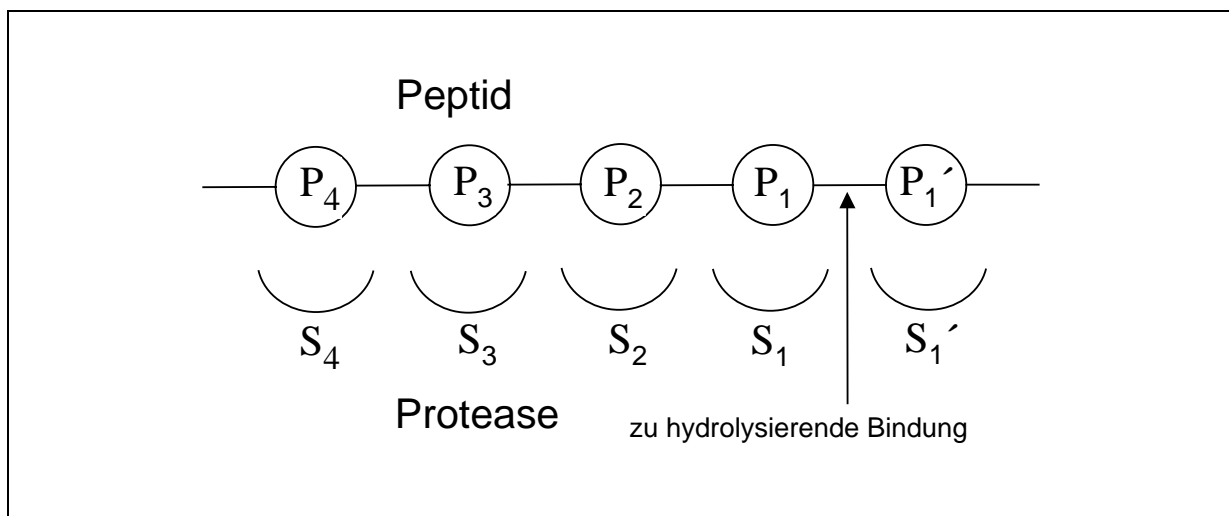


Abb.17: Schematische Darstellung der Enzym-Substrat Wechselwirkungsbereiche entsprechend der Nomenklatur von (Schechter & Berger, 1967). Mit „P“ werden die einzelnen Aminosäurereste des gebundenen Peptids bezeichnet, „S“ kennzeichnet die entsprechenden Bindungsregionen (Sekundärbindungsstellen) im Protein.

- 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.

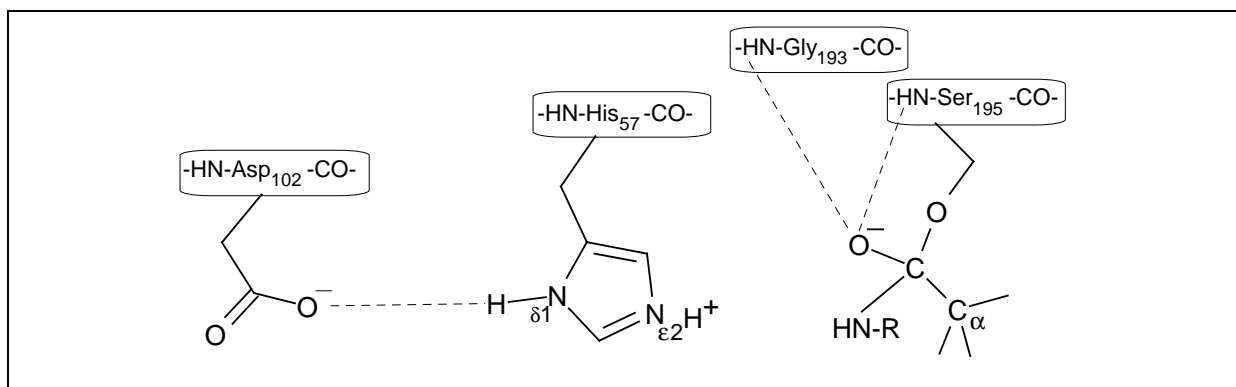


Abb.18: Schematische Darstellung der katalytischen Triade und der Wechselwirkung des Oxyanions mit den Elementen der Oxyanionenhöhle am Beispiel der Serinprotease α -Chymotrypsin. Die gepunkteten Linien markieren Wasserstoffbrückenbindungen.

- 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 Amiden, 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).

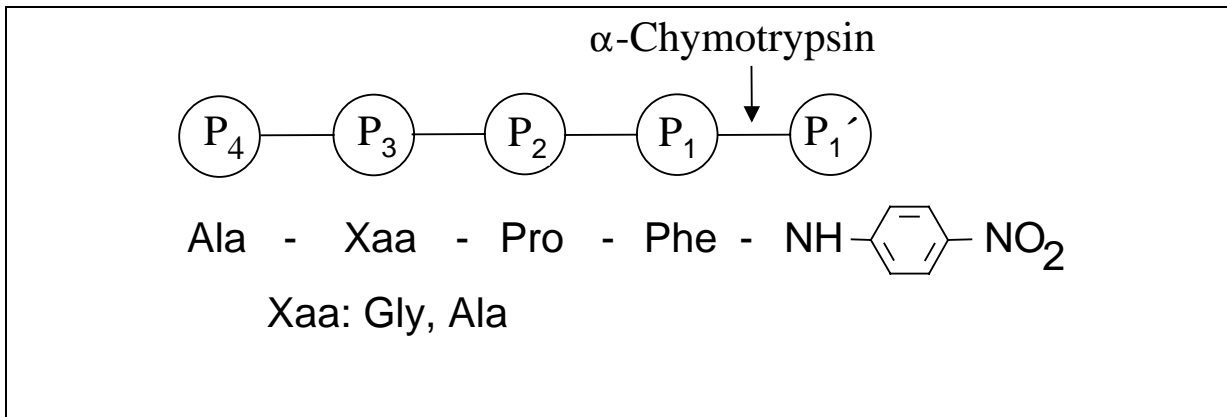


Abb.19: Schematische Darstellung der Substratspezifität des α -Chymotrypsins für die untersuchten Modellsubstrate. Der Pfeil kennzeichnet die zu hydrolysierende Bindung.

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 enthält, bei 25°C. ^aDaten übernommen von (Schutkowski et al., 1995).

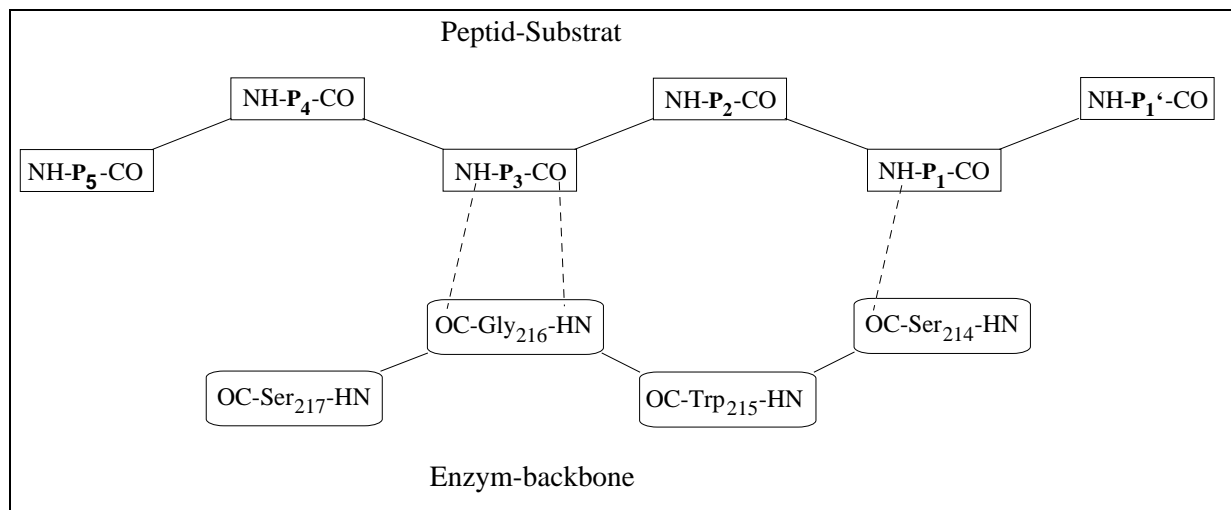


Abb.20: Schematische Darstellung der antiparallelen β-Faltblattstruktur zwischen der Aminosäurekette des Substrates (bzw. Inhibitors) und der Peptidkette des Enzyms. Die im Rahmen der Sekundärbindungsstellen-Wechselwirkungen zwischen Enzym und Substrat ausgebildeten HB sind durch gepunktete Linien gekennzeichnet.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

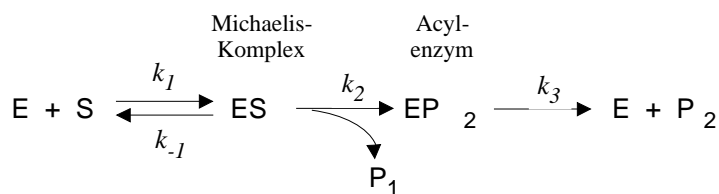
Die sich ohnehin nur geringfügig voneinander unterscheidenden kinetischen Daten der Oxo-, P₄- und P₃-thioxylierten Derivate resultieren wahrscheinlich aus mehreren, sich überlagernden und in ihren Auswirkungen konträr verlaufenden Einflüssen auf die enzymatische Hydrolyse. Neben den erwähnten HB können 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 Thioxo-peptidbindung 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 Thioxo-peptidsynthese nachgewiesen. Durch Thioxoacyltransfer auf geeignete Nucleophile konnten Thioxo-peptide hergestellt werden, die eine „echte“ Thioxo-peptidbindung, d.h. eine Thioxo-peptidbindung zwischen zwei proteinogenen Aminosäureresten, enthielten (vgl. Tab.6). Überraschenderweise waren die Thioxo-peptidbindungen 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 Carbonyl-markierten 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 Proteasenforschung 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 10⁴-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 (Rheinhecker 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 Faltblatt 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).

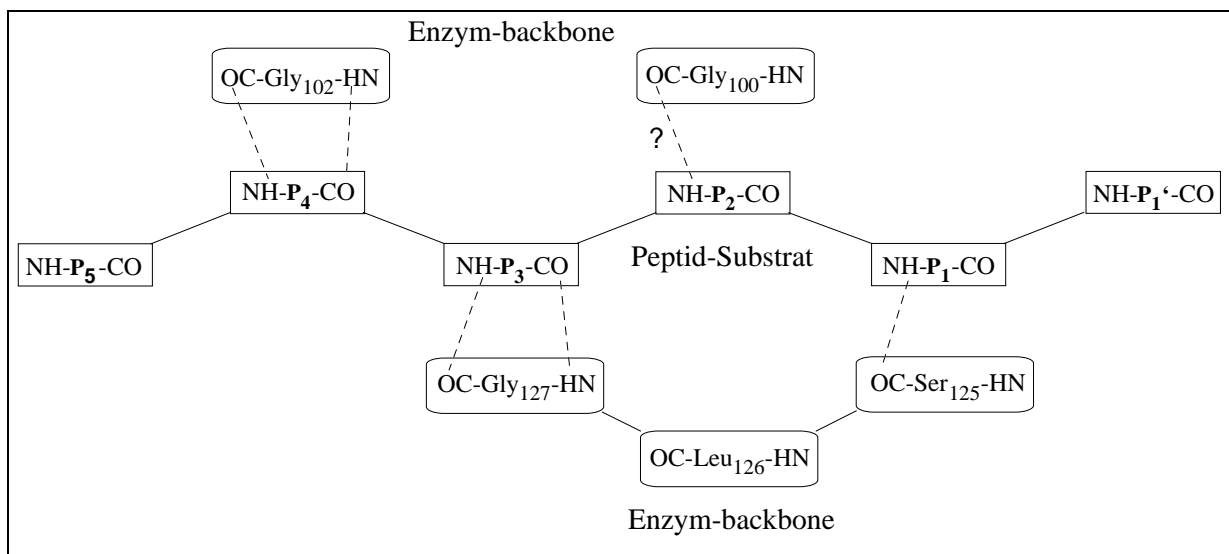


Abb.21: Schematische Darstellung der doppelsträngigen antiparallelen β -Faltblattstruktur zwischen der Aminosäurekette des Substrates (bzw. Inhibitors) und den Peptidketten des Enzyms. Die im Rahmen der Sekundärbindungsstellen-Wechselwirkungen zwischen Enzym und Substrat ausgebildeten HB sind durch gepunktete 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 Thioxopeptide (vgl.Tab.9) wurden bei Langzeitinkubation mit 4 μM Subtilisin C. Hinweise auf eine Hydrolyse der Thioxopeptidbindung 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 Thioxopeptidderivaten 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) Gewebhomogenaten 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.

Substratanaloga 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).

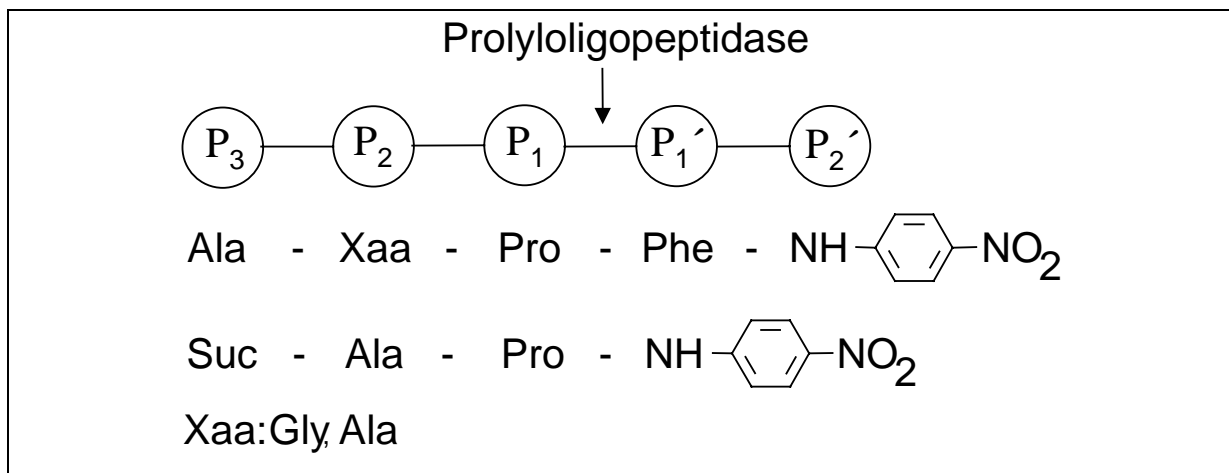


Abb.22: Schematische Darstellung der Substratspezifität der POP. Der Pfeil kennzeichnet die zu hydrolysierende Bindung.

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

Thioxozeptidbindung 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 Thioxozeptidbindung 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 Thioxozeptid-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 Thioxozeptidbindung 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 Thioxozeptidbindung 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 prolinspezifische 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.

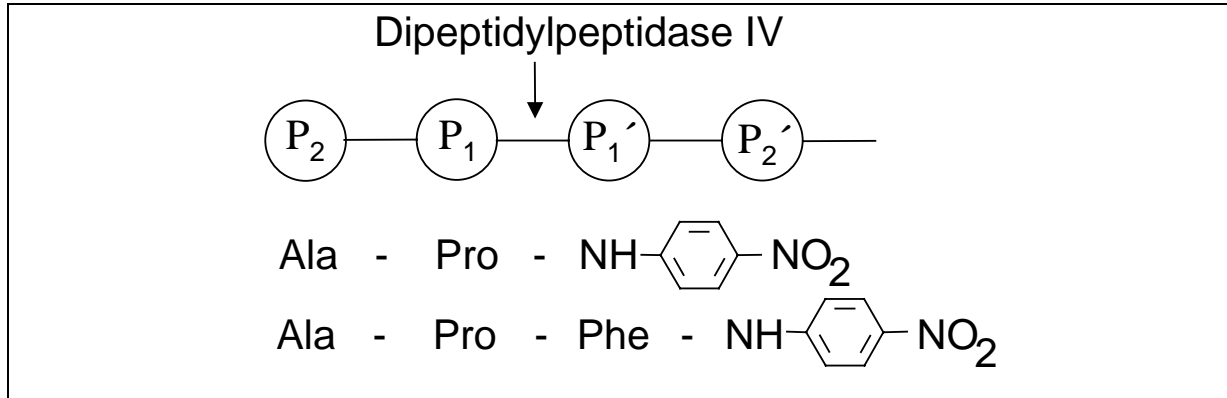


Abb.23: Schematische Darstellung der Substratspezifität der DP IV. Der Pfeil kennzeichnet die zu hydrolysierende Bindung.

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.

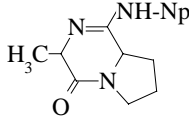
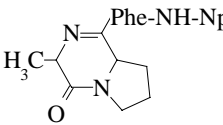
3.4.4. Untersuchungen zur Inhibierung der DP IV mit zyklischen 2-Keto-5-amino-4,5-Dehydropiperazin-Derivaten

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 $\text{CH}_3\text{-O-CO-Phe-Gly-CS-O-CH}_3$ 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.

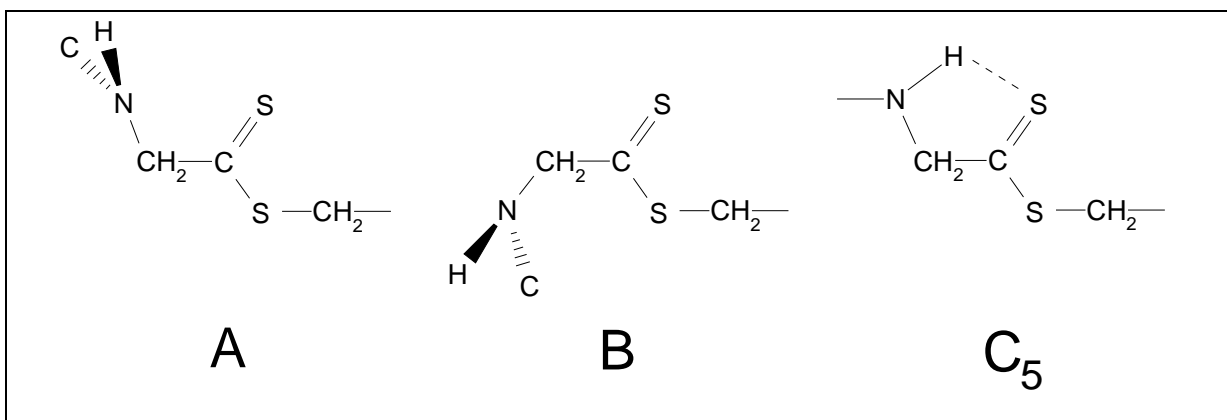


Abb.24: Schematische Darstellung der A, B und C-5 Konformationen von Dithioacylenzymen nach (Lee et al., 1988).

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).

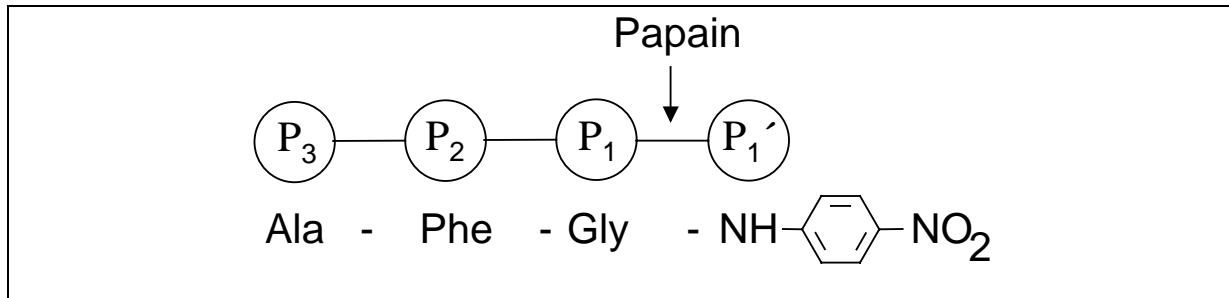


Abb.25: Schematische Darstellung der Substratspezifität des Papains. Die zu hydrolysierende Bindung ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

3.5.3.1. Hydrolyse von P₃ und P₂-thioxylierten Tripeptid-4-Nitroaniliden

Die Thioxylierung der P₃-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 P₃-Seitenkette mit der Seitenkette von Tyr67 gefunden (Drenth et al., 1976). Die P₃-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 P₂-NH HB zum Gly66-CO, welche für die Katalyse bedeutsam ist, erfolgen.

Drastische Auswirkungen auf die kinetischen Konstanten hat hingegen die Thioxosubstitution der P₂-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 P₂-Thioxosubstitution mit vergleichbar starker Verringerung der $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ -Werte (Asboth et al., 1988).

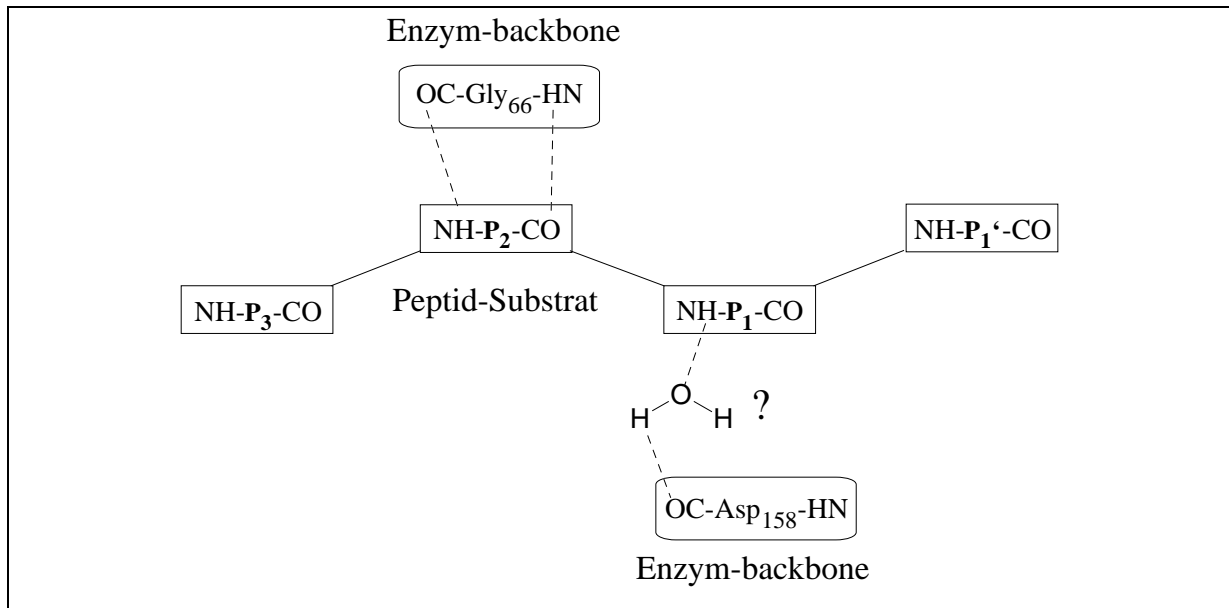


Abb.26: Schematische Darstellung der im Rahmen der Sekundärbindungsstellen-Wechselwirkungen zwischen Enzym und Substrat (bzw. Inhibitor) ausgebildeten HB (gepunktete Linien), abgeleitet aus den Ergebnissen der Röntgenkristallstrukturanalyse verschiedener Papain - Peptidyl-Chlormethylketon-Inhibitor-Komplexe 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-Thioisäure 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 Thioxycarbonylgruppe 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 Thioxycarbonylrest 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.

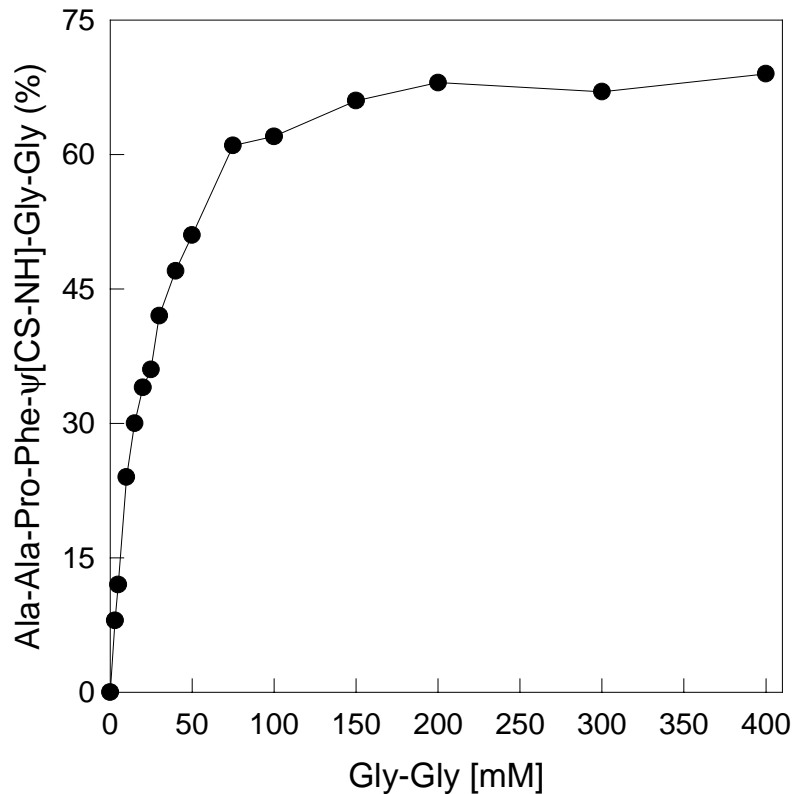


Abb.27: Konzentrationsabhängigkeit des Subtilisin C. katalysierten Thioacyltransfers auf das Dipeptid Gly-Gly. Als Acylkomponente wurden 0.5 mM Ala-Ala-Pro-Phe-ψ[CS-NH]-Np eingesetzt, die Subtilisin C.-Konzentration betrug 2 μM. Die Reaktionen verliefen in 35 mM HEPES, pH 7.8 bei 25°C über 20h.

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 längerer 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).

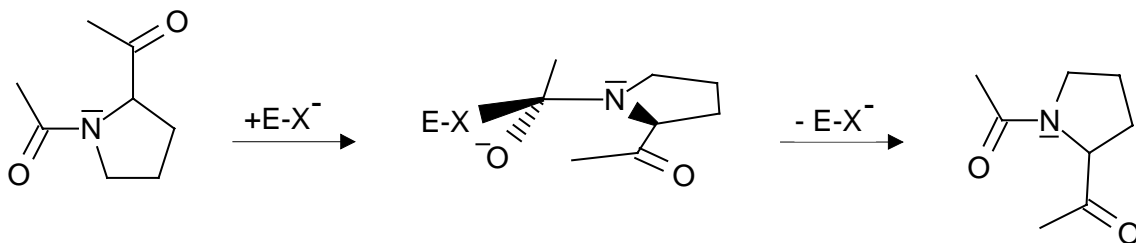


Abb.28: Modell der Cyclophilin-katalysierten Isomerisierung, bei dem ein Nucleophil am Carbonylkohlenstoff der Peptidyl-Prolyl-Peptidbindung angreift, nach (Fischer, 1994).

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.