

4. Zusammenfassung der Ergebnisse

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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