

5. Experimenteller Teil

5.1. Synthese der verwendeten Peptidderivate

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

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

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

5.2. Allgemeine Bemerkungen

5.2.1 Puffer und Peptidlösungen

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

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

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

5.2.2. Stabilitätsuntersuchungen

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

5.2.3. Untersuchung der Hydrolyse- und Umwandlungsprodukte

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

5.2.4. Beeinflussung der kinetischen Konstanten durch DMSO im Reaktionsansatz

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

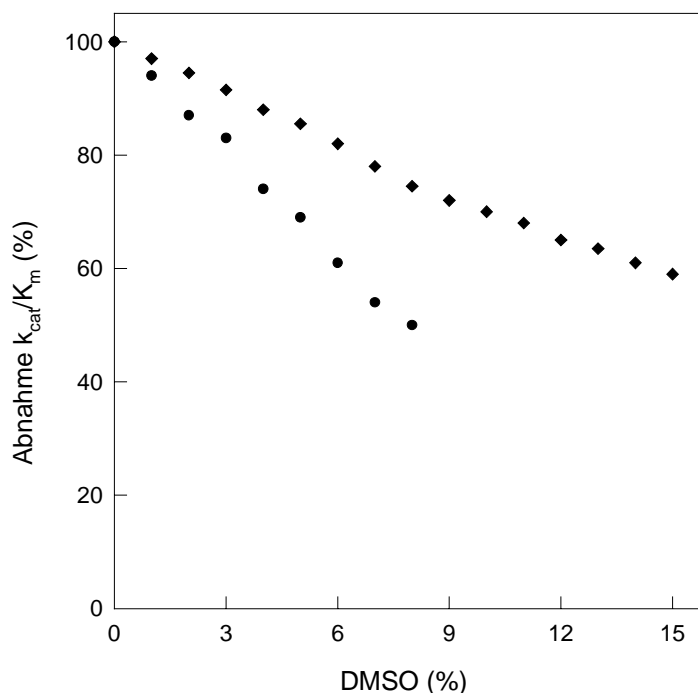


Abb.5: Darstellung der Abnahme von k_{cat}/K_m in der α -Chymotrypsin (◆) bzw. Subtilisin C. (●) katalysierten Hydrolyse von Ala-Ala-Pro-Phe-NH-Np mit steigender DMSO-Konzentration. Die Messungen erfolgten in 35 mM HEPES, pH 7.8 bei 25°C mit 50 μ M Substrat unter der Bedingung $[S_0] \ll K_m$. Unter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

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

5.3. Messungen zu physikalisch-chemischen Eigenschaften der Thiopeptide

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

5.4. Enzymatische Untersuchungen

5.4.1. α -Chymotrypsin

5.4.1.1. Isolierung, Aufbewahrung und Aktivitätsbestimmung

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

5.4.1.2. Puffer, Reaktionsbedingungen und Meßmethoden

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

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

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

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

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

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

5.4.2. Subtilisin Carlsberg

5.4.2.1. Isolierung, Aufbewahrung und Aktivitätsbestimmung

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

5.4.2.2. Puffer, Reaktionsbedingungen und Meßmethoden

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

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

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

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

5.4.3. Dipeptidylpeptidase IV

5.4.3.1. Isolierung, Aufbewahrung und Aktivitätsbestimmung

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

5.4.3.2. Puffer, Reaktionsbedingungen und Meßmethoden

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

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

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

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

5.4.4. Dipeptidylpeptidase II

5.4.4.1. Isolierung, Aufbewahrung und Aktivitätsbestimmung

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

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

5.4.4.2. Puffer, Reaktionsbedingungen und Meßmethoden

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

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

5.4.5. Prolyl oligopeptidase

5.4.5.1. Isolierung, Aufbewahrung und Aktivitätsbestimmung

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

5.4.5.2. Puffer, Reaktionsbedingungen und Meßmethoden

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

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

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

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

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

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

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

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

5.4.6. Papain

5.4.6.1. Isolierung, Aufbewahrung und Aktivitätsbestimmung

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

5.4.6.2. Puffer, Reaktionsbedingungen und Meßmethoden

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

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

5.4.7. Untersuchungen mit Cyclophilin und Thiopeptiden

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

5.5. Beschreibung der allgemeinen Meß- und Analysemethoden

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

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

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

90-x-y µl Puffer,

x µl Substrat und

10 µl Enzym

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

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

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

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

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

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

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

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

5.5.2. Methode B - HPCE Messungen

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

5.5.3. Methode C - analytische HPLC Messungen

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

5.5.4. Methode D - Enzymkatalysierte Synthese von Thioxozeptiden

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

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

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

5.5.5. Methode E - CD-Messungen

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

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

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

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

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

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