

Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie der
Technischen Universität München

**Verlängerung des N-Terminus von Proteinen mithilfe von IgA-
Protease: Eine neue Methode zur posttranslationalen in vitro
Modifikation von Proteinen**

Marzena Lewinska

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Th. Bach

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. F. P. Schmidtchen
2. Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauff

Die Dissertation wurde am 08.07.02 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch Fakultät für Chemie am 25.07.02 angenommen.

Mojej Mamie, Mojemu Tacie

Die vorliegende Arbeit wurde von Dezember 1997 bis Juni 2002 am Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München angefertigt.

Meinem Lehrer, Herrn Prof. Dr. F. P. Schmidtchen, danke ich für die intensive Betreuung, die wertvollen Diskussionen, Ratschläge, sowie für viel Unterstützung und Hilfsbereitschaft jeder Art.

Bei meinem Freund Andreas Feller bedanke ich mich für die Ruhe und Harmonie, die ich bei ihm gefunden habe, sowie viel Unterstützung jeder Art während des Schreibens dieser Arbeit.

Meinen Kollegen Michael Berger, Anna Cattani, Manal Haj, Helge Hameyer, Thordis Hinnekeuser, Claudia Huber, Vladimir Kral, Elena Nicoletti, Andreas Pfletschinger und Bettina Richter danke ich für die gute Zusammenarbeit, angenehme Arbeitsatmosphäre und die tatkräftige Unterstützung.

Bei Prof. A. Skerra und seinen Mitarbeitern möchte ich mich für die Durchführung von Proteinmutationen bedanken.

Bei Dr. Wieser und Dr. Köhler möchte ich mich für Ausleihen der 'Zauber-HPLC-Säule' zur Proteinanalytik sowie Durchführung der Aminosäuresequenzanalyse bedanken.

Ich bedanke mich auch bei allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Organische Chemie und Biochemie und Angestellten im Hause für ihre Hilfe und Kollegialität.

Inhaltverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Zielsetzung der Arbeit	11
3. Modifikation am N-Terminus	15
3. 1. Die chemische Modifizierung	17
3. 2. Die enzymatische Modifikation	25
4. C-terminale Modifikation	31
5. Reverse Proteolyse	35
5. 1. Kinetisch und thermodynamisch kontrollierte reverse Proteolyse	35
5. 2. Beispiele für enzymatische Peptidsynthese	39
5. 3. Synthese in organischen Lösungsmitteln mit geringem Wasseranteil	41
6. IgA-Protease	42
6.1. Allgemein	42
6.2. IgA-Protease aus <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	44
6.2.1. Spezifität	44
6.2.2. Struktur	44
6.2.3. Katalysemechanismus	46
6.2.4. Inhibitoren	46
6.2.5. Eigenschaften	47
6.2.6. Biologische Funktion der IgA-Protease	47
6.2.7. Die Produktionsmethoden	48
6.2.8. Ähnlichkeit der IgA-Protease aus <i>Neisseria gonorrhoeae</i> mit IgA-Proteasen aus anderen Stämmen	48
6.3. Anwendung	49
7. Aktivität der IgA1-Protease.	51

7.1. Bisherige Aktivitätstests und ein neues Aktivitätstest	51
7.2. Bestimmung des K_M -Wertes	52
7.3. Die Aktivitätsunterschiede in verschiedenen IgA-Protease Chargen	55
7.4. Einfluss der Operationen 'Auftauen/Einfrieren' auf die Enzymaktivität	56
7.5. Einfluss der Inkubationszeit auf den Aktivitätsverlust	59
7.6. Einfluss der Enzymverdünnung auf den Aktivitätsverlust	61
7.7. Einfluss der Glycerinmenge auf die Aktivität der IgA-Protease	62
8. Enzymatische Hydrolyse mit geeigneten Substraten	64
8.1. Verbesserung der Substratstruktur	64
8.2. Theoretische Grundlagen für die Modifizierung	65
8.3. Synthese von verbesserten Substraten	66
8.3.1. Synthese von <i>Boc-Pro-Arg-Pro-Pro-O[Gly]-Pro-Trp-NH₂</i>	66
8.3.2. Synthese von <i>Boc-Pro-Arg-Pro-Pro-O[Ala]-Pro-Trp-NH₂</i>	71
8.3.3. Synthese von <i>Boc-Pro-Arg-Pro-OH</i>	77
8.4. Kinetik der enzymatischen Hydrolyse von Depsipeptiden	79
8.4.1. Kinetik der Hydrolyse von <i>Boc-Pro-Arg-Pro-Pro-O[Gly]-Pro-Trp-NH₂</i>	79
8.4.2. Praktische Schwierigkeiten bei der Bestimmung des K_M -Werts	80
8.4.3. Spontane Hydrolyse	81
8.4.4. Bestimmung des K_M -Werts für <i>Boc-Pro-Arg-Pro-Pro-O[Gly]-Pro-Trp-NH₂</i>	84
8.5. Einfluss der Temperatur auf die Hydrolysegeschwindigkeit	88
9. Transferasereaktionen	91
9.1. Reverse Proteolyse - Optimierung der Reaktionsbedingungen	91
9.2. Transferreaktion mit dem Depsipeptid <i>Boc-Pro-Arg-Pro-Pro-O[Gly]-Pro-Trp-NH₂</i>	92
9.3. Kinetik der Transferasereaktion	92

9.3.1	Methylester als Acyldonor	92
9.3.2	Depsipeptid 12 als Acyldonor	94
9.4.	Optimierung der Transferasereaktion zwischen Glycolsäuredepsi- peptid 12 und CSMP-Peptid 37	95
9.4.1	Allgemeine Voraussetzungen	95
9.4.2.	Einfluss der Acyldonorkonzentration	96
9.4.3.	Einfluss der Nukleophilkonzentration	97
9.4.4.	Einfluss der Enzymkonzentration auf die Kupplungsausbeute	98
9.4.5.	Einfluss des MeOH-Gehaltes auf die Kupplungsausbeute	99
9.5.	Verschiedene Substrate in der Reaktion des Acyltransfers	100
9.6.	Vergleich des kinetischen Verlaufes der enzymatischen Kupplungs- reaktion für Peptidmethylester 31 und Depsipeptid 12	101
9.6.1.	Transfer den Acyldonoren 12 und 31 bei 35°C	101
9.6.2.	Transfer der Acyldonoren 12 und 31 bei 25°C	102
10.	Transferasereaktion mit dem Methylester als Acyldonor	103
10.1.	Optimierung der reverse Proteolyse	103
10.2.	Einfluss der Acyldonorkonzentration	104
10.3.	Einfluss der Pufferart	105
10.4.	Einfluss des pH-Wertes	106
10.5.	Einfluss der Inkubationstemperatur	107
10.6.	Einfluss der Glycerinkonzentration	108
10.7.	Einfluss der EDTA Konzentration	109
10.8.	Einfluss der Temperatur	110
10.9.	Verschiedene Arten der Reaktionsführung und ihr Einfluss auf die Kupplungsausbeute	111
10.10.	Die besten Bedingungen für Transferase	113
11.	Modifikation von Proteinen	116

11.1. Voraussetzungen für die Modifikation	116
11.2. Anticalin FluA	116
11.3. Transferasereaktion mit IgAP1	121
11.3.1. Kinetischer Verlauf der Transferasereaktion mit IgAP1 42	121
11.3.2. Vergleich mit den Modifikationen von CSMP und IgAP1	124
11.3.3. Blindreaktionen	125
11.4. Transferasereaktion mit IgAP2	127
11.4.1. Kinetischer Verlauf der Transferasereaktion mit IgAP2 43	127
11.4.2. Blindreaktionen	129
11.5. Andere modifizierbare Proteine	131
12. Zusammenfassung	135
13. Experimenteller Teil	141
13.1. Geräte	141
13.2. Vorschriften zur Synthese von Substraten für IgA-Protease	142
13.2.1. Milchsäurederivat Boc-Pro-Arg-Pro-Pro-O[Ala]-Pro-Trp-NH ₂ 19	142
13.2.2. Glykolsäurederivat Boc-Pro-Arg-Pro-Pro-O[Gly]-Pro-Trp-NH ₂ 12	150
13.2.3. Andere Acyldonoren 11, 26, 27, 28, 31	155
13.3. Aktivitätsbestimmung der IgA-Protease	159
13.4. Modifikation von CSMP	160
13.5. Modifikation von Proteinen	161
14. Literaturverzeichnis	164

Abkürzungen:

AA ¹ -AA ^N	Aminosäurepositionen
A, Akt.	Enzymaktivität [U]
Abb.	Abbildung
Ac-	Acetyl-
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
Ala	Alanin (A)
AMC	Aminomethylcoumarin
ANP	Atrial-natriuretic-peptide
Asn	Asparagin (N)
Asp	Asparaginsäure (D)
Arg	Arginin (R)
ATP	Adenosintriphosphat
Bicine	N,N-Bis[2-hydroxyethyl]glycine
Bio-	Biotinyl-
Boc	t-Butoxycarbonyl-
BOP	Benzotriazol-1-yl-oxy-tris(dimethylamino)-phosphonium he- xafluorophosphat
BPTI	bovine-pancreatic-trypsin-inhibitor
tBuOMe	t-Butylmethylether
Bzl	Benzyl-
C _{Ac}	Acyldonorkonzentration [mM]
C _{Nu}	Nukleophilkonzentration [mM]
C _E	Enzymkonzentration [µg/ml] oder [µg/µl]
C _s	Substratkonzentration [mM]
CALB	Candida-antarctica-Lipase-B
CCA 1	α-Cyano-4-hydroxymethylsäure
CoA	Coenzym A
CSMP	carbohydrate-structure-mimicking-peptide
Cys	Cystein (C)
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
dE/dt	Änderung der Extinktion in der Zeit [min ⁻¹]
DMAP	4-(N,N-Dimethylamino)pyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure (-acid)

DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
EDC	N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid HCl
EDIPA	Ethyl-diisopropylamin
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N',-tetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked-immunosorbent-assay
Em bzw. Ex	Emission bzw. Einstrahlung (für Fluoreszenzdetektion)
EPPS	N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[3-propane-sulfonic acid]
ESI-MS	electrospray-ionisation-mass-Spektroskopie
EtOH	Ethanol
Exp.	Experiment
exp.	experimentiell
F _{ab} , F _c	Spaltungsprodukte der Immunglobulin A
FG	funktionelle Gruppe
FluA	Anticalin FluA
Fmoc	Fluorenyloxycarbonyl-
For-	Formyl-
GCSF	granulocyte-colony-stimulating-factor
GFP	green-fluorescent-protein
Gln	Glutamin (Q)
Glu	Glutaminsäure (E)
Gly	Glycin (G)
GRF	gastrin-releasing-factor
GSTIII	gentechnisch modifizierte Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HAPyU	1-(1-Pyrrolidinyl-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridin-1-ylmethyl)pyrrolidinium hexafluorophosphat-N-Oxid
HATU	N-[(Dimethylamino)-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridin-1-ylmethyl]-N-methylmethanaminium hexafluorophosphat-N-Oxid
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphat
hIL-2	human Interleukin-2
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HOBt	N-Hydroxybenzotriazol
HOSu	N-Hydroxysuccinimid
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Ida	Iminodiessigsäure

Ile	Isoleucin (I)
IFN-con	consensus-human-leukocyte-Interferon
IgA	Immunoglobulin A
IgAP1, IgAP2	gentechnisch modifizierte Anticaline FluA
IL-1 β	unmodifiziertes human Interleukin-1 β
IMPACT	Intein-mediated-purification-with-an-affinity-chitin-binding-tag
IPL	Intein-protein-ligation
IR	Infrarot Spektroskopie
i.S., int.St.	interner Standard
k_{Amin}	Geschwindigkeitskonstante der Aminolyse
k_{cat}	Geschwindigkeitskonstante der enzymatischen Katalyse
k_{Hyd}	Geschwindigkeitskonstante der Hydrolyse
K_i	Inhibitionskonstante
K_M	Michaelis-Menten Konstante
Leu	Leucin (L)
Lit.	Literaturstelle
Lys	Lysin (K)
LH-RH	luteinising-hormone-releasing-hormone
MAP	multiple-antigen-peptide
MALDI TOF	Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisation, Time of Flight
MBP	maltose-binding-protein
MeOH	Methanol
Met	Methionin (M)
Met-hGH	methionyl-human-growth-hormon
MLCKI	myosine-light-chain-kinase-inhibitor
mod.	modifiziert
3 MPA	3-Mercaptopropionsäure
MS	Massenspektroskopie
MW	Molekulargewicht [$g\ mol^{-1}$]
mRNA	messenger RNA
n.b.	nicht bestimmt
n.e.b.	nicht eindeutig bestimmt
NCL	native chemical ligation
NMM	N-Methylmorpholin
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NMT	N-Myristoyltransferase
NRPT	nicht ribosomale Peptidyltransferase

[N], [Nu]	Nukleophilkonzentration [mM]
OBzl	Benzylester
Org.Lsn.	organisches Lösungsmittel
OMe	Methylester
OMIU	O-Methylisoharnstoff
OtBu	t-Butylester
p	Partitionskonstante nach Jakubke
P _{1...P_n}	Aminosäurepositionen
pAA	p-Aminoanilid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAM	Peptidylglycin- α -amidierende Monooxygenase
PDB	Brookhaven Protein Data Bank
PEG	Polyethylenglycol
PEP	Prolyl Endopeptidase
Phe	Phenylalanin (F)
p-I-Phe	p-Iodo-Phenylalanin
pNA	p-Nitroanilid
Pro	Prolin (P)
RG	reaktive Gruppe, eine leicht modifizierbare Gruppe
Rhg-GCSF	recombinant-human-GCFS
rIL-1 β	recombinant-human-Interleukine-1 β
RNA	Ribonucleinsäure (-acid)
RNAse A	Ribonuclease A
RP	reversed Phase
RPT	ribosomale Peptidyltransferase
RT	Raumtemperatur
R _v	Retentionsvolumen [ml]
[S]	Substratkonzentration [mM]
SDS PAGE	Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Ser	Serin (S)
SPCL	solid-phase-chemical-ligation
spez.Akt.	spezifische Aktivität in [U/ μ g Protein]
SPPS	solid-phase-peptide-synthesis
SPR	Surface plasmon resonance
TAPS	N-tris[Hydroxymethyl]methyl-3-aminopropanesulfonsäure
TASP	Template-Assembled-Synthetic-Proteins

TBTU	2(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborat
TEA	Triethylamin
TES	Triethylsilan
TFA	Trifluoressigsäure
Tgase	guinea-pig-liver-transglutaminase
THF	Tetrahydrofuran
Thr	Threonin (T)
TRIS	Tris[hydroxymethyl]aminomethan
tRNA	Transfer RNA
Trp	Tryptophan (W)
Tyr	Tyrosin (Y)
UV	Ultraviolett (HPLC-Detektion)
Val	Valin (V)
V _A	Geschwindigkeit der Aminolyse
V _H	Geschwindigkeit der Hydrolyse
V _{max}	maximale Anfangsgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion
Xaa	beliebige Aminosäure
Z	Benzyloxycarbonyl-
α-BCP	α-bag-cell-peptide
λ	Wellenlänge [nm]

1. Einleitung

In den letzten Jahren hat sich die Proteinchemie sehr stark entwickelt. Die genetischen Techniken gehören inzwischen zu den Standardmethoden in der Proteinsynthese. Sie ermöglichen zwar die Herstellung von Polypeptiden und Proteinen, sobald aber in einem Protein eine nichtribosomale Aminosäure oder eine unnatürliche Gruppe gewünscht wird, muss man zu anderen Techniken greifen ^[1]. Deshalb basiert das sogenannte *Protein- und Enzym-engineering*, dessen Ziel die Herstellung von neuen Enzymen und Proteinen mit neuen Eigenschaften ist, hauptsächlich auf Methoden, die eine selektive Einführung von unnatürlichen Aminosäuren und Funktionsgruppen ermöglichen. Zu solchen Methoden gehören die Semisynthese und das '*de-novo-Design*'.

In der Semisynthese wird eine völlige Rekonstruktion einer nativen Proteinstruktur aus Peptidfragmenten durchgeführt. Ursprünglich konnten die Peptidfragmente nur über eine Peptidbindung verbunden werden. Inzwischen bezeichnet man als Semisynthese auch die Herstellung von Proteomimetika, in denen Proteinfragmente über nichtpeptidische Bindungen verbunden sind. Diese einfachen Konstrukte bestehen aus Modulen von autonom gefalteten Domänen, die die natürliche Konformation des Proteins nachbilden. Die Methode ermöglicht die Synthese von Proteinanaloga und Konjugaten zwischen Proteinen und nicht-proteinogenen Elementen, wie Nucleinsäuren oder Metallchelaten ^[2].

Im Vergleich dazu basiert das '*de-novo-Design*' auf dem Zusammenhang zwischen der Peptidsequenz und der für diese Sequenz möglichen Faltung. Aufgrund dieses Wissens kann man Proteine synthetisieren, die zum großen Teil eine vorhersagbare Konformation annehmen. Diese Konformation kann analog zu der 3D-Struktur bekannter Proteine sein, aber gleichzeitig eine neue Sequenz besitzen. '*De-novo-Design*' ermöglicht also eher die Synthese von neuen Proteinen, als die Wiederherstellung von schon bekannten Strukturen. ^[3]

In der Peptid- und Proteinsynthese unterscheidet man zwischen vier Synthesemethoden: Synthese in Lösung, Synthese auf festem Träger, enzymatische Synthese und rekombinante DNA Technologien. Jede dieser Methoden hat ihre Vor- und Nachteile, die in *Tabelle 1* aufgelistet sind.

Tabelle 1: Vergleich zwischen bekannten Peptid- und Proteinsynthesemethoden ^[4].

Eigenschaften	Synthese auf festem Träger	Synthese in Lösung	enzymatische Synthese	recombinante DNA Technologie
erreichbare Peptidlänge	Oligo- bis Polypeptide	Oligopeptide	Oligopeptide	Polypeptide und Proteine
Schutzgruppenstrategie	völlig geschützt	teilweise bis völlig	teilweise bis minimal	nicht nötig
Substrat- und Reagenzkosten	sehr teuer	teuer	teuer bis ziemlich billig	billig
Reaktionsbedingungen	gefährlich*	gefährlich*	mild	mild
Racemisierung	teilweise	teilweise	keine	keine
Produktsauberkeit	sehr hoch	hoch	mittel bis hoch	niedrig bis mittel
Entwicklungsstadium	erforscht	erforscht	in Entwicklung	in Entwicklung
Anwendung	Anwendung begrenzt wegen hoher Kosten, zur Synthese von hochwertigen Pharmazeutika	die bevorzugte Methode zur Herstellung von kurzen und mittellangen Peptidpharmazeutika	mittel- bis hochwertige Pharmazeutika, teilweise attraktiv für Synthese von Zusatzstoffen für Lebensmittelindustrie	zur Produktion von Proteinen und Polypeptiden

* -Toxizität der Kupplungsreagenzien

Nachdem Merifield über die Synthese auf festem Träger (*SPPS - solid phase peptide synthesis*) berichtet hat ^[5-7], wird ständig nach neuen Trägermaterialien, Anknüpfungsfunktionen und geeigneten Kupplungsreagenzien gesucht. Die SPPS ermöglicht zwar Oligopeptide in der Länge von etwa 20 Aminosäuren zu synthetisieren, aber die Synthese von längeren Peptidketten und Proteinen ist nicht möglich, was zur Entwicklung von mehreren Segmentligationstechniken geführt hat ^[8].

Zu den gut erforschten Ligationstechniken gehört die chemische Segmentkupplung^[9], mit Kupplungsreagenzien, die in der Festphasensynthese und bei der Synthese in Lösung verwendet werden. Obwohl in der schrittweise geführten Peptidsynthese (dank der Urethangruppe in geschützten Aminosäuren) keine hohe Racemisierung beobachtet wird, versagen die meisten Kupplungsreagenzien schon bei Segmentkupplungen, bei denen man mit ungeschützten Peptiden arbeitet, und liefern eine hohe Konfigurationsinversion. Aus diesem Grund benutzt man zusätzlich zu den Kupplungsreagenzen N-Hydroxysuccinimid (HOSu) oder Hydroxybenzotriazol (HOBt), was die Racemisierung deutlich reduziert. Außerdem werden ständig neue Kupplungsreagenzien entwickelt. Die besten Resultate in der Segmentkupplung (niedrige Racemisierung und Epimerisierung, hohe Kupplungsausbeute) zeigten HATU und HAPyU ^[10]. Zur Makrocyclisierung eigneten sich am besten BOP, Propylphosphonanhydrid, DCC mit Pentafluorphenol, HAPyU ^[11] und DCC mit DMAP-TFA

Salz ^[12]. Die Kupplungsreagenzien und Reaktionsbedingungen müssen jedoch bei der Segmentkupplung jeweils einzeln optimiert werden.

Dank starker Entwicklung von SPPS-Techniken ist heute die Synthese von Oligopeptiden überhaupt kein Problem mehr und kann sogar völlig automatisiert werden. Etwas komplizierter sind dann die Verknüpfungen von Oligo- und Polypeptiden miteinander, um ein Protein aufzubauen. Die Methoden müssen sehr häufig für den einzelnen Fall optimiert werden. In den letzten Jahren wurden mehrere Segmentverknüpfungstechniken entwickelt, von denen die Wichtigsten beschrieben werden sollen.

Eine häufig benutzte Segmentligationstechnik ist *solid phase chemical ligation* (SPCL) ^[13]. Die zwei über SPPS synthetisierten Segmente, von denen eines noch mit dem festen Träger verknüpft und das andere gelöst und teilweise geschützt ist, reagieren miteinander. Die Reaktion findet statt zwischen einem Thiolester am C-Terminus eines Peptides und einem N-terminalen Cystein des zweiten Fragments. Nach der Umesterung zum Thioester und spontaner Umgruppierung zwischen der Aminogruppe des N-terminalen Cysteins und dem Thiolester entsteht eine Amidbindung zwischen zwei Peptidfragmenten (*Abbildung 1*).

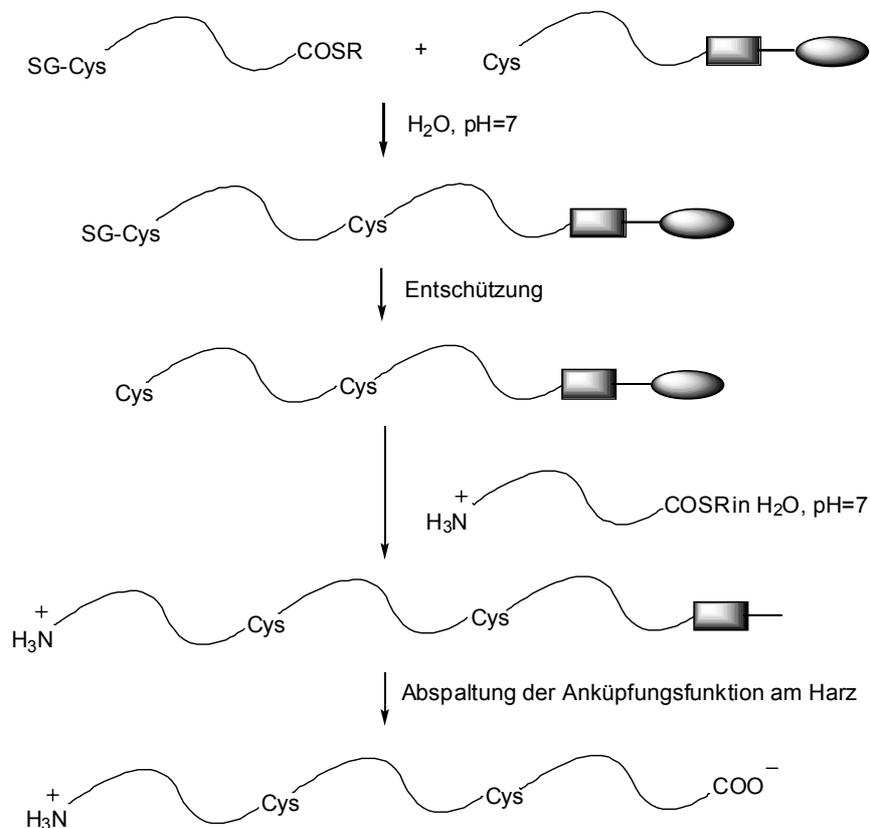


Abbildung 1: Schema der solid-phase-chemical-ligation.

Eine ähnliche Methode, die nicht auf festem Träger sondern in Lösung durchgeführt wird, ist die *native chemical ligation* (NCL) ^[14]. Die NCL gehört in der Semisynthese von Proteinen zu den am häufigsten verwendeten Methoden. Der erste Schritt ist chemoselektiv und findet bei physiologischem pH-Wert zwischen einem aminoterminalen Cystein des ersten Peptids und einer Thioestergruppe des zweiten Peptids statt. Genauso wie in der oben beschriebenen Methode folgt auf die Thioumesterung ein S zu N Acyltransfer und am Ende wird eine Peptidbindung gebildet (*Abbildung 2*).

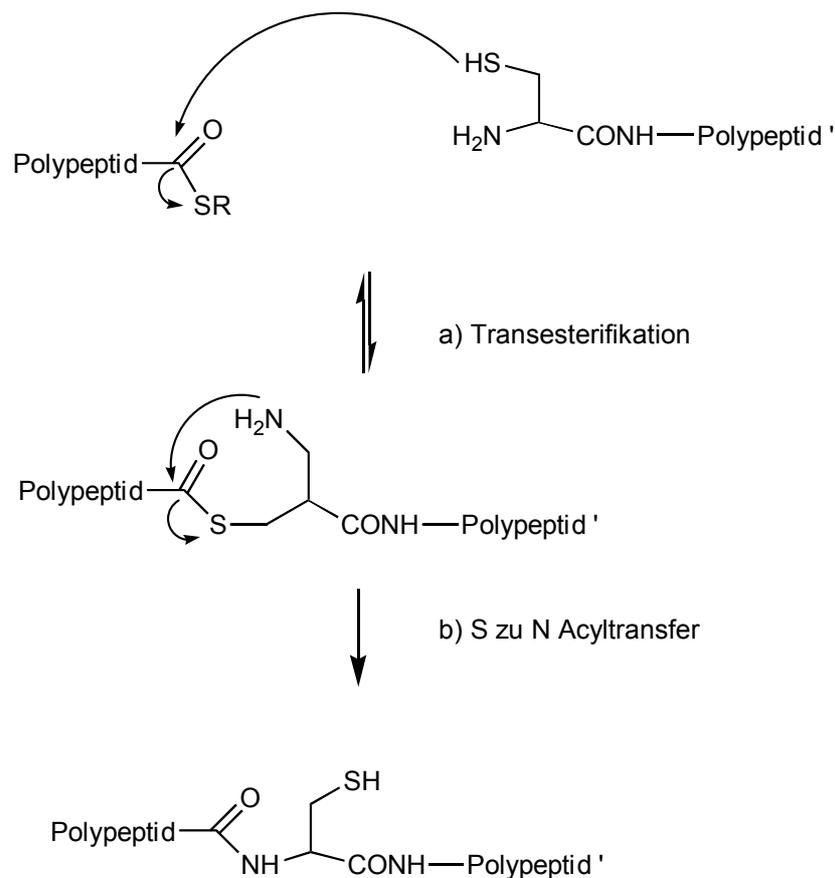


Abbildung 2: Native chemical ligation.

Thioumesterung und S(O) → N Acyltransfer sind auch Schlüsselreaktionen im 'Protein-Spleißens-Process'. Dieses Prozess wurde in den letzten 10 Jahren erforscht, nachdem man festgestellt hatte, dass manche Gene primäre Aminosäuresequenzen kodieren, die man später nicht in reifen Proteinen findet. Aufgrund der eigenartigen Eigenschaften von diesen ausgeschnittenen Polypeptiden konnte man als Mechanismus '*mRNA-splicing*' ausschließen. Der Prozess des Proteinspleißens ist ein Ana-

logprozess zum 'RNA-splicing'. Im 'RNA-splicing' werden bestimmte RNA-Ketten, sgn. Introns, aus mRNA ausgeschnitten, bevor es zur Translation von Proteinen kommt. Im Prozess des *Proteinspleißens* werden bestimmte Polypeptidketten sgn. Inteine aus Proteinprecursoren posttranslational ausgeschnitten (*Abbildung 3*). Inteine sind Polypeptidketten, die posttranslational aus einem Proteinvorläufer ausgeschnitten werden. Sie sind enzymähnliche Stoffe, die die Proteinverknüpfung zwischen zwei Polypeptidketten (Exteinen) katalysieren. Der Prozess ist vergleichbar mit einer Verknüpfung von RNA Ketten - Exons mit gleichzeitigem Freisetzen von Introns. Man hat bisher etwa 100 Inteine identifiziert und alle besitzen Ser oder Cys am N-Terminus und die Aminosäuretriade, His-(Asp/Gln)-(Ser/Thr/Cys) am C-Terminus. Diese Aminosäuren sind unentbehrlich, um den Prozess des 'protein splicing' zu beobachten. (*Abbildung 4*)

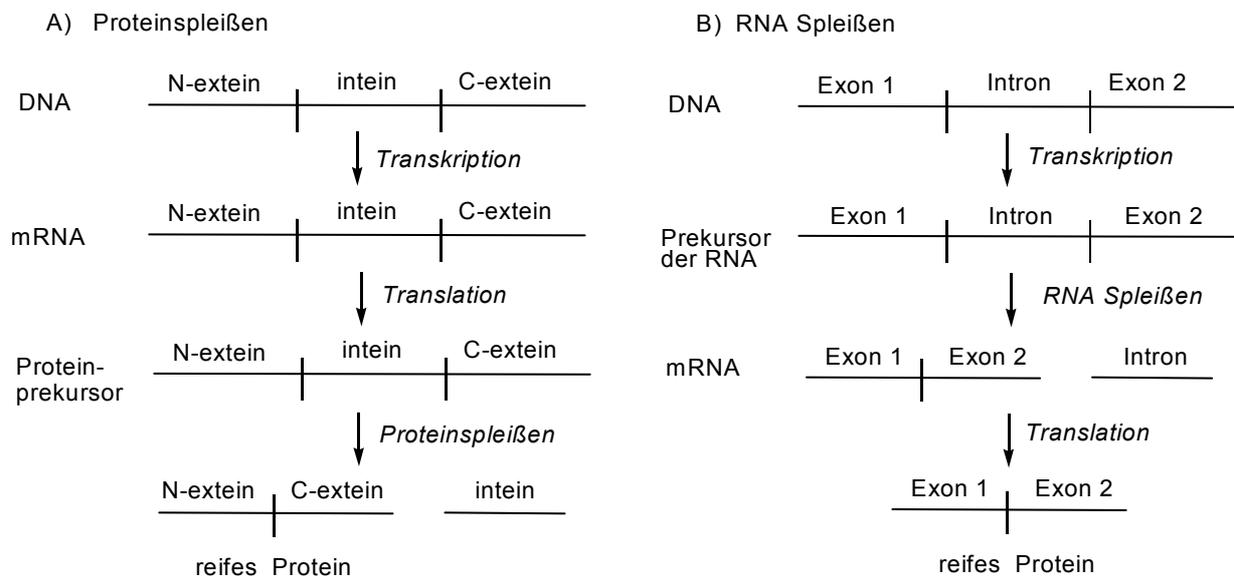


Abbildung 3: Vergleich zwischen Proteinspleißen und RNA-splicing.

Die Rolle und Eigenschaften des Inteins wurden in den letzten Jahren besser verstanden ^[15]. Seit dieser Zeit verwendet man Intein vermittelte Kupplung (*intein mediated protein ligation*) in der Proteinsynthese. Die IPL (*intein-protein-ligation*) kann man sowohl zur Segmentknüpfung als auch zur Kopf-Schwanz Proteincyclisierung¹

¹ Kopf-Schwanz Cyclisierung ist eine Bezeichnung für Cyclisierung zwischen N- und C-terminalem Ende von Polypeptiden oder Proteinen.

benutzen ^[16-18]. Die Intein vermittelte Proteinspaltung kann man nicht nur zur Segmentkupplung zwischen zwei Peptiden verwenden, sondern auch zur Herstellung von Reinigungsvektoren ^[15, 19], selbstspaltenden Elementen mit einer Affinität zu bestimmten Proteinen (z.B. Avidin, Streptavidin, Glutathion, Antikörper), Übergangsmetallen oder Zucker (z.B. Maltose, Chitin), so dass man sie auf Affinitätssäulen von anderen Proteinen leicht abtrennen kann (z.B. IMPACT - *intein-mediated-purification-with-an-affinity-chitin-binding-tag*).

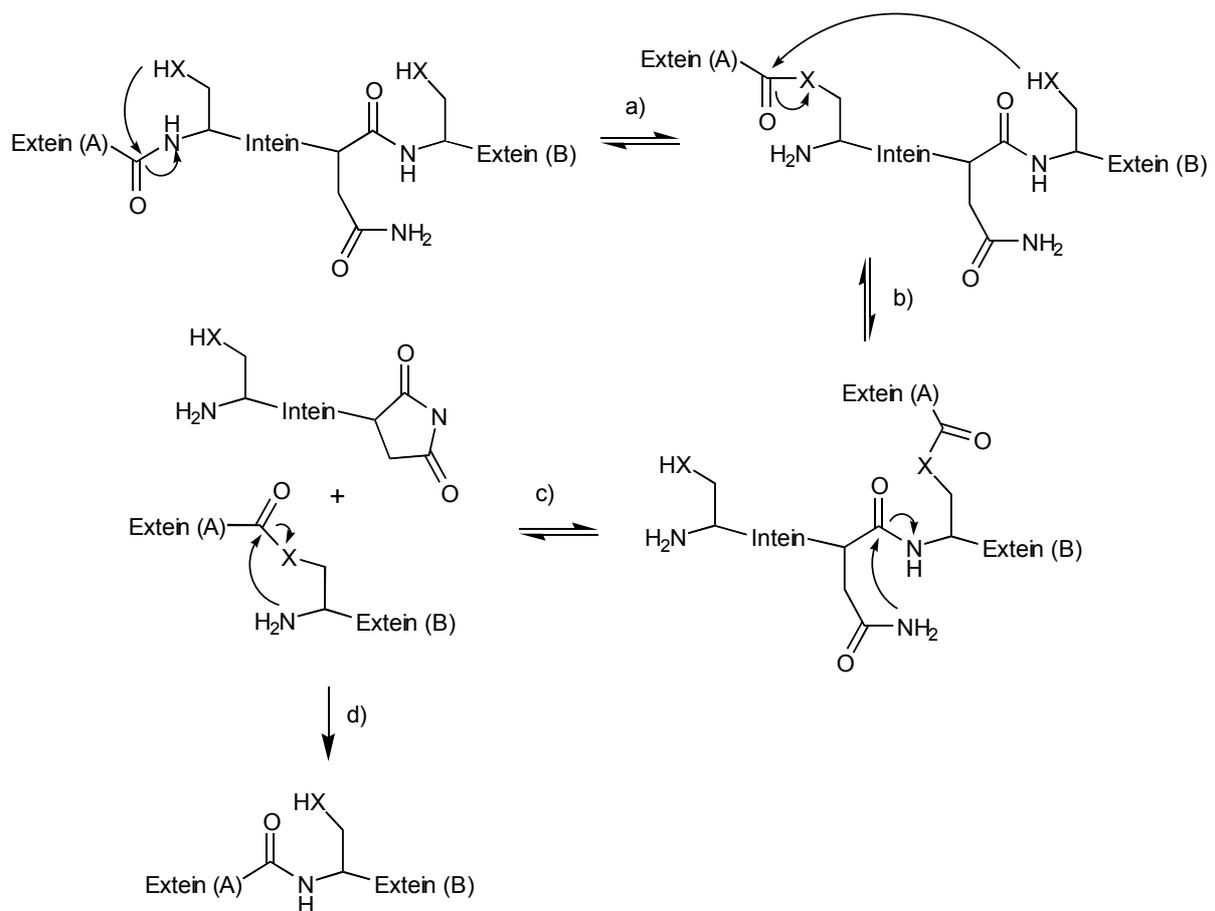


Abbildung 4: Mechanismus des Proteinspleißens.

- N*→*O*(*S*) Acyltransfer in Serin oder Cystein am *N*-Terminus
- Umesterung, in der ein verzweigtes Intermediat mit zwei *N*-Termini gebildet wird
- Cyclisierung von Asn oder Gln unter Freisetzung des Inteins
- O*(*S*)→*N* Acyltransfer im Serin, Threonin oder Cystein, der zur nativen Amidbindung zwischen zwei Exteinen führt

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit ist *'trans-splicing'* - durch Intein verursachte Verknüpfung von zwei Proteinen, die in zwei unterschiedlichen Mikroorganismen produziert wurden. IPL (*intein-protein-ligation*) wurde ausserdem bei Kopf-Schwanz Cyclisierung von Proteinen ^[17, 18] und zur Einführung von nicht natürlichen Aminosäuren ^[20-26], wie Selenocystein ^[20, 21] bzw. Iminodiessigsäure (Ida) ^[22] verwendet.

Zu weiteren Segmentligationstechniken gehört die *tandem-pseudoproline-ligation* ^[27]. Die Methode eignet sich zur Peptidsegmentverknüpfung in prolinreichen Peptiden. In der Reaktion zwischen einem Glykolaldehyd am C-Terminus eines Peptides und einer Aminosäure mit zwei nukleophilen Gruppen (Cystein, Serin oder Threonin) am N-Terminus des zweiten Peptides bildet sich Thiaprolin oder Oxaprolin (*Abbildung 5*).

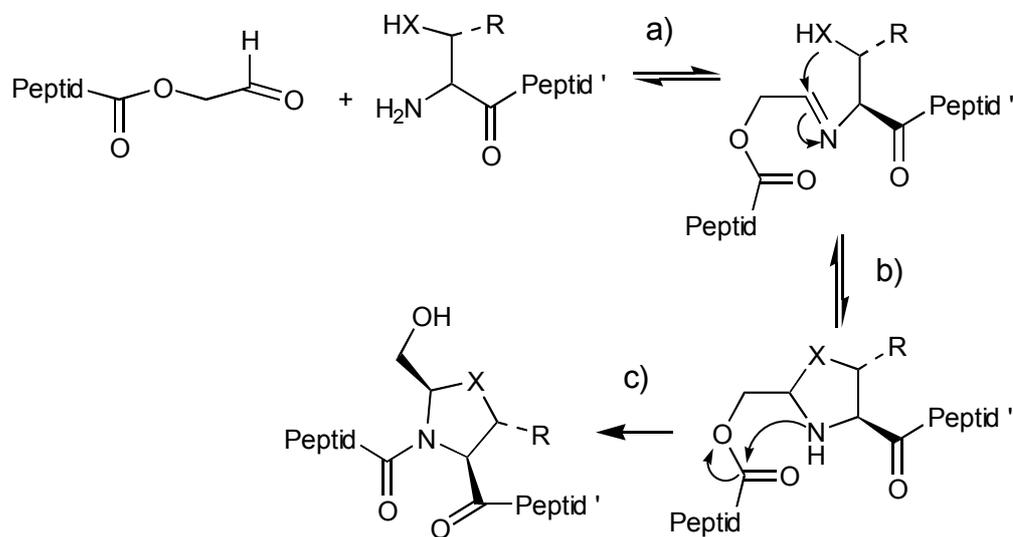


Abbildung 5: Tandem Pseudoproline Ligation

a) *Bildung des Iminintermediats*

b) *Ring-Kette Tautomerisierung unter des Bildung Thiazolidin- oder Oxazolidinesterintermediats*

c) *O(S)→N Acyltransfer, Bildung von Thiaprolin oder Oxaprolin.*

Die Segmentverknüpfungstechniken werden sehr häufig zur Kopf-Schwanz Protein-cyclisierung verwendet. Außer der oben beschriebenen *intein-mediated-ligation* ^[17, 18] wurde auch eine *'thia-zip'* Reaktion ^[28] zum Ringschluss verwendet. Die Reaktion ist analog zur *'aza-zip'* Reaktion und findet zwischen einem Thiolester und einer freien Thiolgruppe des Cysteins statt. Nach der Thiolveresterung bildet sich zunächst ein Thiolacton, das durch Austausch von weiteren Thiolgruppen einen immer größeren

Ring einschließt. Am Ende bildet sich ein α -Aminothiolacton, das sich nach einem S,N-Acyltransfer in ein cyclisches Peptid umwandelt. Die Methode ermöglicht den Ringschluss von bis zu 33 Aminosäuren. (Abbildung 6)

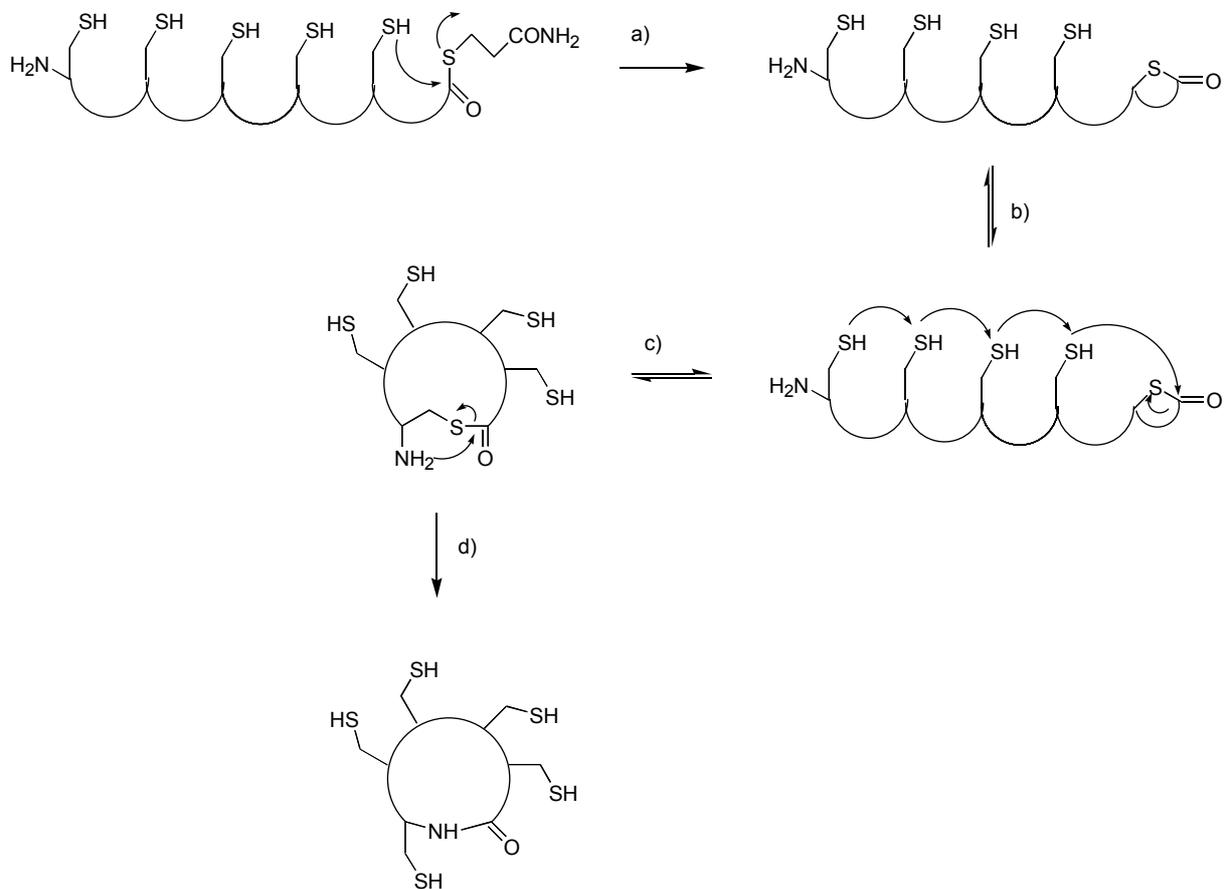


Abbildung 6: Thia-Zip Reaktion.

- a) Thiolactonbildung
- b) Thiolactonaustausch
- c) Bildung des α -Aminothiolactons
- d) S,N-Acylmigration

Viele der modernen Proteinmodifikationsmethoden basieren auf genetischen Techniken. Die positionsgerichtete Mutagenese (*site-directed-mutagenesis*) bietet eine Möglichkeit zur Einführung einer gewünschten Aminosäure an einer bestimmten Position in der Primärsequenz. Statt einer natürlichen Aminosäure kann auch eine nicht-proteinogene Aminosäure, (z.B. Iminodiessigsäure (Ida) ^[22]) eingebaut werden.

Die durch Semisyntese synthetisierten, modifizierten und rekonstruierten Polypeptide müssen noch in eine definierte räumliche Struktur gefaltet werden, damit sie bio-

logische Aktivität erlangen. Trotz intensiver Forschung auf diesem Gebiet ist es immer noch schwierig, zuverlässige Aussagen darüber zu treffen, welche dreidimensionale Struktur das synthetisierte Protein annehmen wird. Diese Faltungsprobleme versuchte man in dem 'de-novo-Design' dadurch umzugehen, dass man Peptidblöcke, die mit hoher Wahrscheinlichkeit eine bestimmte 3D-Struktur annehmen, miteinander fixiert.

In der Literatur wird seit Jahren ein TASP-Konzept (*Template-Assembled-Synthetic Proteins*)^[29-35] als Beispiel für 'de-novo-Design' beschrieben, in dem man auf einem Templat kovalent gefaltete Bauelemente: Helices, β -Faltblätter, Schleifen usw. anknüpft. Das Templatmolekül dient dazu, die Faltung kovalent fixierter Peptidblöcke in einer vorgegebene Packungsanordnung zu dirigieren.

Am häufigsten werden vier α -helikale Einheiten an einem Peptidgerüst als Templat angeknüpft, so dass man ein Helixbündel erhält^{[30],[32]}. Die Helices werden kovalent über Oximbindungen^[31] oder Thioetherbindungen^[29] bzw. S-Alkylbindungen^[30] verknüpft. Entwickelt wurden auch Sandwich-TASP,^[33] (Abbildung 7) in dem man 4 α -helikale Einheiten zwischen zwei Gerüsten eingebaut hat. Die mit hoher Wahrscheinlichkeit vorhersagbare räumliche Struktur des TASP-Proteins ermöglicht den Einsatz dieser Methode zur Herstellung von Proteinmimetika und künstlichen Bindungsstellen für Rezeptoren und Antikörper.^[34]

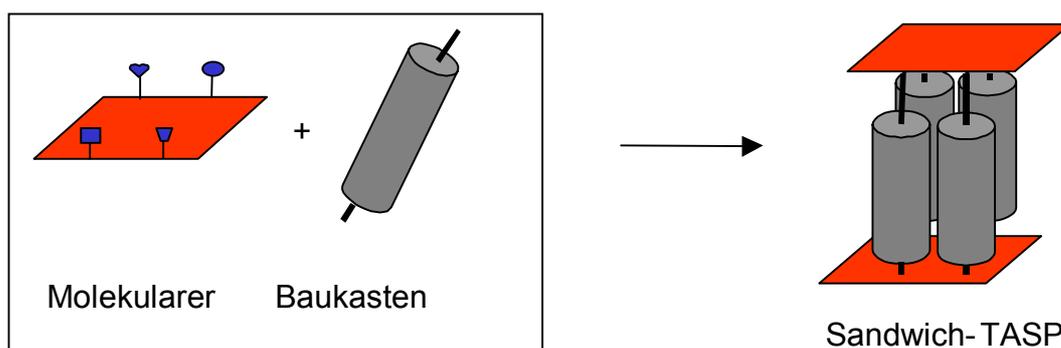


Abbildung 7: Das TASP-Prinzip im Protein-de-novo-Design.

'De-novo-Design' wurde auch als Werkzeug im *enzyme-engineering* genutzt. Auf Basis dieses Konzeptes wurde eine künstliche Ligase synthetisiert^[35]. Die Ligase bestand aus 33 Aminosäuren, die eine α -Helixkonformation annahmen. Die hydropho-

ben Aminosäuren befanden sich nur auf einer Seite der Enzymhelix, so dass sie über die hydrophoben Reste der helikalen Substrate miteinander interagieren konnten. Das künstliche Enzym katalysierte die Verknüpfung von Oligopeptiden: $S_1 + S_7$, $S_1 + S_8$, $S_4 + S_7$, $S_5 + S_7$ (die Zahl beschreibt die Zahl der Aminosäuren in der Peptidkette. (Abbildung 8)

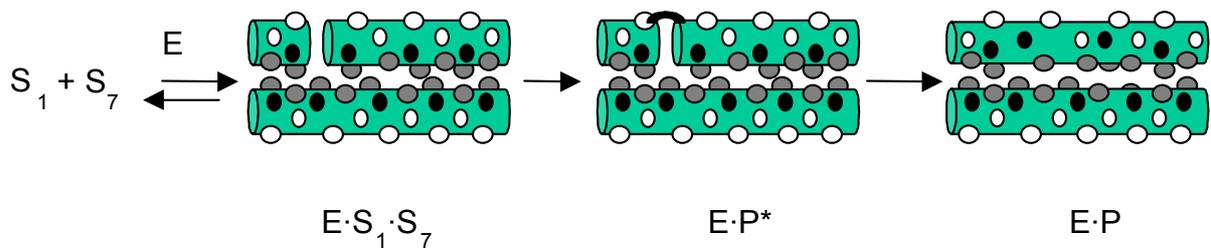


Abbildung 8: Reaktionsmodel der Peptidsynthese mit einer künstlichen Ligase als Katalysator. Peptidfragmente (S_1 , S_7) werden über elektrostatische Wechselwirkungen am Katalysator gebunden, dabei bildet sich ein Enzym-Substrat-Komplex ($E \cdot S_1 \cdot S_7$). Der Komplex erleichtert dann Bildung eines neuen Peptides (P) mit Thioester als Zwischenverbindung (P^*).

2. Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war eine selektive N-terminale Modifikation von Proteinen unter Reaktionsbedingungen, die die native Struktur des Proteins nicht schädigen. Die Modifizierung sollte eine regioselektive Einführung von unnatürlichen Gruppen ermöglichen, die die physikalischen, chemischen oder funktionellen Eigenschaften des Proteins verändern. Die erworbenen Proteinkonjugate können unter anderem eine Anwendung in Studien über Struktur, Dynamik und Selbstorganisation von Proteinen finden. Da die Modifikationsmethode eine Einführung eines möglichst breiten Spektrums an funktionellen Gruppen ermöglichen sollte, hat man eine Strategie gewählt, die aus zwei Schritten besteht. Im ersten enzymatischen Schritt sollte eine chemo-, regio- und stereoselektive Einführung einer Hilfsgruppe stattfinden, die dann chemo-selektiv modifizierbar ist. Diese Gruppe sollte dann im zweiten Schritt eine gezielte, selektive chemische Modifikation eingehen, bei der man die tatsächlich gewünschte funktionelle Gruppe einführt. (Abbildung 9)

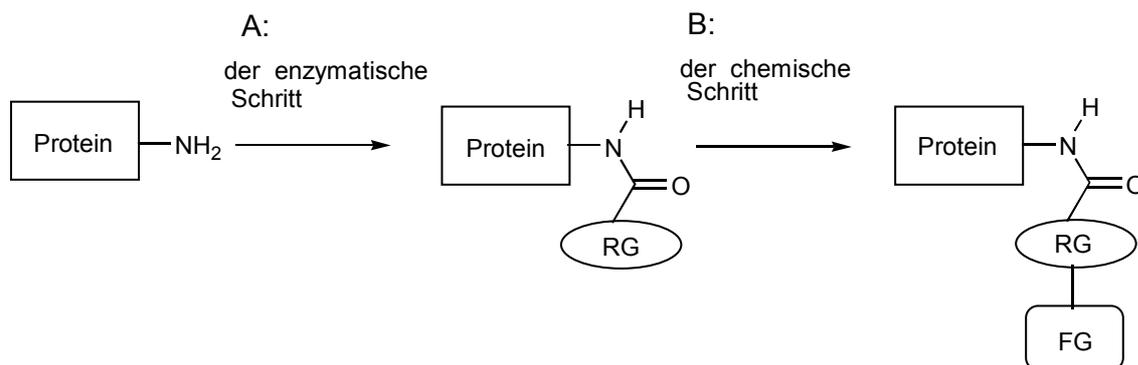


Abbildung 9: Zwei-Schritt-Strategie zur regioselektiven, N-terminalen Proteinmodifizierung. RG - reaktive Gruppe, eine chemisch leicht modifizierbare Gruppe, die in der zweiten Stufe eine selektive Reaktion eingehen kann. FG - eine unnatürliche, funktionelle Gruppe.

Da das modifizierte Protein seine natürliche Faltung behalten sollte, müssen die beiden Schritte unter sehr milden Bedingungen (wässrige Lösung, Raumtemperatur, nahe physiologischem pH-Wert) durchgeführt werden.

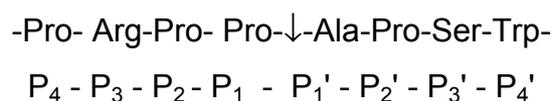
In dieser Arbeit sollte der erste, enzymatische Schritt der beschriebenen Modifikationsstrategie entwickelt werden. Als geeignete Modifikationsmethode wurde die 'reverse Proteolyse' gewählt, die eine proteasekatalysierte Bildung einer Peptidbindung ist. Proteasen sind Enzyme, die eine Spaltung von Peptidbindungen katalysieren. Da

k_{Hyd}). Bei $k_{\text{Amin}} \cdot [\text{Amin}] > k_{\text{Hyd}} [\text{H}_2\text{O}]$ wird mehr Peptidprodukt gebildet als Acylenzymderivat hydrolysiert, was zur Akkumulation des Peptides führt. Das entstandene Peptid kann wieder durch die Protease abgebaut werden, weshalb man die Synthese kinetisch verfolgen und beim Erreichen der maximalen Produktkonzentration unterbrechen muss. Die Voraussetzung für eine erfolgreiche Peptidsynthese ist, dass das entstandene Peptid langsamer abgebaut wird, als der Acyldonor das Enzym beladen kann.

Durch Verwendung von hochspezifischen Proteasen kann man Regioselektivität gewinnen, so dass die Reaktion nur an einer einziger Stelle stattfindet. In dieser Arbeit wurde eine IgA-Protease verwendet. Diese Endoprotease zeichnet sich durch eine sehr hohe Spezifität zu einer Peptidsequenz aus, die in Proteinen sehr selten vorkommt, nämlich -Pro-Pro-X-Pro-, wo X = Ala oder Gly ist. Diese Protease ist inzwischen kommerziell erhältlich.

Als Modifikationsstelle wurde der N-Terminus gewählt, da die Mehrzahl der Proteine einen N-Terminus mit freier α -Aminogruppe, die chemisch von anderen nucleophilen Resten unterschiedlich ist, enthält. Der N-Terminus ist in der Regel ein wenig strukturiertes, ungefaltetes Element, das zufällige Konformationen annimmt (*random coil*). Der N-Terminus ist häufig exponiert gegenüber der gefalteten Struktur und dadurch für andere Moleküle leicht zugänglich. Das ist in diesem Fall unabdingbar, da der N-Terminus fähig sein sollte, an das aktive Zentrum des Modifikationsenzym gebunden zu werden.

Diese Arbeit ist eine Fortsetzung von Untersuchungen durch C. Seitz, der in seiner Dissertation ^[36] sehr ausführlich die Substratspezifität der IgA-Protease untersucht hatte. Dabei wurde festgestellt, dass die folgende Substratsequenz im Acyldonor und im Nucleophil zur schnellsten Kupplung der Fragmente und damit zu hohen Ausbeuten führt.



wobei die $P_1 \dots P_n$ Aminosäurepositionen des Acyldonors und $P_1' \dots P_n'$ Aminosäurepositionen des Nucleophils sind (Nomenklatur von Schechter und Berger^[37], ausführlicher in dem Kapitel 'Reverse Proteolyse' beschrieben). Außerdem hat er die enzymatische Modifikationen von mehreren Peptiden durchgeführt, z.B. β -Casomorphin-5

(human), Carbohydrate Structure Mimicking Peptide (CSMP), Bradykinin, α -Bag Cell Peptid (α -BCP), Allatostatin I, Adrenocorticotropic Hormon (ACTH) (11-24) human.

In dieser Arbeit wurden hauptsächlich die Reaktionsbedingungen der reversen Proteolyse für Modellpeptide und Proteine optimiert. Das Ziel war die Herstellung von Peptid- und Proteinkonjugaten, die ausschließlich am N-Terminus durch Einführung von unnatürlichen Gruppen modifiziert wurden, was in *Abbildung 11* noch einmal zusammengefaßt wurde.

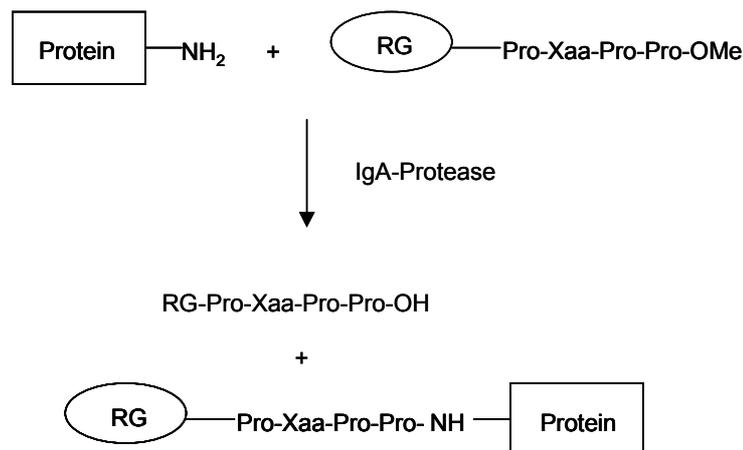


Abbildung 11: N-terminale Einführung einer reaktiven Gruppe (RG) in der Reaktion der kinetisch kontrollierten reversen Proteolyse.

Die ausgewählte Proteinmodifikationsmethode könnte nicht nur die Einführung von unnatürlichen Gruppen, sondern auch die Bildung von Proteinfusionen, Verknüpfung von Proteinsegmenten und Einführung von nicht-proteinigen Aminosäuren (auch isotopmarkiert) in die Proteine ermöglichen. Die breite Palette von Modifikationsmöglichkeiten und Eigenschaften wie Regio-, Chemo-, und Stereoselektivität, sowie Umweltfreundlichkeit bestätigen die Konkurrenzfähigkeit dieser Methode im Vergleich mit anderen schon bekannten Proteinmodifikationsmethoden, die im nächsten Kapitel beschrieben wurden.

3. Modifikation am N-Terminus

Bei Proteinmodifikationen spielt der N-Terminus eine privilegierte Rolle. Jedes Protein enthält einen N-Terminus, der in der Regel nicht strukturiert ist. Das Aminoende liegt isoliert von gefalteten Proteindomänen vor und ist in aller Regel leicht zugänglich für Lösungsmittel und aktive Reagenzien. Aus diesem Grund sollte der N-Terminus leichter modifizierbar im Vergleich zu den gefalteten Strukturen sein.

Bei der Verwendung von chemischen Methoden zur N-terminalen Modifizierung muss man die Nebenreaktionen mit entsprechend funktionalisierten Seitenketten in Betracht ziehen. Besonders anfällig sind die nucleophilen Seitenkettengruppen, wie die ϵ -NH₂-Gruppe des Lysins, die Thiolgruppe des Cysteins oder die Hydroxygruppen des Serins, Threonins und Tyrosins. Die ϵ -Aminogruppen von Lysin gehen die meisten störenden Reaktionen ein und müssen entweder blockiert werden, oder die Modifizierungsreaktion an der α -Aminogruppe muss unter solchen Bedingungen durchgeführt werden, dass die Lysinseitenketten inaktiv bleiben und die gewünschte Modifikation nur am N-Terminus stattfindet. Viele organische Lösungsmittel, manche Reagenzien, extreme pH-Werte und Temperaturen können zur Vernichtung der nativen Proteinstruktur führen. Aus diesem Grund behalten die meisten chemisch modifizierten Proteine nur einen kleinen Teil der natürlichen biologischen Aktivität. Trotz optimierter chemischer Methoden wird ständig nach Alternativen gesucht, die möglichst wenig Nebenprodukte bilden und die unter milden, ' proteinschonenden ' Bedingungen funktionieren.

Eine viel versprechende Methode ist die enzymatische Modifikation. Besonders geeignet sind proteolytische Enzyme, die durch Anwendung von reverser Proteolyse nicht nur zur Spaltung sondern auch Wiederherstellung von Peptidbindungen fähig sind. Ein Vorteil der enzymatischen Modifizierung ist die Regiospezifität, denn die Reaktion findet nur in der Hauptkette und dort nur an der Stelle statt, die über eine für die Protease spezifische Sequenz verfügt. Die Reaktionsbedingungen sind häufig sehr mild. Ein wässriges, nicht-denaturierendes Milieu, milde Temperaturen, physiologische pH-Werte schädigen nicht die native Struktur des Proteins, so dass man eine Chance hat, biologisch aktive Derivate nach der Modifikation zu erhalten.

Das Ziel von regiospezifischen N-terminalen Modifikationen ist eine gezielte und kontrollierbare Einführung von künstlichen oder natürlichen Gruppen, die dann die chemischen, physikalischen, biologischen oder technologischen Eigenschaften des Pro-

teins ändern. Die Löslichkeit in Wasser, thermische Stabilität, Ladung, Größe, Affinität zu Membranen und viele andere Eigenschaften können auf diese Art variiert werden. Die Auswahl der angeknüpften Einheit eröffnet durch ihre Funktion eine ganze Reihe von Anwendungsmöglichkeiten (*Tabelle 2*).

Tabelle 2: Die funktionellen Gruppen in modifizierten Proteinen, ihre Eigenschaften und Anwendungen.

eingeführte Gruppe	erworbene Eigenschaft	Anwendung
Chromophore ^[48]	erhöhte UV-Absorption	klinische und diagnostische Studien, erleichterte Proteinanalytik, Studien über Proteine und ihre Interaktionen mit der Umgebung in vitro
fluoreszierende Gruppen ^{[54] [55] [50] [51] [48]}	stärkeres Fluoreszenzsignal	klinische und diagnostische Studien, erleichterte Proteinanalytik
radioaktiv markierte Atome	Radioaktivität	klinische und diagnostische Studien, Radiopharmazie, erleichterte Proteinanalytik
Chelatgruppen ^{[52] [53] [45]}	Fähigkeit zur Komplexierung von Metallionen, veränderte Ladung, Fähigkeit zur Spaltung von Peptiden, DNA, RNA Kette ^{[86] [87]} , Stabilisierung der Proteinstruktur	erleichtere Separation über Ionenaustauschsäulen, Gelelektrophorese und Affinitätssäulen, Sequenzstudien, Analyse der Funktionalität einzelner Strukturdomänen
Biotin ^{[38] [48] [51] [56]}	erhöhte Affinität zu bestimmten Stoffen (z.B. zu Avidin oder Streptavidin)	vereinfachte Separation der erwünschten Proteine durch Verwendung von Affinitätssäulen, Quantifizierung von Proteinen, effiziente Immobilisierungsmethode
Polymere ^{[57] [49] [41-43]}	erhöhte Thermostabilität, Stabilität gegen proteolytische Angriffe, Affinität zu Membranen	klinische Studien über neue Pharmazeutika (die Immunogenität wird reduziert), Studien über Proteinassoziation, Immobilisierungsmethode
Zuckerbausteine ^[48]	erhöhte Thermostabilität, Stabilität gegen proteolytische Angriffe	klinische Studien über neue Pharmazeutika (die Immunogenität wird reduziert)
Fettsäuren ^{[52] [39]}	Hydrophobie, höhere Affinität zu biologischen Membranen, Fähigkeit zur Aggregation und zur Bildung von Micellen	Studien über Diffusion durch biologische bzw. Modellmembranen, Berechnungen der Bindungsenergie mit der Membran, Studien über Protein-Protein Wechselwirkung, Micellenbildung, Immobilisierungsmethode

Cofaktoren und Coenzyme ^{[40] [58]}	Veränderung oder Modifikation der biologischen Funktionen, neue oder verbesserte Enzymaktivitäten, höhere enzymatische Spezifität	Bildung von neuen oder verbesserten Enzymen (enzyme-engineering)
Ribonucleinsäuren (RNA) ^{[44] [48]}	eine höhere Affinität zu komplementären DNA-Ketten	Untersuchungen von Assoziationen, Vernetzung von Proteinen, Bildung von Enzymkomplexen, die Herstellung von neuen, effektiveren Enzymen, z.B. Nucleasen ^[44] , Immobilisierungsmethode, erleichtere Separation von Proteinen, die eine gewünschte Nukleinsäuresequenz enthalten.

3. 1. Die chemische Modifizierung

Wegen der geringen Spezifität der chemischen Methoden muss man bei der Modifikation der α -Aminofunktion eines Proteins auch Nebenreaktionen mit Seitenketten zum Beispiel mit ϵ -NH₂ Gruppen des Lysins in Betracht ziehen. Um diese unselektive Reaktion zu vermeiden, sollte man zuerst die aktiven Seitenkettengruppen blockieren oder die Reaktion unter solchen Bedingungen durchführen, dass nur die α -Aminogruppe aktiv bleibt. Die Selektivität wird erreichbar durch die unterschiedlichen pKa Werte für α -NH₂ und ϵ -NH₂ Lysinreste (*Tabelle 3*).

Tabelle 3: pKa-Werte für Aminogruppen am N-Terminus von Proteinen und an den Lysinseitenketten.

Aminogruppe	pKa	
α -NH ₂ am N-Terminus	6.8-7.9 ^[46]	8.0 ^[47]
ϵ -NH ₂ Lysin	10.4 ^[46]	10.0 ^[47]

Wenn man die Reaktion beim pH-Wert von 8 führt, ist über die Hälfte der α -NH₂ Gruppen nicht protoniert und dadurch in nucleophilen Substitutionen aktiv, während die ϵ -NH₂ Gruppen von Lysin noch weitgehend protoniert und dadurch unreaktiv sind. In Wirklichkeit erhält man unter diesen Bedingungen jedoch eine Mischung von mehreren Produkten, so dass die Ausbeute an erwünschtem Produkt relativ niedrig ist.

Häufig ist auch ein hoher Zusatz an organischem Lösungsmittel bzw. nicht immer milden chemischen Agenzien notwendig, was in vielen Fällen eine Entfaltung der nativen Struktur der Proteine bewirkt und die biologische Aktivität der modifizierten Proteine reduziert.

Die meisten chemischen Methoden zur Acylierung basieren auf einer Reaktion zwischen einem Aktivester und der freien Aminogruppe. Als Aktivester wird häufig *N*-Hydroxysuccinimidester benutzt. Der Ester ist im Wasser relativ hydrolysebeständig und hat gleichzeitig eine geringe Alkoholsetendenz und reagiert dadurch nicht mit Seitenketten von Serin, Threonin oder Tyrosin. Nur die Lysinreste können Probleme durch Nebenreaktionen verursachen.

Die Gruppe von Deibel ^[48] hat das *recombinant-human-Interleukine-1 β* (rIL- 1 β) bei zehnfachem molarem Überschuß von *Succinimidyl-6-(biotinamido)hexanoat* oder Sulfonsuccinimidobiotin modifiziert. Die Reaktion wurde in mildem, wäßrigem Milieu, unter nativen Bedingungen durchgeführt, so dass man keine Denaturierung des Proteins erwartet hat. Der Acyltransfer war allerdings nicht für den N-Terminus spezifisch. Man erhielt mehrere Produkte durch Lysinbiotinylierung. Das biotinylierte Protein zeigte nur 10% der biologischen Aktivität im Vergleich zu dem unmodifizierten IL-1 β .

Eine ähnliche Strategie, die ebenfalls mehrere Nebenprodukte brachte, wurde bei der Einführung von wasserlöslichen Polymeren an den GCFS (*granulocyte-colony stimulating-factor*) genutzt. ^[49] Der *recombinant human GCSF* (rhg-GCSF) wurde mit dem *N*-Hydroxysuccinimidylester von *Carboxymethylmethoxypolyethylenglycol* (SCM-MPEG) mit einer durchschnittliche Masse von 6000 Da in einem wäßrigen Puffer bei pH = 8.0 umgesetzt. Die Reaktion ergab mehrere Produkte: drei mono-PEG-Formen und mehrere di-PEG-ylierte Produkte. Das monosubstituierte PEG-GCSF hatte eine vergleichbare biologische Aktivität und eine höhere Thermostabilität als das unmodifizierte.

Die Methode auf Basis des Aktivesters hat auch Carlsson ^[50] zur Proteinthiolierung verwendet. Die Anknüpfung von 2-Pyridyldisulphiden brachte eine neue Thiolgruppe ins Protein ein und ermöglichte weitere Modifikationen, sogar Herstellung von reversiblen Protein-Protein Konjugaten, die dann leicht durch eine Reduktion (z.B. mit DTT) gespalten werden konnten (*Abbildung 12*). Diese Technik wurde benutzt zur

Bildung von Proteinkonjugaten zwischen α -Amylase und Urease oder Ribonuclease und Albumin, ist aber zur Einführung von nahezu beliebigen Gruppen anwendbar.

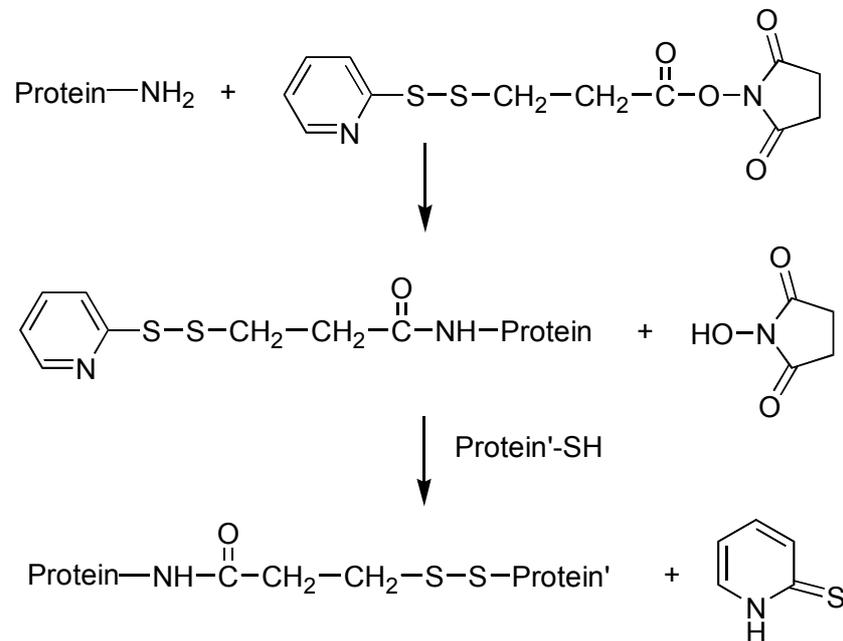


Abbildung 12: Proteinthiolierung.

Eine weitere Methode zur N-terminalen Modifizierung ist die reduktive Alkylierung. Ein Aldehyd bildet in der Reaktion mit einer Aminogruppe eine Schiff Base, die dann mit einem reduzierenden Agenz wie Natriumcyanoborohydrid (NaCNBH_3) reduziert wurde (Abbildung 13). Auf dieser Art und Weise wurde IFN-con (*consensus-human-leukocyte-Interferon*, ein Analogon von natürlichem humanen Leukocyteninterferon) durch reduktive Alkylierung regiospezifisch am N-Terminus mit einem *Methoxypolyethylenglycolaldehyde* (durchschnittliche Masse von 12 kDA) modifiziert ^[49]. Achtfacher Überschuß von *Methoxypolyethylenglycolaldehyd* brachte etwa 80% Ausbeute für das mono-PEG-ylierte Produkt. Dafür wies das PEG-Konjugat aber nur 20% der biologischen Aktivität des unmodifizierten Interferons auf.



Abbildung 13: N-terminale Proteinmodifikation durch reduktive Alkylierung

Eine weitere Methode für eine chemo- und regiospezifische Derivatisierung am N-Terminus basiert auf der Acylierung mit Säureanhydriden oder Säureestern. Ein *bovine-pancreatic-trypsin-inhibitor* (BPTI) wurde über Acylierung mit Fettsäureanhydriden modifiziert.^[51] Da alle freie Aminogruppen die Reaktion eingehen, müssen die vier Lysinreste, die BPTI enthält, vorher blockiert werden. Am besten eignete sich dafür die Guanidierung, da der O-methylisoharnstoff (OMIU) ausschließlich mit γ -NH₂ Gruppen des Lysins und nicht mit N-terminalen α -Aminen reagiert.^[52] Alle Lysinreste wurden deshalb zuerst auf diese Art geschützt, dann wurde die Acylierung mit einem Fettsäureanhydrid durchgeführt. (Abbildung 14)

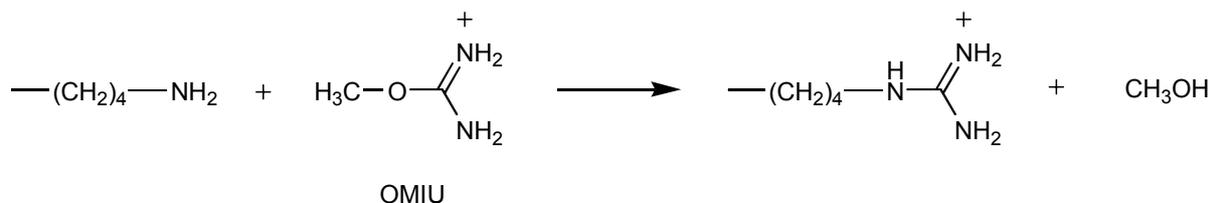


Abbildung 14: Die Guanidierung von Lysinseitenketten.

Die gleiche Modifikationsmethode wurde zur Maleylierung und Citraconylierung von Proteinen (Abbildung 15) verwendet.^[53] Interessant war die Anwendung dieser Reaktion, in der Proteine nach dem Transfer aus dem SDS-PAGE, am N-Terminus maleyliert und citraconyliert wurden. Die beiden Gruppen konnten unter leicht sauren Bedingungen entfernt werden, so dass die N-terminalen Aminosäuren zur Sequenzierung zugänglich wurden. Die modifizierten Phenylthiohydantoin-Aminosäuren können dann nach HPLC Separation analysiert werden. Diese Anwendung vereinfachte die

traditionelle Aufarbeitung von Proteinen nach der SDS-PAGE und reduzierte die Vorbereitungen zur Sequenzierung.

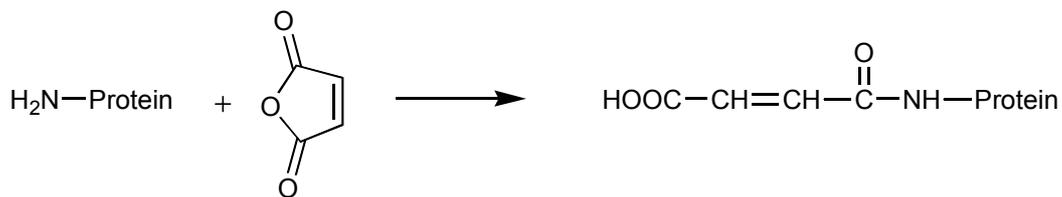


Abbildung 15: Acylierung von α -NH₂ Gruppe mit Maleinanhydrid.

Eine weitere chemische Modifikationsmethode, die auf der Reaktion zwischen Isocyanaten und Aminogruppen basiert, ist inzwischen eine Standardmethode zur Einführung von Chromophoren und fluoreszierenden Gruppen. (Abbildung 16) Met-Myoglobin wurde mit Fluoresceinisothiocyanat und Methylisothiocyanat N-terminal modifiziert.^[54] Die Produkte erhielt man mit 10% bzw. 30% Ausbeute. Ein großer Teil vom Protein blieb unmodifiziert (mehr als 50%). Den Rest bilden die mehrfach derivatisierten Proteine. Die Thiocarbamylation findet unter milden Bedingungen statt (wässrige Lösung, pH=6.5-7), was für die Erhaltung der nativen Struktur sorgte, dafür aber niedrige Ausbeuten brachte. Studien über die Konformation des modifizierten Met-Myoglobin beweisen, dass die native Struktur dabei nicht zerstört wurde.

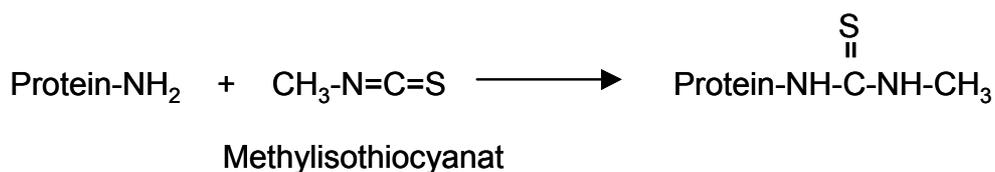


Abbildung 16: Thiocarbamylation der Aminogruppe.

In ähnlicher Reaktion wurde eine Fluoresceineinheit in Insulin eingeführt.^[55] Dabei erhielt man ein bisderivatisiertes Konjugat, da Insulin aus zwei Peptidketten besteht und über zwei α -Aminogruppen verfügt. Die Reaktion wurde mit zweifachem molarem Überschuß von Fluoresceinthiocarbamat und bei pH=9.0 durchgeführt (Abbildung 17).

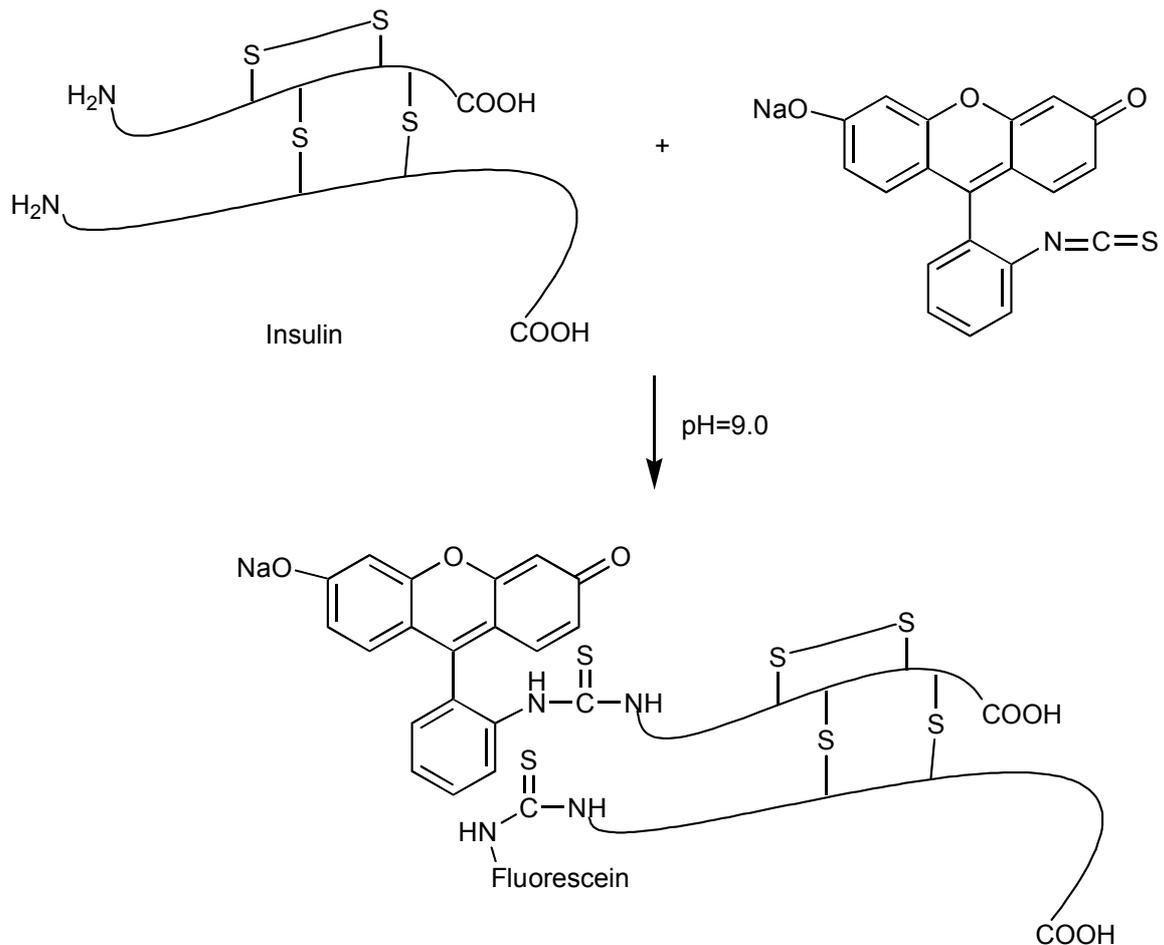


Abbildung 17: Einführung von Fluoresceinthiocarbonylgruppen in das Insulin.

Fluorescein kann man auch nach Oxidation von 2-Aminoalkoholen mit einem Periodat in Proteine einführen. Die Voraussetzung für diese Methode ist ein Threonin, Serin oder Hydroxylysin an der ersten Position. Der 2-Aminoalkohol wird zuerst mit Natriumperiodat (NaIO₄) zu einem Aldehyd oxidiert, der dann von einem Hydrazin, das den erwünschten Fluoreszenzreporter trägt, angegriffen wird, so dass sich im Endeffekt ein Hydrazon-Protein Konjugat bildet.^[56] Das entstandene Derivat enthielt eine nicht natürliche Hydrazonbindung, die aber dabei bei pH = 6-8 über mehrere Stunden bei Raumtemperatur stabil ist. Über Periodat-Oxidation wurde ein *recombinant-murine-Interleukin-1α* (ein 18 kDa großes Cytokin mit Serin am N-Terminus) mit einer Biotineinheit modifiziert (Abbildung 18). Die Periodat-Oxidation wurde bei 0°C durchgeführt, um möglichst wenige Nebenreaktionen zuzulassen.

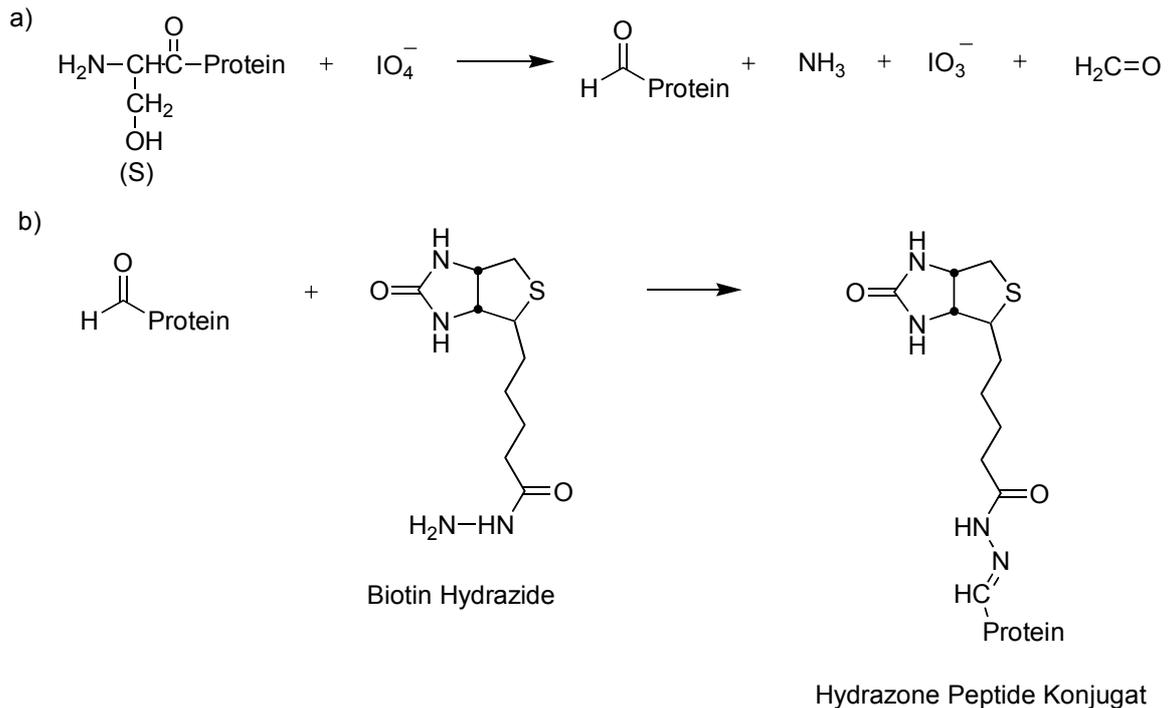


Abbildung 18: Regiospezifische Konjugation. a) Periodat Oxidation. b) Bildung des Biotin-Hydrazon-Protein Konjugats.

Eine Alternative zur N-terminalen Derivatisierung, die sehr häufig zur Kupplung von Peptidsegmenten benutzt wird, ist eine *native-chemical-ligation-reaction*. An einem N-terminalen Cystein findet eine Thioumesterung statt. Das Zwischenprodukt unterliegt einer intramolekularen Umlagerung, so dass im Endeffekt eine Amidbindung entsteht (Abbildung 19). Diese Acyl-Transfer Reaktion ist hochselektiv für ein aminoterminales Cystein, auch wenn das Protein mehrere Cystein- oder Lysinreste enthält. Die Selektivität ergibt sich aus der nicht-reversiblen intramolekularen Umlagerung, bei der aus einer ziemlich labilen Thioesterbindung eine Amidbindung entsteht. Dieser Schritt kann nur an einem Thioester stattfinden, der über eine freie α -NH₂-Gruppe verfügt, also nur an dem N-Terminus. Im Gegensatz dazu kann die Umesterung an mehreren Stellen stattfinden, soweit über eine freie Thiolgruppe verfügt wird. Um die unerwünschten Umesterungen zu unterdrücken, verwendet man einen hohen Überschuss von exogenen Thiolen (z.B. DTT). Eine andere potentielle Nebenreaktion kann zwischen dem Thioester und der ϵ -Aminogruppe des Lysins stattfinden. Diese Reaktion kann man leicht vermeiden, wenn der pH-Wert optimal eingestellt wird. Die

oben beschriebene Modifikationsstrategie wurde zur Einführung von EDTA verwendet,^[57] jedoch ist eine Anknüpfung von beliebigen Gruppen möglich.

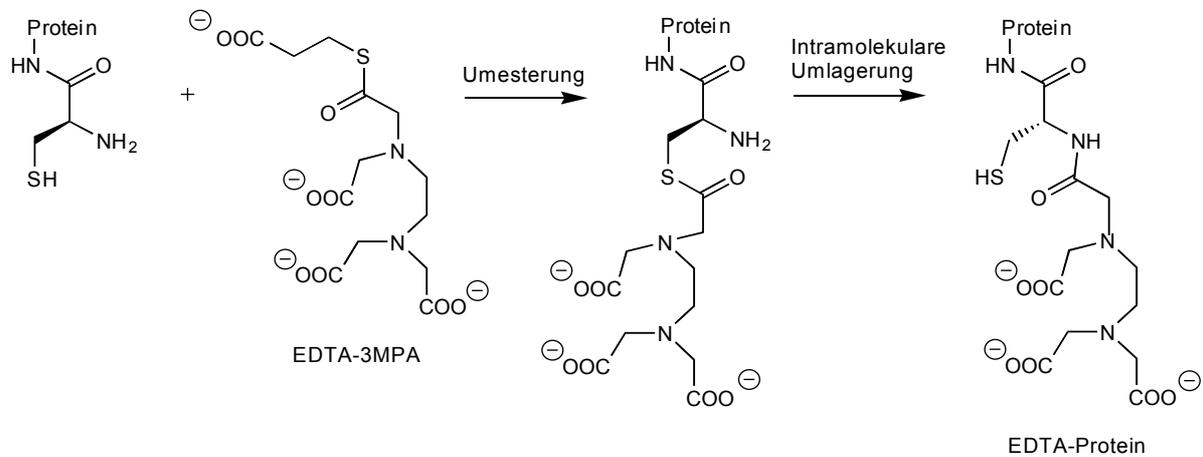


Abbildung 19: Anbindung der EDTA an dem aminoterminalen Cysteinrest des Proteins über 'native chemical ligation'. EDTA-3MPA – EDTA-3-mercaptopropionsäure.

Eine weitere Methode für eine N-terminale Modifizierung, deren Voraussetzung ein Cystein am N-Terminus ist, ist die Bildung eines Thiazolidin Rings. Eine Oxoacylgruppe wird von der nukleophilen Gruppe des N-terminalen Cysteins angegriffen und ein Thiazolidonring gebildet.^[58] Die Reaktion findet unter milden Bedingungen bei niedrigen Temperaturen und in wassermischbaren organischen Lösungsmitteln statt. Der entstandene Thiazolidin Ring ist dann unter physiologischen Bedingungen stabil. Die Methode wurde verwendet zur Präparation von verzweigten Peptiddendrimeren (Abbildung 20), sogenannten *multiple-antigen-peptide* (MAP).

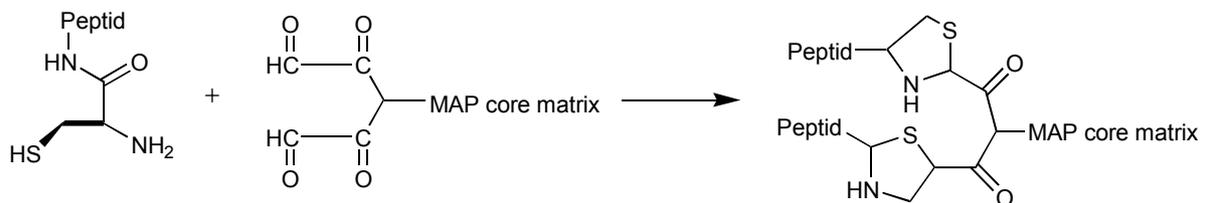


Abbildung 20: Verwendung der Thiazolidin Ring Bildung zur Darstellung von multiple-antigen-peptide.

Alle oben beschriebenen Methoden wurden noch mal in *Tabelle 4* zusammengefaßt.

Tabelle 4: Chemische Proteinmodifikationsmethoden am N-Terminus.

Art der Modifikation	modifiziertes Protein	eingeführte Gruppe	Nebenreaktionen	Literaturstelle
1. Acylierung über Aktivester	rIL-1 α / 10%, rhg-GCSF / vergleichbar mit unmodifiziertem Protein	Biotin, Polymere (PEG)	Lysin	[48] [49]
2. reduktive Alkylierung	IFN con / 20%	Polymere (PEG)		[49]
3. Acylierung mit Säureanhydriden und Säureestern	BPTI	Fettsäuren, Maleinsäure	Lysin, Tyrosin	[40] [51] [49]
4. Acylierung über Isothiocyanate oder Isothiocarbamate	met-Myo, Insulin	Fluorescein, Chromophore	Lysin	[54] [55]
5. Hydrazon Bildung	murine IL-1 α	Biotin		[56]
6. <i>native-chemical-ligation</i>		EDTA	Cystein (der erste Schritt)	[57]
7. Thiazolidin Ring Bildung		Peptiddendrimere (MAP)		[58]

3. 2. Die enzymatische Modifikation

Die enzymatischen Modifikationsmethoden haben zahlreiche Vorteile im Vergleich zu den chemischen Methoden. Die mit Enzymen katalysierte Verknüpfung ist stereospezifisch, mit der absoluten Präferenz für das L-Isomer. Man beobachtet keine Racemisierung, was im Fall der chemischen Peptidsynthese häufig ein Problem darstellt. Die enzymatische Synthese ist chemospezifisch, nur die gewünschte α -Aminogruppe des Proteins und C-terminale Carboxygruppe der Konjugatkomponente reagieren miteinander, so dass Schutzgruppen für Seitenkettenaminogruppen nicht nötig sind, und auch die Hydroxygruppen des Serins und Tyrosins so wie die C-terminale Carboxygruppe nicht angegriffen werden. Die Kupplung ist auch hoch substratspezifisch und findet nur da statt, wo die erforderliche Aminosäuresequenz vorhanden ist.

Zu den wichtigsten posttranslationalen Modifizierungen, die in der Natur bekannt sind, gehört die N-terminale Myristoylierung mithilfe der N-Myristoyltransferase (NMT). Auf diese Art acylierte Proteine haben eine stark erhöhte Hydrophobizität und können stabil mit zellulären Membranen assoziieren. Viele Proteine, die in Signalumwandlungskaskaden involviert sind, benötigen die Anknüpfung des Myristoylrestes für die biologische Aktivität. Sie können als Mediatoren von Protein-Protein Wechselwirkungen fungieren und die korrekte Faltung von anderen Proteinen stabilisieren.

Die Myristoylierung versuchte man in vitro durchzuführen, da die myristoylierten Proteine Substrate für eine weitere, gezielte chemische Modifikation sein können. Mithilfe von NMT können Analoga der Myristinsäure an bestimmte Proteine angehängt werden,^[59] die dann eine Übergangsmetallkatalyse (z.B. eine Palladium katalysierte C-C Bindungsknüpfung) erlauben. Die einzige Voraussetzung für diese Reaktion ist die Aktivierung des Myristoylrestes mit Coenzym A, was mithilfe des Enzyms Acyl-CoA Ligase durchzuführen ist. Der entstehende aktive Thioester ist bereit, die enzymatische Myristoylierungsreaktion einzugehen und eine stabile Amidbindung mit einem endständigen Glycylrest zu bilden (*Abbildung 21*).

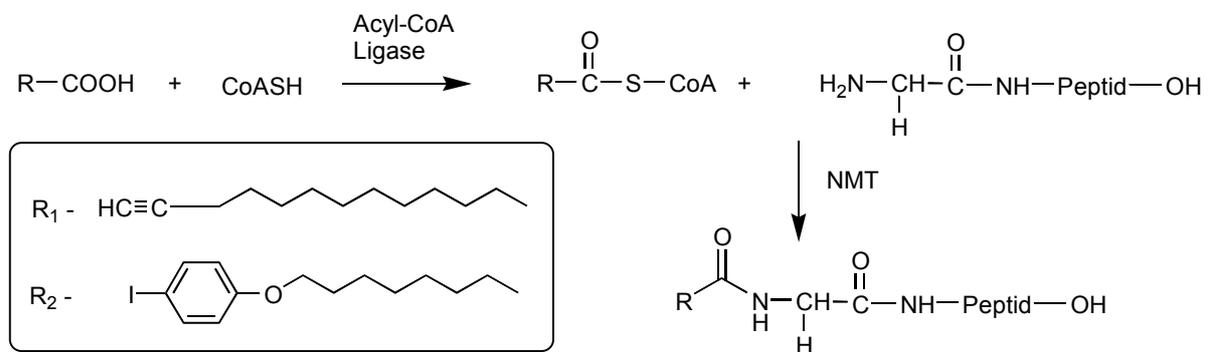


Abbildung 21: Myristoylierung mithilfe der N-Myristoyltransferase.

Meistens werden zur N-terminalen Modifikation proteolytische Enzyme verwendet, die in der reversen Proteolyse fähig zur Bildung der Peptidbindung unter kinetischer Kontrolle sind. Bekannt sind aber hauptsächlich Modellreaktionen, die mit Peptiden durchgeführt wurden. C.Gittel hat in seiner Dissertation^[60] eine Kupplungsreaktion zwischen *H-Pro-Xaa-NH₂* und *H-Trp-NH₂* mithilfe von Dipeptidylaminopeptidase – Cathepsin C beschrieben. An der Xaa Stelle wurden unnatürliche Aminosäuren, wie Cystein oder Lysin mit Phenanthrolin-, p-Iodophenyl-, o-Nitrobenzyl- oder Biotinein-

heiten eingeführt (Abbildung 22). Die Reaktion diente als Modellreaktion für N-terminale Peptid- und Proteinmodifikationen, die später an Bradykinin, *gastrin-releasing-factor* (GRF), Insulin, Aprotinin und RNase A durchgeführt wurden. Das gleiche Enzym hat man verwendet für eine enzymatische Kupplung zwischen Dipeptid *H-Pro-Xaa-NH₂* und dem Tripeptid *H-Lys-Leu-Phe-NH₂*. Die Reaktion diente als Modell zur N-terminalen Verlängerung an *myosine-light-chain-kinase-inhibitor* (MLCKI).^[61] Für eine spezifische Derivatisierung des MLCKI mit *H-Pro-(p-I-Phe)-NH₂* brauchte man einen 20-fachen Überschuß vom Acyldonor und Zusatz von DTT und KCl. Die Reaktion wurde von Cathepsin C in wäßrigem Puffer bei pH=7.9 und einer Temperatur von 24°C katalysiert.

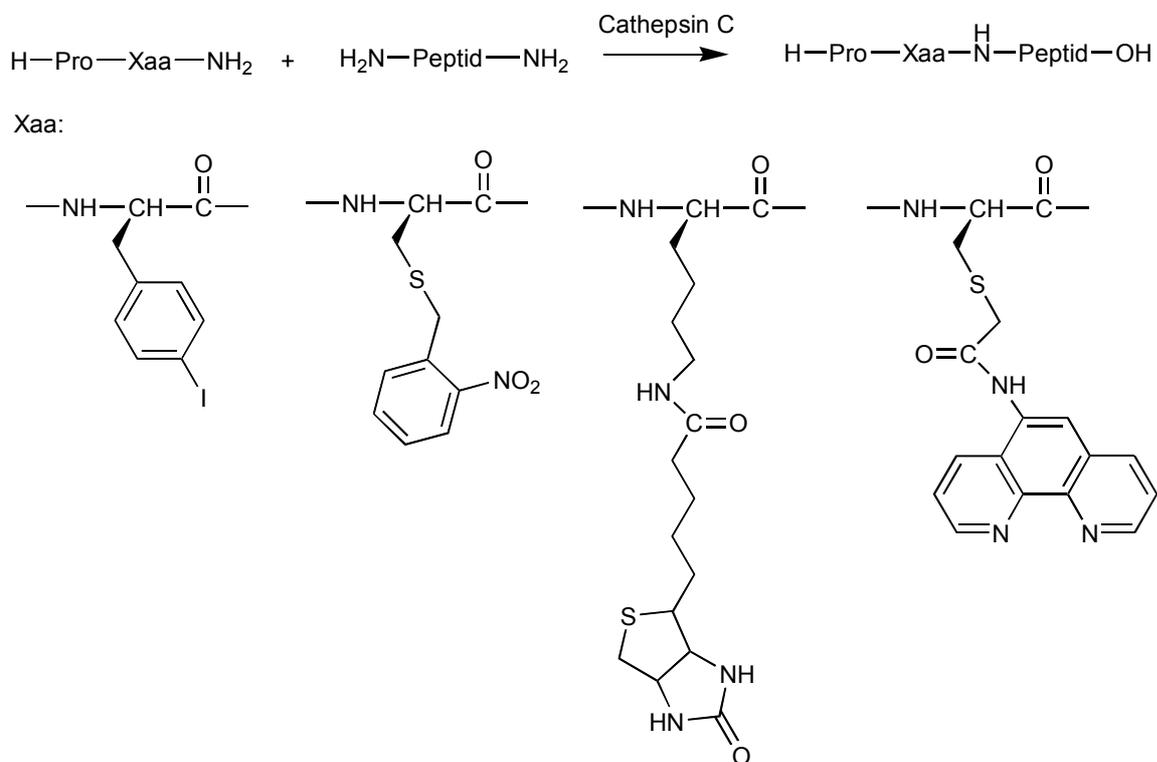


Abbildung 22: N-terminale Modifizierung mithilfe von Cathepsin C.

Ähnliche Studien wurden mit Neutrase, einer Metalloendprotease aus *Bacillus subtilis*, durchgeführt.^[62] Verschiedene Schutzgruppen (Z-, Fmoc-, Ac-, PhAc-, For-, Boc-) wurden durch einen enzymatischen Acyltransfer von einer geschützten Aminosäure auf ein Leucinamide angeknüpft. Die Ausbeute war sehr unterschiedlich (zwischen 9

und 99%), abhängig davon welche Aminosäurederivate als Acyldonor verwendet wurden. Da die Reaktion in Acetonitril mit 4% Wassergehalt gemacht wurde, findet sie wahrscheinlich kaum eine Anwendung in der Proteinmodifikation.

Eine weitere Modifikation von Peptiden in der kinetisch kontrollierten Peptidsynthese wurden mit Alkalase durchgeführt.^[63] Alkalase ist eine Mischung von Proteasen aus *Bacillus licheniformis*, das hauptsächlich aus Subtilisin Carlsberg besteht. Die Reaktion erreichte in wasserfreiem 2-Methyl-2-propanol die höchste Ausbeute. Ein Zusatz von Wasser lieferte eine schlechtere Ausbeute.

Eine ganze Reihe von nichtkonventionellen Studien über proteasekatalysierte Peptidsynthesen hat Jakubke et al.^[64] beschrieben. Mithilfe der proteolytischen Eigenschaften von α -Chymotrypsin wurden solche unnatürlichen Aminosäuren wie: 4-Fluoro-Phe-OH, 4-Nitro-Phe-OH, 2-Naphthyl-Ala-OH und unnatürliche Gruppen wie: β -Phenyllactyl-, Acetyl- oder Mal- in Leucinamide oder in ein Dialanylpeptid eingeführt. Die Reaktionen wurden in gefrorener Wasserlösung, bei pH=9.0, mit einem 4-fachen Überschuss des Nucleophils zu dem Acyldonor, bei T=-15°C durchgeführt. Die Ausbeute in der gefrorenen Lösung variierte zwischen 70-95%, die entsprechenden Reaktionen bei RT zeigen viel niedrigere Ausbeuten (3-90%).

Eine interessante enzymatische Verknüpfung wurde mit Subtilisin BPN' von Wells et al.^[65] beschrieben. Eine Voraussetzung dieser Methode ist ein Glycol-konjugiertes Phenylalanylamid am C-Terminus einer Peptidkette. Die beiden Peptide müssen über eine bestimmte Sequenz verfügen, die für Subtilisin spezifisch ist (*Abbildung 23*). Zur Durchführung dieser Reaktion brauchte man einen 10-fachen Überschuss des Esters, ansonsten verlief sie unter milden Bedingungen (wässriger Puffer, pH =8.0). Auf dieser Art wurde Methionyl *human-growth-hormone* (Met-hGH) am N-Terminus mit einem biotinylierten Peptid (*Bio-KGAAPF-glc-F-amide*) modifiziert. Die Reaktion war nur für den N-Terminus spezifisch. Die neun vorhandenen ϵ -Aminogruppen des Lysins waren inert. Auf die gleiche Art wurde eine Einführung von Aminosäuren, die Schwermetalle, z.B. Quecksilber enthalten, realisiert. Das Met-hGH wurde mit 80% Ausbeute an dem α -Aminoende mit einem Peptid *Succinyl-Ala-Ala-His-Tyr-Zaa-glc-Phe-amide* (wobei Zaa ein quecksilberhaltiges Cystein ist) derivatisiert. Ein weiterer Versuch war eine Modifikation mit PEG-Polymeren. Die Modifikation wurde an einem Peptid ANP (*atrial-natriuretic-peptide*, ein vom Herz freigesetztes Hormon, das wichtig in der Salzbalance- und Blutdruckregulation ist) in zwei Schritten durchgeführt.

Schritten durchgeführt. Der erste Schritt: eine Ligation mit *succinyl-KKKGAAPF-glc-F-NH₂*, die mit einer Ausbeute von 70% verlief, wurde von einem Schritt von PEGylation mit *PEG500-NHS* gefolgt. Die Methode ist nicht nur auf die beschriebenen Gruppen beschränkt. Denkbar ist auch die Einführung von isotopmarkierten Aminosäuren und Affinitätsgruppen.

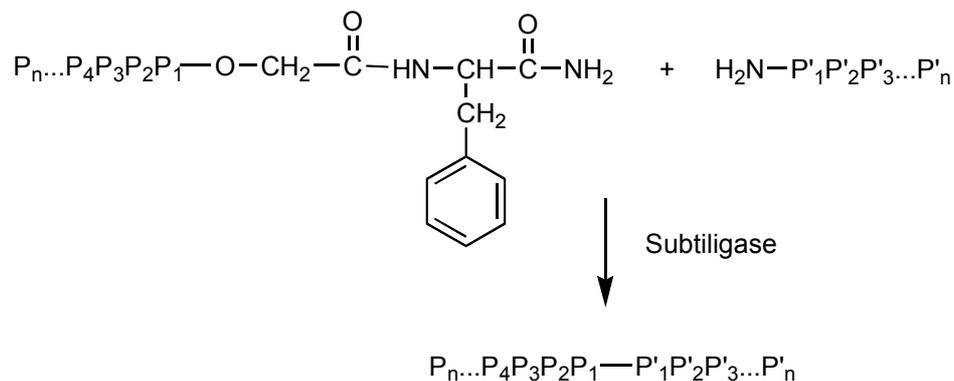


Abbildung 23: Die N-terminale enzymatische Ligation mit Subtiligase als Katalysator.

Eine Alternative zu der reversen Proteolyse ist die enzymatische Synthese mit Hilfe der ribosomalen oder nicht ribosomalen Peptidyltransferase (RPT oder NRPT). Die Methode ist eine Kombination enzymatischer und genetischer Techniken. Man bildet aus dem eukaryotischen oder prokaryotischen ribosomalen mRNA-tRNA System, einer Mischung von Aminosäuren und ATP oder GTP ein Translationssystem *in vitro*. Bei gleichzeitiger Verwendung der Suppressor tRNA mit einem Nonsensecodon kann man unnatürliche Aminosäuren in die Proteine einbauen. Auf diese Art und Weise wurde ein biotinyliertes Methionin am N-Terminus von *green-fluorescent-protein* (GFP) eingeführt.^[66] Ein *aminoacylierter tRNA_{fmet} Initiator* mit einem biotinylierten Methionin an der α -Aminogruppe wurde benutzt, um einen Biotin-tag spezifisch am N-Terminus einzubauen. Der aminoacylierte Initiator tRNA_{fmet} mit einer relativ großen Substitutionsgruppe (Biotin) wurde durch das Ribosom von *E.coli* erkannt und entsprechend zur P-Stelle gerichtet, um die Translation zu initiieren. So modifiziertes GFP könnte leicht von anderen Proteinen auf einer Streptavidinsäule abgetrennt werden. Das modifizierte GFP bewahrte seine native Fluoreszenz.

Zu den weiteren gentechnischen und enzymatischen Methoden gehört die Synthese mit Transglutaminase als Katalysator.^[67] Normalerweise katalysiert dieses Enzym

eine Reaktion *in vivo* zwischen einem Glutaminrest und einem Alkylamin, am häufigsten einer Lysinseitenkette. Das Enzym, speziell die *guinea-pig-liver-transglutaminase* (Tgase), ist sehr streng sequenzspezifisch. Eine der besten bekannten Sequenzen enthielt Substanz P. Ein Peptidderivat mit Monodansylcadaverine- oder Polyoxyethyleneinheit (durchschnittliche Masse von 3kDa) und einer für Substanz P typischen Sequenz (*H-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Met-NH₂*) wurde an *human interleukin-2* (hll-2) Protein angehängt. Die Reaktion war N-Terminus spezifisch, aber eher deshalb, weil die sechs anderen vorhandenen Glutaminreste hll-2 für Tgase kein Substrat darstellten (entweder liegen sie in einer nicht exponierten Region und sind deshalb nicht zugänglich, oder die Primärsequenz bei der Nachbarschaft wurde von Tgase nicht erkannt). Der N-Terminus bei hll-2 ist ein unstrukturiertes, flexibles Element. Die Methode ist allgemein anwendbar, wenn die Sequenz des Akzeptors für das Enzym spezifisch ist. Soweit die Sequenzen in der Umgebung von Glutaminresten unspezifisch für Transglutaminase sind, findet keine Reaktion an den Glutaminresten statt. Die Primärsequenz in der Umgebung des Amidondonors ist nicht kritisch, so dass man nahezu beliebige Proteine auf diese Art modifizieren kann. (Abbildung 24)

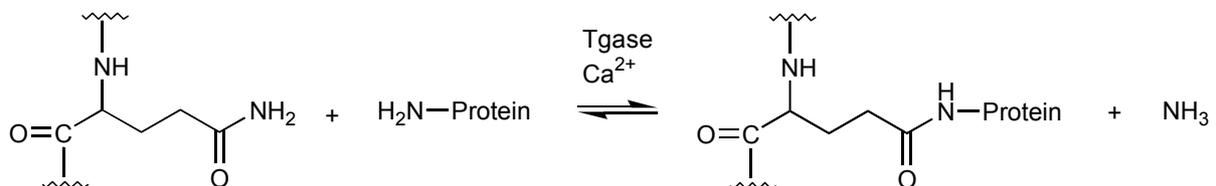


Abbildung 24: Verwendung der Transglutaminase als Katalysator für eine N-terminale Modifikation. Das Protein R'-NH₂ wird mit einem Peptidamide R-CONH₂ gekuppelt, das eine für das Enzym spezifische Sequenz und eine funktionelle Gruppe enthält.

4. C-terminale Modifikation

Zu den wichtigsten C-terminalen Modifikationen gehört die Amidierung. Eine α -Amidgruppe am C-Terminus ist verantwortlich für die biologische Aktivität von manchen Peptiden, z.B. Peptidhormonen. Man kann zwar Amide durch Synthese auf Benzhydrylaminharzen erhalten, wenn man aber das Peptid über Rekombinationstechniken synthetisiert, fehlt jedoch die C-terminale Amidgruppe.

Die Amidierung wird am häufigsten enzymatisch durchgeführt. Seit längerer Zeit wurde Peptidylglycin α -amidierende Monooxygenase^[68] (PAM) zur Amidierung von ungeschützten Peptiden verwendet. PAM wird aus Pferdeserum gewonnen und deshalb werden heute andere Enzyme gesucht, deren Präparation keine Tierhaltung verlangt. Zu den 'umweltfreundlicheren' Enzymen gehört eine Prolyl Endopeptidase (PEP), die am C-terminalen Ende des Prolins die Peptidbindung spaltet. In der Reaktion der reversen Proteolyse ist sie aber fähig, zuerst eine Spaltung und dann eine Kondensation der Peptidbindung zu katalysieren^[69]. Die Reaktion wurde auf einem Nonapeptid - einem Vorläufer des *luteinising-hormone-releasing-hormone* (LH-RH) durchgeführt. Die Ausbeute war von der Konzentration des Nucleophils und vom pH-Wert stark abhängig. Um den Umsatz zu verbessern, hat man das Gleichgewicht zwischen Hydrolyse und Kondensation durch Verwendung von organischen, mit Wasser mischbaren Lösungsmitteln verändert. Bei Zusatz von 50% (v/v) Glycerol hat man Ausbeuten bis zu 67% erreicht. Diese Menge an Glycerol schien ein Optimum zu sein, höhere Mengen verringerten drastisch die Ausbeute. Die Reaktion ist nur für den C-Terminus spezifisch, man beobachtete keine Nebenprodukte.

Neben einer Prolylendoproteinase wurde zur C-terminalen Amidierung eine aus Orangenschalen isolierte Peptidamidase verwendet.^[70] In der Reaktion brauchte man eine Ammoniakquelle und am besten eigneten sich dafür Ammoniumhydrogencarbonat, Diammoniumhydrogenphosphat und Ammoniumcarbamat. Als Substrate benutzte man Dipeptide (z.B. Z-Gly-Phe-OH), die ausschließlich an der C-terminalen Carboxygruppe amidiert wurden (*Abbildung 25*). Die höchsten Ausbeuten wurden bei einem niedrigen Wassergehalt von etwa 5% erhalten. Der niedrige Wassergehalt limitiert durch geringe Löslichkeit der Proteine und Ammoniumverbindung im Acetonitril die Anwendungsmöglichkeiten dieser Methode. Eine ähnliche Amidierung wurde mithilfe *Candida-antarctica-Lipase-B* (CALB) durchgeführt.^[71]

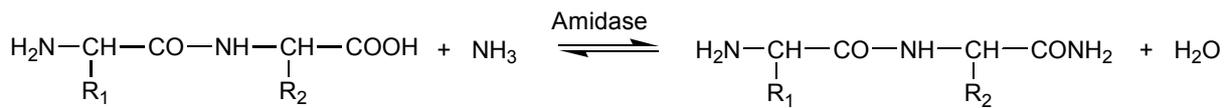


Abbildung 25: Enzymatische C-terminale Amidierung mit Peptidamidase.

Eine interessante Amidierungsmethode hat die Gruppe von Buchard ^[72] vorgestellt. In einer Transacylierungsreaktion mit Carboxypeptidase Y entstehen Peptidamide mit einer geschützten Amidgruppe, die dann in einem photolytischen Schritt deblockiert werden (Abbildung 26). Auf diese Art wurden zwei Peptide modifiziert: *human-calcitonin(22-32)-Ala-OH* und *human-calcitonin(9-32)-Ala-OH*. Der erste Schritt, dessen Voraussetzung eine ungeladene Aminosäure am C-Terminus war, wurde bei pH=5.5-7.5 mit einer Ausbeute zwischen 80-100% durchgeführt. Der zweite Schritt erreichte bei pH=9-10 unter Bestrahlung mit einer Wellenlänge $\lambda=305$ nm quantitative Ausbeuten. Die gesamte Ausbeute war hauptsächlich vom pKa-Wert des Nucleophils abhängig. Je niedriger der pKa-Wert war, desto besser war die Ausbeute, da das pH-Optimum für Carboxypeptidase Y zwischen 5.5 und 7.5 lag.

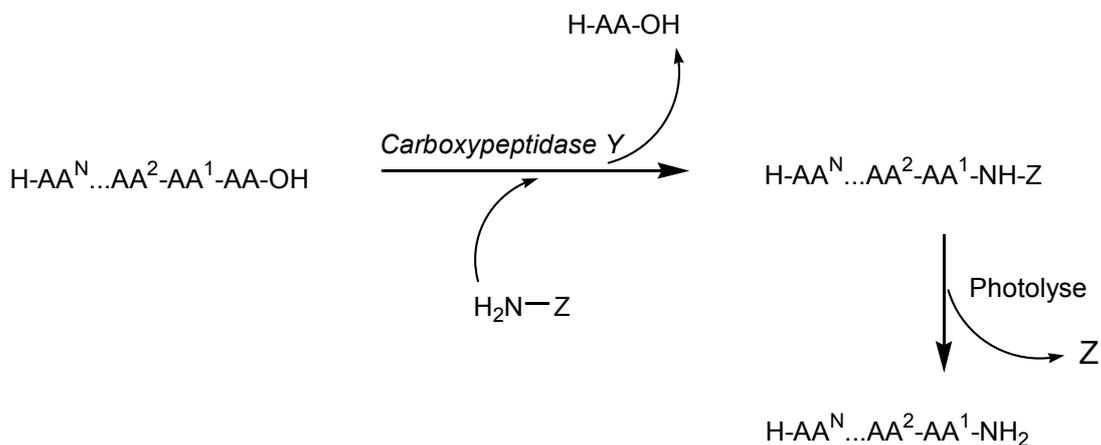


Abbildung 26: Amidierung mithilfe der Carboxypeptidase Y.

Eine weitere Möglichkeit für eine regiospezifische Modifikation sowohl an dem Amino- als auch Carboxyende des Proteins bietet die Peptidligation mithilfe von Intein.^[73] Unter Verwendung dieser Methode wurden einige Cysteinderivate am C-Terminus eines Fusionsproteins zwischen *maltose-binding-protein* (MBP) und einem

Intein eingeführt. Die Intein vermittelte Proteinsynthese besteht aus mehreren Stufen (*Abbildung 27*). Dem ersten Schritt der Bildung eines (*Abb. 27a*) Thioesters mit einer freien Thiolgruppe des Cysteins an der ersten Position des Inteins folgt mit der nächsten Stufe eine Thioumesterung (*Abb. 27b*) mit einer zugegebenen Mercaptanverbindung.

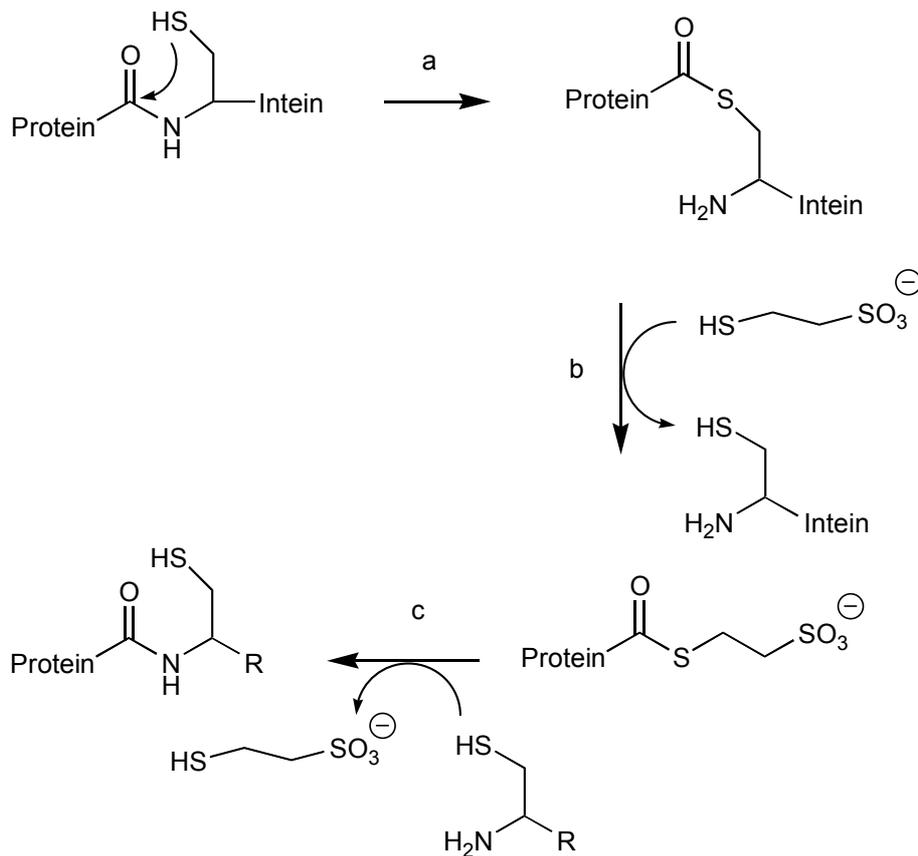


Abbildung 27: Die mit Intein vermittelte Proteinmodifikationsmethode. R- eingeführte funktionelle Gruppe.

Der entstandene Thioester wird dann mit einem Cysteinderivat umgesetzt (*Abb. 27c*). Nach einer intramolekularen Umgruppierung mit der vorhandenen freien α -Aminogruppe bildete sich aus einem Thioester ein Cysteinderivat mit einer stabilen Amidbindung. Auf dieser Weise kann man über entsprechend modifizierte Cysteinreste (*Abbildung 28*) viele unnatürliche Gruppen wie Biotin, Nucleinsäuren, fluoreszierende Gruppen, Zuckerreste oder Chelatgruppen in die Proteine einführen.

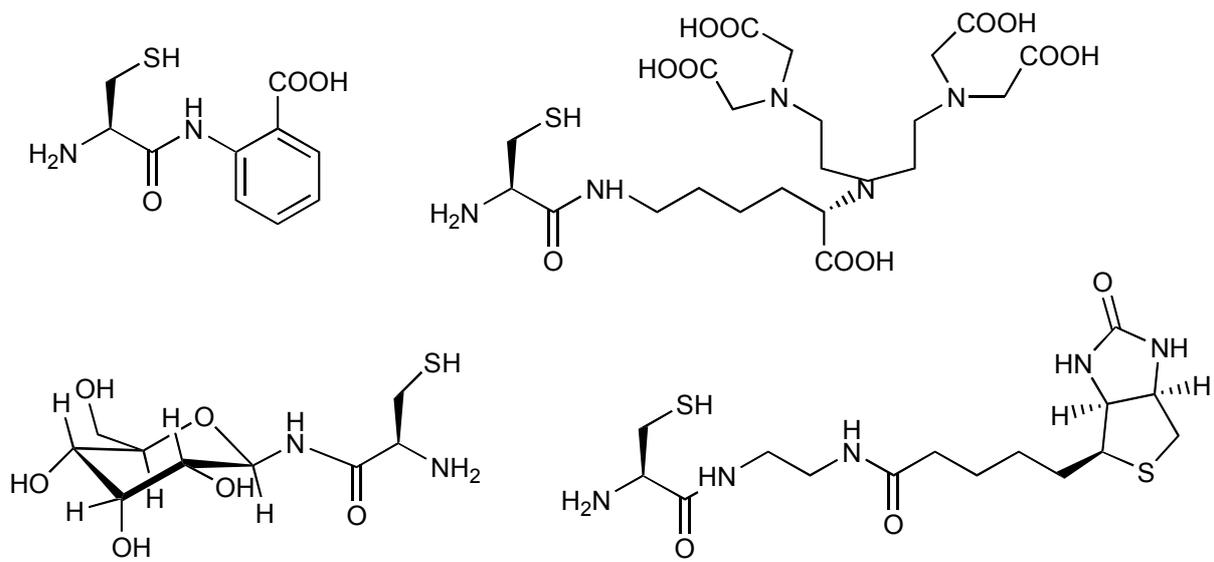


Abbildung 28: Cysteinderivate als Substrate für die 'intein mediated native protein ligation'.

5. Reverse Proteolyse

Die enzymatische Synthese bietet im Vergleich mit den chemischen Verfahren mehrere Vorteile. Dank höherer Regiospezifität kann man unblockierte Peptide zur Synthese verwenden. Dabei erhöht man die Löslichkeit der Substrate im Wasser und spart gleichzeitig Blockierungs- und Entblockierungsschritte während der Synthese, was die ganze Peptidsyntheseprozedur wesentlich vereinfacht. Die verbesserte Löslichkeit von nicht geschützten Peptiden ermöglicht die Verwendung von milden, ökologisch vorteilhaften Reaktionsbedingungen, die gleichzeitig eine Voraussetzung für die katalytische Aktivität des Enzymes sind. Die Stereospezifität sorgt für eine racemfreie Kondensation, was in der chemischen Peptidsynthese selten der Fall ist ^[36]. Sogar bei der Verwendung solcher Kupplungsreagentien wie TBTU oder HBTU beobachtet man Racemisierung (es entsteht etwa 1.4% D-Isomer), weshalb immer nach besseren Kupplungsreagenzien gesucht wird.

Die enzymatische Peptidsynthese ist besonders vorteilhaft, wenn man die native Struktur des Proteins oder Peptids erhalten möchte, z.B. bei Semisynthese von natürlichen Proteinspaltstücken, für die Peptidsegmentkondensation, für die Synthese von bioaktiven Peptiden und Modifikationen von schon existierenden oder gentechnisch hergestellten Proteinen.

Im allgemeinen unterscheidet man zwischen zwei Tendenzen in der enzymatischen Peptidsynthese. Entweder verwendet man ribosomale oder nicht ribosomale Peptidyltransferase (RPT oder NRPT), oder man benutzt Proteasen als Katalysatoren. Die ribosomale Peptidyltransferase wäre für die Bildung der Peptidbindung ideal, weil sie unspezifisch ist und keine Esteraseaktivität besitzt. Dagegen ist sie in vitro nur sehr bedingt anwendbar, da sie mehrere Proteinfaktoren und peptidyl-t-RNA Substrate verlangt, aber trotzdem nicht zuverlässig funktioniert. Deshalb ist im vorliegenden Fall die proteasekatalysierte Peptidsynthese vorzuziehen.

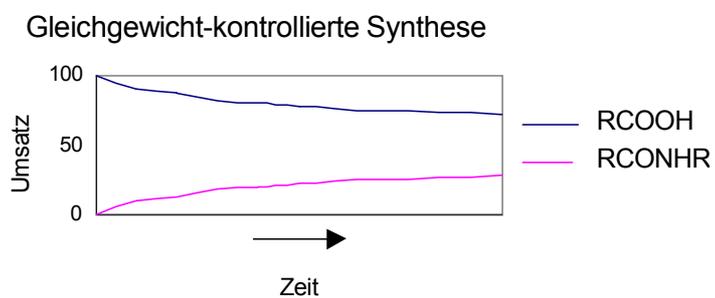
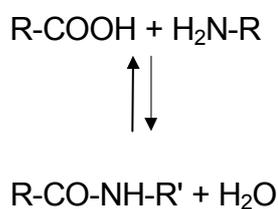
5. 1. Kinetisch und thermodynamisch kontrollierte reverse Proteolyse

In der proteasekatalysierten Synthese gibt es zwei Strategien:

1. Die Gleichgewichtskontrollierte Synthese (*Abbildung 29a*), die die direkte Umkehrung der proteasekatalysierten Hydrolyse ist. Sie ist charakterisiert durch hohen Enzymbedarf, geringe Synthesegeschwindigkeiten, hohe Konzentrationen an organischen Lösungsmitteln, um die Ionisierung der Edukte zurückzudrängen.

2. Die kinetisch kontrollierte Synthese (*Abbildung 29b*), in der als Acyldonor nicht eine Säure sondern ein Ester eingesetzt wird. Die Abgangsgruppe des Esters spielt in der Kinetik eine große Rolle, ihre Hydrophobie und Größe bestimmen die Affinität des Acyldonors zum Enzym. Während der Katalyse bildet sich ein Acylenzymintermediat, das bei einem Angriff eines Nucleophils gespalten werden kann. Als Nucleophil wirkt entweder Wasser oder ein Amin. Charakteristisch ist, dass man so eine hohe Akkumulation des Kupplungsproduktes erreichen kann und dass die Reaktion in Wasser unter geringem Zusatz von organischen Lösungsmitteln geführt wird².

a)



b)

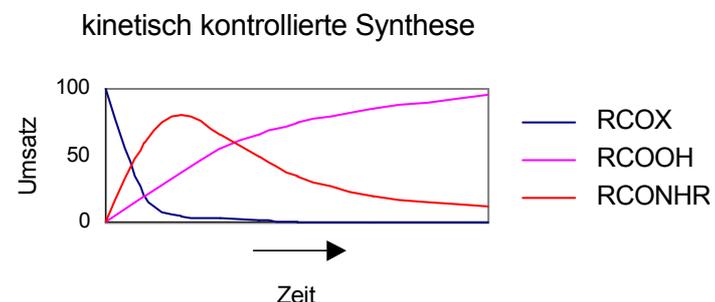
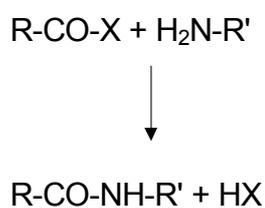


Abbildung 29: Gleichgewichts- und kinetisch kontrollierte reverse Proteolyse.

Zur eindeutigen Reaktionsbeschreibung benutzt man die Nomenklatur von Berger und Schechter^[37]. In dem aktiven Zentrum der Protease gibt es Bindungsstellen, die eine Affinität zu bestimmten Aminosäuren des Substrates vorzeigen. Diese Bindungsstellen werden mit $S_3, S_2, S_1, S_1', S_2', S_3'$ benannt, wobei die S_3, S_2, S_1 Stellen den Acyldonor binden und S_1', S_2', S_3' Bindungsstellen für das Nucleophil sind. Die im aktiven Zentrum gebundenen Aminosäuren des Acyldonors werden entsprechend

² Gleichzeitig werden andere Reaktionsmedien für die kinetisch kontrollierte Synthese entwickelt, z.B. organische Lösungsmittel mit kleinem Wasseranteil, gefrorene Wasserlsg. oder Zweiphasensysteme.

als $P_1, P_2, P_3 \dots P_n$ bezeichnet, die, die zu dem Nukleophil gehören, als $P_1', P_2', P_3',$ usw. Die Spaltstelle befindet sich zwischen P_1 und P_1' .

Die Kinetik der reversen Proteolyse wird in *Abbildung 30*^[74] gezeigt. Ein Acyldonor-ester bildet mit Enzym einen Acylenzymkomplex. Nach der Freisetzung der Abgangsgruppe der Carboxykomponente entsteht eine kovalente Bindung zwischen dem Acyldonor und dem Serin oder Cystein der Protease, abhängig davon, ob sie eine Serin- oder Cysteinprotease ist. Die nukleophile Komponente zerstört den Komplex und bindet sich an die Acylverbindung. Als Nukleophil kann entweder Wasser oder eine Aminokomponente wirken. Man erhält entsprechend das Hydrolyse- oder Aminolyseprodukt. Gleichzeitig kann man mehrere Neben- bzw. Folgereaktionen beobachten: Hydrolyse der gebildeten Amidbindung, Hydrolyse des Acylenzym-Nukleophil-Komplexes, Spaltung an einer anderen Stelle des Acyldonors, Nukleophils, des Produktes und daran gekoppelte Ligationen.

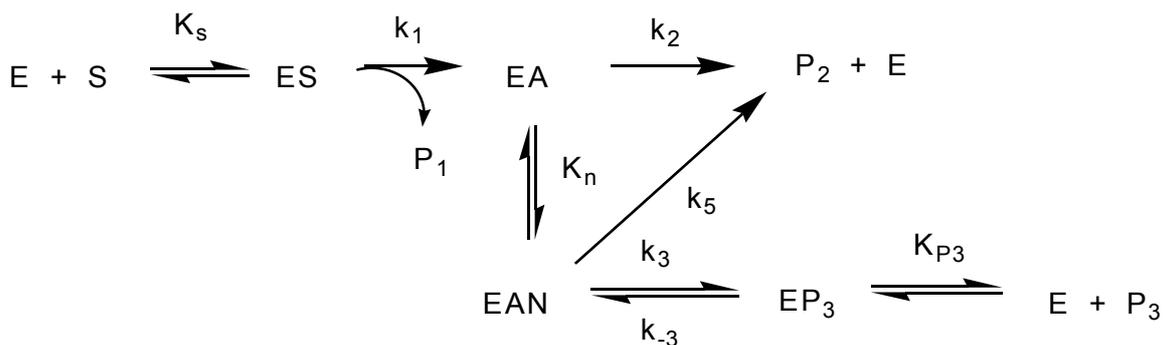


Abbildung 30: Reaktionsschema der kinetisch katalysierten reversen Proteolyse. E - Enzym, S - Acyldonor (Carboxykomponente), ES - Acyl-Enzym-Komplex, EA - Acylenzym, P_1 - Abgangsgruppe des Acyldonors, EAN - Acylenzym-Nukleophil-Komplex, EP_3 - Enzym-Produkt-Komplex, P_2 - Hydrolyseprodukt, P_3 - Peptidsyntheseprodukt, K - entsprechende Gleichgewichtskonstanten, k - entsprechende Geschwindigkeitskonstanten.

Proteasen sind keine perfekten Ligasen. Das entstandene Acylenzym kann abhängig von den Reaktionsbedingungen durch Hydrolyse oder Aminolyse gespalten werden. Der wichtigste Parameter zur Charakterisierung der proteasekatalysierten Peptidsynthese ist das Verhältnis zwischen den Geschwindigkeiten der Aminolyse und Hydrolyse. Laut durchgeführten Studien ist das Verhältnis günstiger für Cysteinproteasen als für Serinproteasen^[75].

Jakubke ^[76] hat eine Partitionskonstante eingeführt, die das Verhältnis zwischen der Geschwindigkeit der Aminolyse (V_A) und Hydrolyse (V_H) beschreibt.

$$p = (V_A/V_H) * [N]$$

Aus der Gleichung schließt man, dass p gleich Nukleophilkonzentration $[N]$ ist, wenn die Hydrolyse und die Aminolyse gleich schnell sind. Dank der Partitionskonstante ist eine schnelle Abschätzung der Ausbeute der Acyltransferreaktion möglich. Wenn $[N] > p$ kann eine hohe Ausbeute an Produkt erhalten werden ^[74]. Die hohe Konzentration des Nukleophils ist nicht immer sinnvoll, z.B. bei N-terminalen Proteinmodifikationen, wenn das Protein als Nukleophil verwendet wird. Wichtig ist ein Überschuß an Acyldonor, was die Sekundärhydrolyse der gebildeten Peptidbindung reduziert.

Da die Ausbeute der Peptidsynthese durch die Geschwindigkeiten sowohl der Sekundärhydrolyse als auch des Acyltransfers bestimmt wird, kann man durch Verschiebung des Verhältnisses zwischen diesen beiden Reaktionen optimale Bedingungen für die Peptidkupplung finden. Zu den wichtigsten Parametern bei der Syntheseoptimierung gehören:

- der pH-Wert - höhere pH-Werte sorgen dafür, dass die Aminogruppe des Nukleophils weniger protoniert ist, wodurch die Desacylierung des Acylenzyms durch Aminolyse effizienter wird. Am besten ist, wenn der pH-Wert gleichzeitig optimal für Proteasen ist.
- die Temperatur - manchmal reduziert eine Erniedrigung der Temperatur Nebenreaktionen oder Folgereaktionen ^[77]
- ein gefrorenes Medium - vorgeschlagen von Jakubke ^[78-82] - bei -25°C hat man ein besseres Verhältnis der Aminolyse zur Hydrolyse, was mit lokalen hohen Konzentrationen des Nukleophils erklärt wird. Gleichzeitig aber werden andere Gründe diskutiert, z.B. schreibt Lineweaver ^[83], dass die Proteolyse in gefrorenen Medien langsamer wird, weil die Konzentration von Wasser in gefrorenen Lösungen niedriger wird, was schließlich genau den gleichen Effekt wie in organischen Lösungsmitteln mit minimalen Wasseranteil hat (näher im nächsten Punkt beschrieben). Andere Forscher erklären das Phänomen mit erhöhter Protonenmobilität im Eis ^[84] oder Katalyse auf der Eisoberfläche ^[85].

- die Verwendung organischer Lösungsmittel - was zur Minimierung der Hydrolyse führt. Ein Nachteil davon ist die reduzierte Geschwindigkeit der gesamten Reaktion, was mit der niedrigeren Aktivität und Stabilität des Enzyms verbunden ist. ^[86]
[87]
- die Präzipitation des Produktes oder Extraktion des Produktes in eine andere Phase (Zwei-Phasen-System)
- die Verwendung hochspezifischer Abgangsgruppen im Acyldonor ^[88] [89]

Alle diese Punkte müssen für einzelne Synthesefälle getestet und optimiert werden.

5. 2. Beispiele für enzymatische Peptidsynthese

Die ersten Beispiele von enzymatischen Peptidsynthesen wurden von van't Hoff beschrieben ^[90]. Er postulierte, dass Trypsin eine inherente Fähigkeit zur Proteinsynthese aus von ihr selbst gespalteten Segmenten haben muss. 40 Jahre später wurde die enzymatische Synthese mit α -Chymotrypsin als Katalysator sowohl von Bergmann, als auch Fruton beschrieben ^[91] [92]. Bis in die siebziger Jahre war das Interesse für die reverse Proteolyse klein, bis die Gruppen von Kullman ^[93] [94] und Isowa ^[95] bioaktive Peptide mit dieser Methode synthetisiert hatten. Einige Beispiele auf diesem Wege synthetisierter Peptide werden in *Tabelle 5* vorgestellt.

Tabelle 5: Beispiele von Peptiden, die mittels der reversen Proteolyse syntetisiert wurden.

Peptid / Bemerkungen	Enzym	Literaturstelle
Aspartam (Asp-Phe) - hat große wirtschaftliche Bedeutung (ein Süßstoff, 200fach süßer als Saccharose)	Thermolysin	[96]
Human Insulin oder Human Insulin Analogon	Trypsin, Achromobacter Protease	[169] [170]
Dipeptide, Fragmentkondensation zwischen Tri- und Dipeptiden	Pronase , Pseudolysin	[97] [98]
Oligopeptide	V8 protease	[99]
Oligopeptide (ein Decapeptid wurde genetisch hergestellt und dann enzymatisch verlängert)	Papain	[100]
Cholecystokinin (26-33) Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe	α -Chymotrypsin, Papain, Thermolysin	[93]

Maus EGF(21-31) His-Ile-Glu-Ser-Leu-Asp-Ser-Tyr-Thr-Cys	Chymopapain, cyclic Carboxypeptidase Y, Trypsin, V8 protease	[101]
Somatostatin (cyclisches Peptid, Kopf zu Schwanz Cyclisierung) -Ala-Gly-Cys-Lys-Phe-Phe-trp-Lys-Thr-phe-Thr-Ser-Cys-	α -Chymotrypsin, Thermolysin, Trypsin	[102]
Kupplung zwischen Aminosäurenresten 295-316 vom TC-Peptide aus Thermolysin mit Resten 1-20 (S-Peptide) aus Ribonuclease A	V8 Protease	[103]
splicing zwischen komplementären Fragmenten von α -subunit Hämoglobin: $\alpha(1-30)$, $\alpha(31-141)$	V8 Protease	[104]
Semisynthese zwischen Precursor [Ala ¹⁵]-GRF(4-29)-NH ₂ und des Tyr-D-Ala-Asp(OH)-OR gebildet wurde ein Analogon von human-growth-hormone-releasing-factor	Endopeptidase GSE aus Bacillus licheniformis	[105]

Die reverse Proteolyse wurde zur Synthese von Proteinen verwendet. Zu den interessantesten Beispielen gehört die Semisynthese von RNA-se A mit Subtiligase als Katalysator^[106]. Die Kondensation erfolgte aus 7 Fragmenten, wobei jedes Fragment aus 9 bis 30 Aminosäurenresten bestand. Andere Proteine, die über reverse Proteolyse semisynthetisiert wurden, sind in der *Tabelle 6*^[107] aufgelistet.

Tabelle 6: Proteine, die durch reverse Proteolyse synthetisiert wurden.

Peptide/Protein	Kondensationsstelle	Enzyme	Literaturstelle
Bovine ribonuclease A	(1-19)-Ala + Ser-(22-124)	Subtiligase	[108]
Staphylococcal nuclease	(6-48)-Lys + Gly-(51-149)	Trypsin	[109]
Horse cytochrome C	(1-37)-Arg + Lys-(40-104)	Chymopapain	[110]
Human somatotropin	(1-133)-Arg + Thr-(136-191)	Trypsin	[111]
RNA-se A	(1-20) + (21-51) + (52-63) + (64-76) + (77-97) + (98-115) + (116-124)	Subtiligase	[106]

5. 3. Synthese in organischen Lösungsmitteln mit geringem Wasseranteil

In der Literatur wurde ausführlich die enzymatische Peptidsynthese in organischen Lösungsmitteln mit geringem Wasseranteil behandelt.^[112] Als Lösungsmittel werden mit Wasser mischbare organische Lösungsmittel verwendet, die einen möglichst kleinen Einfluß auf die Aktivität und Stabilität des Enzyms haben. Ein kleiner Wasserzusatz ist essentiell für den Erhalt der katalytischen Aktivität und der nativen Konformation des Enzyms. Durch eine reduzierte Menge an Wasser wird die Hydrolyse unterdrückt und gleichzeitig das Gleichgewicht zwischen diesen beiden Reaktionen auf die Seite der Aminolyse verschoben. Diese Methode kann einige Vorteile im Vergleich zur Synthese in Wasser bieten, z.B. verbesserte Löslichkeit von Substraten, leichtere Aufarbeitung des Produktes und Rückgewinnung des Enzyms oder ein geringes Risiko für die Kontamination der Reaktionslösung mit Mikroorganismen. Viele Enzyme zeigen in organischen Medien neue Eigenschaften: höhere Thermostabilität^[113], neue Substratspezifitäten, andere Inhibitionskonstanten für Produkt- und Substratinhibition^{[114][115]}.

Zu den interessanten Ideen in der proteasekatalysierter Peptidsynthese gehört die Verwendung von Zwei-Phasen-Systemen als Reaktionsmedium, z.B. Wasser mit Heptan, Hexan oder Cyclohexan. In manchen Fällen bringen sie die höchste Produktionsraten^[116].

Als Reaktionsmedium kann auch eine Suspension mit zum großen Teil nicht gelösten Substraten verwendet werden, wobei heterogene eutektische Mischungen entstehen^[117].

In der reversen Proteolyse wurden auch immobilisierte^[118] und mit PEG modifizierte Enzyme benutzt.

Die oben erwähnte Methoden bringen in speziellen Fällen gute Syntheseausbeuten. Aufgrund der Individualität jedes Enzyms müssen die optimalen Bedingungen für jeden Fall gesondert erarbeitet werden.

6. IgA-Protease

6.1. Allgemein

IgA-Proteasen ^[119, 120, 121] gehören zu einer Familie von bakteriellen Endopeptidasen, die spezifisch menschliches IgA1 spalten. Die Enzyme werden von medizinisch wichtigen Bakterien produziert, die für verschiedene Infektionen im menschlichen Körper verantwortlich sind (*Tabelle 7*). Durch Spaltung der IgA werden die Abwehrkräfte des Wirtsorganismus geschwächt, was die Kolonisation der Bakterien erleichtert und dadurch ein wichtiger Faktor in der Infektionspathogenese ist.

Tabelle 7: Infektionsarten, die von IgA-Protease produzierenden Bakterienstämmen verursacht werden.

Infektionsart	Bakterienstamm
Krankheiten der höheren Atemwegen	<i>Neisseria gonorrhoeae, Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae</i>
Infektionen der Mundhöhle, Dentaplaque, Karies	<i>Streptococcus sanguis, Streptococcus oralis.</i>
Meningitis	<i>Neisseria meningitis</i>
Infektion der Genitalien	<i>Ureaplasma ureolyticum</i>
Infektion des Weichgewebes	<i>Clostridium ramosum</i>

Die nicht pathogenen *Haemophilus* oder *Neisseria sp.* enthalten kein *iga* Gen und produzieren keine IgA-Protease, weshalb man annimmt, dass die Anwesenheit der IgA-Protease für die Pathogenität sorgt.^[122]

Diese Hypothese wurde jedoch von Johannsen et al. bestritten.^[123] Die mutierten Bakterien von *Neisseria gonorrhoeae*, die kein *iga* Gen enthielten, riefen trotz Mangel an der IgA-Protease die Krankheit hervor.

Das natürliche Substrat für IgA-Protease ist menschliches Immunglobulin A1, das einer der wichtigsten und am häufigsten produzierten Antikörper im menschlichen Serum und Schleim ist. Die Enzyme erkennen eine Spaltungssequenz 223-240 aus der Scharnierregion der schweren Kette des Immunglobulins. Verschiedene Bakterienstämme spalten die Aminosäurekette in der Scharnierkette der IgA an unterschiedlichen Positionen, was in der *Abbildung 31* dargestellt ist. Als Produkte dieser

proteolytischen Spaltung entstehen zwei IgA-Fragmente: Fc und Fab. Die Erkennungssequenz für einzelne Proteasen ist so spezifisch, dass die sich wiederholende identische Oktapeptidsequenz zwischen Ser 223 und Ser 240, von der Protease erkannt und nur an einer Stelle gespalten wird. Abhängig davon, ob die Spaltung in dem ersten oder zweiten Oktapeptid stattfindet, unterscheidet man IgA-Proteasen Typ 1 oder 2. Durch eine Deletion an den strategischen Positionen zwischen Ser 223 und Ser 240 in Immunoglobulin A2, wird IgA-Protease gegen IgA2 resistent. Die einzige Ausnahme ist *C. ramosum*, die prolinspezifisch ist und eine Bindung zwischen Pro 221 und Val 222 in IgA2 spaltet.

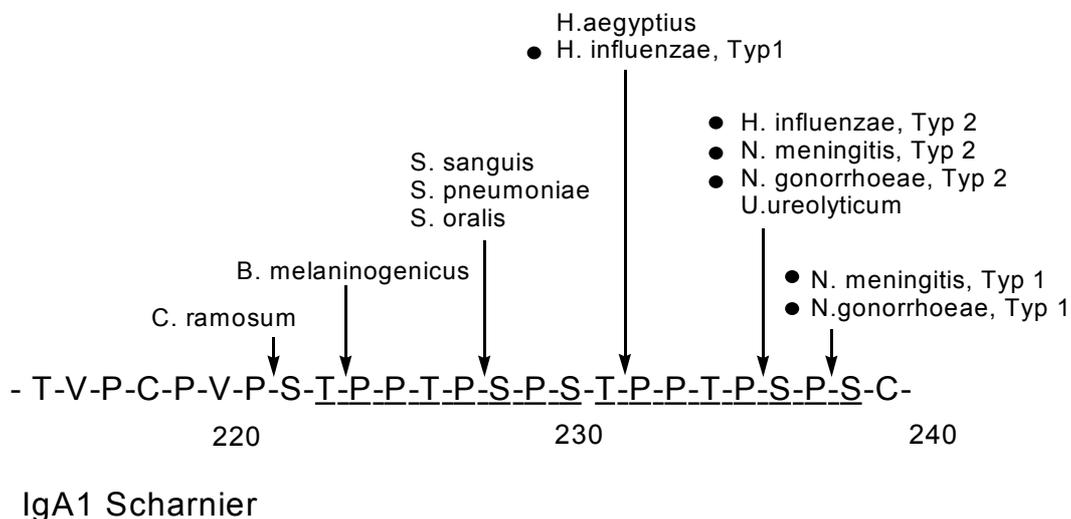


Abbildung 1: Spaltungsstellen für IgA-Proteasen in der Scharnierregion des menschlichen IgA1.

Abhängig von dem Katalysemechanismus kann man in IgA-Proteasen drei Proteaseklassen unterscheiden.

1. Serinproteinasen (*Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*; *Ureaplasma ureolyticum*)
2. Metalloproteinasen (*Streptococcus sanguis*^[124], *S. pneumoniae*, *S. oralis*)
3. Thiolproteasen (*Prevotella melaninogenica*, *Bacteroides melaninogenicus*,^[125])

6.2. IgA-Protease aus *Neisseria gonorrhoeae*

Diese IgA1-spezifische Serinendopeptidase wurde unter Nummer: EC 3.4.21.72 dem Namen IgA-Protease oder IgA-Proteinase klassifiziert. Dieses extrazelluläre Enzym wird im Bakterium *Neisseria gonorrhoeae* produziert. Die Produktion, Isolierung und Charakteristika des Enzyms wurde ausführlich in der Literatur beschrieben.^{[121]-[126]}

Es gibt zwei Typen von IgA1-Proteasen: Typ 1 und Typ 2.^[127, 128] Die zwei Typen unterscheiden sich voneinander durch unterschiedliche Spezifität zur Spaltungstelle im menschlichen Immunoglobulin. Beide Typen werden gleichzeitig in das Medium in der Zeit des exponentiellen Wachstums ausgeschieden. Die Aktivität von dem Typ 2 ist etwa 10-fach höher im Vergleich zu dem Typ 1. Der Typ 2 ist resistent gegen mehrere Inhibitoren, dagegen ist der Typ 1 sehr instabil und wird inhibiert durch niedrige Konzentrationen von Metallechelaten und Salzen, typischen Inhibitoren von Thiol- und Serinproteasen.^[127]

6.2.1 Spezifität

Die IgA-Protease erkennt und spaltet die Aminosäuresequenz ^[129]:



X= Threonin, Serin, Alanin

Y= bevorzugt Prolin oder Serin,

Z= bevorzugt Arginin oder Threonin

Das natürliche Substrat, wie schon oben erwähnt, ist das menschliche Immunoglobulin A1. Auch nicht menschliche Immunoglobuline von Schimpansen, Gorillas und Orang-Utanen wurden getestet und als schlechtere Substrate klassifiziert.^[130]

Als erste künstliche Substrate wurden Dekapeptide mit SPPS synthetisiert und an der Erkennungstelle gespalten.^[131]

6.2.2 Struktur ^{[132] [129] [133] [132]}

Das Gen *iga* kodiert einen Proteinprecursor, der aus 1532 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von 169 kDa hat. Der Precursor enthält nur zwei Cysteinreste, die durch 10 Aminosäuren getrennt sind und besteht aus vier Domänen:

1. N-terminale Signalsequenz

2. Enzym IgA-Protease
3. stark polare und helikale consensus Region
4. C-terminale β -Domäne

Das N-terminale Signalpeptid besteht aus 27 Aminosäuren und transportiert den Proteinprecursor vom Cytoplasma in das Periplasma durch die innere Zellmembran.

Die C-terminale β -Domäne besteht aus 45 Aminosäuren und transportiert das Enzym durch die äußere Zellmembran außerhalb der Zelle. Die β -Domäne bildet in der Zellmembran eine Struktur, die ähnlich zu natürlichen Poren ist. Durch diese Struktur werden die α -Domäne und die Domäne der reifen Protease ins Medium übertragen. Man nimmt an, dass die β -Domäne eine β -barrel Struktur aus antiparallelen β -Strängen bildet. Diese Struktur wird in der äußeren Membran eingebaut und ist fähig, auch mehrere unterschiedliche Proteindomänen über die Membran zu transportieren. Ausgeschieden aus der Zelle wurde ein Protein, das immer noch nicht das reife Enzym ist und außer der gewünschten Sequenz noch die α -Domäne enthält.

In der α -Domäne befinden sich drei Erkennungssequenzen für IgA-Protease,

-PVKPAP+SPAA-

-ILVVAPP+SPQA-

-ILPRPP+APVF-

wodurch die Domäne an drei Stellen gespalten werden kann. Außerhalb der Zelle findet deshalb eine autoproteolytische Spaltung statt, nach der das reife Enzym mit einem Molekulargewicht von 121, 109 oder 106 kDa entsteht, abhängig davon, welche der Erkennungssequenzen der α -Domäne gespalten wurde. Man vermutet, dass die α -Domäne für den Transport des Enzyms in den Wirtorganismus verantwortlich sein kann.^[134]

Aufgrund von Studien über den Transportmechanismus behauptet man, dass nur eine ungefaltete Passagierdomäne durch eine β -barrel-Pore transportiert werden kann. Der Transportmechanismus ist bis heute noch nicht völlig verstanden. Es gibt immer noch mehrere unbeantwortete Fragen, wie z.B. wo das übertragene Protein gefaltet wird und wie die Faltung ohne periplasmatische Chaperone stattfinden kann.^[135]

6.2.3 Katalysemechanismus

IgA-Protease aus *Neisseria gonorrhoeae* gehört zu den Serinproteasen. Sie enthält die gleiche Sequenz $-GVLGDSGSPLA-$ in aktivem Zentrum wie Trypsin und Chymotrypsin, die auch zu den Serinproteasen gehören. Außerdem wird sie von typischen Serinproteaseinhibitoren, wie *Diisopropylfluorophosphat* oder Prolylboronsäuren inhibiert.

6.2.4. Inhibitoren

Als künstliche Inhibitoren wurden Oktapeptide beschrieben,^[136] die Analoga zu dem Oktapeptid aus der Scharnierregion des menschlichen IgA1 zwischen den Resten 233 und 240: $-Thr-Pro-Pro-Thr-Pro-Ser-Pro-Ser$ sind. Es wurden die Inhibitionskonstanten für durch Acetylierung und Amidierung freie und blockierte Oktapeptide bestimmt. Die Acetylierung des Peptides hat die Affinität zur IgA1 reduziert, dagegen hat die Amidierung die Affinität nicht beeinflusst. Gleichzeitige Blockade an beiden Enden hat die Affinität stark reduziert.

Es wurden weitere Analoga zur menschlichen Scharnierregion des IgA1 (Tetrapeptide, mit der Sequenz aus menschlichen IgA1 zwischen Ser 224-Ser 240) synthetisiert und als Inhibitoren untersucht.^[137]

Als künstliche Inhibitoren wurden auch Peptide getestet, die eine α -Aminoboronsäure (ein Prolinanalogon) enthalten. Diese Peptide wirkten inhibierend. Die Inhibitionskonstante K_i wurde bestimmt und sie liegt in einem nanomolaren Bereich.^[138]

Ein Überblick über bekannte IgA1-Protease-Inhibitoren wird in der *Tabelle 8* zusammengefasst.

Tabelle 8: Inhibitoren der IgA-Protease.

Inhibitor	Literaturstelle
Peptid Prolylboronsäure	[138], [139]
IgA	[140]
Menschliches Serum	[140]
Diisopropylfluorophosphat	[139]
3,4-Dichloroisocoumarin	[139]

SDS	[141]
Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Al ³⁺	[141]
Cetyltrimethylammoniumbromid	[141]
Chlorhexine	[141]
Protaminsulphat	[141]

6.2.5. Eigenschaften

Der K_M -Wert für IgA-Protease mit dem menschlichen IgA als Substrat wurde bestimmt und liegt in micromolaren Bereich (*Tabelle 9*):

Tabelle 9: K_M -Werte für IgA-Protease mit dem menschlichen IgA als Substrat.

K_M [mM]	Lit.
0.0008	[141]
0.0034	[125]
0.0056	[142]

Die Werte sind sehr unterschiedlich, was wohl auf unterschiedliche Assaybedingungen und unterschiedliche Enzymquellen zurückzuführen ist. Die Daten sind nicht direkt miteinander vergleichbar.

Das pH Optimum wurde in der Literatur unterschiedlich beschrieben, als pH=5.0^[125] oder pH=7.0^[142]. Aus Untersuchungen von C.Seitz weiß man, dass ein pH-Optimum für IgA-Protease aus *Neisseria gonorrhoeae* für die Kupplungsreaktion zwischen *Boc-Pro-Thr(bzl)-Pro-Pro-OMe* und *H-Ser-Pro-Trp-NH₂* zwischen 8 und 9.3 liegt.

Der isoelektrische Punkt des Enzyms ist auch in der Literatur bekannt und liegt bei 5.0^[125]. Als Temperaturoptimum wurde in der Literatur^[142] 37 bis 40°C beschrieben. Bei T = 55°C beobachtet man einen völligen Aktivitätsverlust.

6.2.6. Biologische Funktion der IgA-Protease

Außer der Spaltung der IgA, die eine Rolle in der Infektionspathogenese von vielen bakteriellen Stämmen hat, wurden weitere biologische Funktionen der IgA-Protease festgestellt.

Die IgA-Protease spaltet Membranproteine, Glykoproteine wie z.B. *Iamp*, die in Membranen von Säugetieren vorkommen und die Zelle vor der Zerstörung (z.B. durch Lysozym) verteidigen.^[143] Ähnliche Studien wurden auf Zellmembranen von der Hefen *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt. Die IgA-Protease spaltet auch die Glykoproteine aus Hefen.^[144]

Außerdem inhibiert die IgA - Protease Apoptose, ein Prozess der Selbstzerstörung der Zelle, der zu den Abwehrmechanismen des Organismus gehört. Die veränderten Zellen, z.B. Krebszellen oder die Zellen Aids-Kranker, werden erkannt und dann zerstört.^[145]

6.2.7. Die Produktionsmethoden

Ursprünglich wurde IgA-Protease aus dem Stamm *Neisseria gonorrhoeae* produziert und isoliert.^{[128] [135] [146]}

Inzwischen wurde das *iga* Gen in *E.coli* kloniert und das Protein von *E.coli* ins Medium ausgeschieden. Das recombinante Enzym aus *E.coli* besitzt die gleiche Spezifität und die gleichen Eigenschaften (Produktionsweg von Roche). Als alternative Methode wurde IgA Protease aus *inclusion bodies*^[147] (Produktionsweg von MoBiTec) produziert. Zur Isolierung des Enzyms wurden chromatografische Methoden unter Verwendung von Phenyl-Sepharose Säulen oder Phenylboronat-Affinitätssäulen beschrieben.

6.2.8. Ähnlichkeit der IgA-Protease aus *Neisseria gonorrhoeae* mit IgA-Proteasen aus anderen Stämmen

Die Ähnlichkeit zwischen den *iga* Genen von *Haemophilus influenzae* und *Neisseria gonorrhoeae* wurde untersucht und als sehr groß bezeichnet.^[148] Die ähnlichen Geneile sind die Module, die für Kolonisation und Überleben der Bakterien verantwortlich sind.

Eine hohe Homologie wurde auch zwischen Genen von *Neisseria meningitis* und *Neisseria gonorrhoeae* festgestellt.^[122], so wie Ähnlichkeiten zwischen *Neisseria meningitis*, *H. influenzae* und *N. gonorrhoeae*.^[149] Alle Gene haben eine mosaikähnliche Struktur.

6.3. Anwendung

Die IgA-Protease wird sehr häufig zur Spaltung von Fusionsproteinen verwendet, die eine künstlich eingeführte (z.B. über *site-directed-mutagenesis*) Spaltungsstelle enthalten. Diese Aminosäuresequenz ist in Proteinen so selten, dass man mit großer Sicherheit Spaltung an anderer Stelle als der gewünschten ausschliessen kann.

Außerdem besitzt die IgA-Protease typische Eigenschaften eines Autotransporters.^[150]

- ein Signalpeptid, das das Protein über die innere Membran transportiert,
- eine C-terminale Domäne, die ein β -barrel in der äußeren Membran bildet
- eine Sequenz am C-Terminus, die bei der Proteinfaltung hilfreich ist
- Mangel an Disulfidbindungen in der transportierten Domäne

Diese Eigenschaften ermöglichen die Verwendung der IgA-Protease (genauer gesagt ihrer β -Domäne) als ein Vehikel zum Transportieren von Proteinen über die äußere Membran von Gram-negativen Bakterien, z.B. *E.coli* sog. *Autodisplay* (*autotransporter-mediated-surface-display*).^[151] Auf diese Weise wurden mehrere Proteine über die Zellmembran ins Medium transportiert, z.B. *subunit-cholera-toxin-B*.^{[152] [153] [151]} Man bildete eine Fusion zwischen *cholera-B-toxin-subunit* und β -Domäne aus der IgA-Protease. Die β -Domäne sorgte für den extrazellulären Transport der cholera-Untereinheit. Gleichzeitig benutzte man einen Reinigungsmarker (z.B. *Gly₃His₆*), der die Isolierung des Proteins aus dem Medium erleichterte. Die *cholera-B-toxin-Untereinheit* ist nur ein Beispiel für eine inzwischen schon allgemeine Methode zur Konstruktion von Proteinen, die außerhalb der Zelle ausgeschieden werden und danach einfach aus dem Medium zu isolieren sind.^[153]

Die β -Domäne der IgA-Protease wird auch zum Studium des Proteintransports durch die Zellmembran verwendet, da der Mechanismus noch nicht völlig verstanden ist.^{[135] [154] [155]}

Eine weitere Anwendung ist mit der pathogenen Funktion der IgA-Protease verbunden. Die IgA-Protease wird zur Herstellung von Pharmazeutika verwendet, z.B. Impfstoffe gegen Bakterieninfektionen und Allergien,^{[156] [157]} Impfstoffe zum Induzieren von Antikörperbildung in der Zelle, Impfstoffe zur Behandlung von *Meningitis*^[158] oder Arzneimitteln^[159] zur Prävention und Behandlung von Autoimmunkrankheiten und Viruskrankheiten.

Die IgA-Protease findet auch Anwendung in der Diagnostik zur Detektion von Krankheiten ^[144], z.B. in Biochips zur Quantifizierung und qualitativen Detektion von HIV-Protease.^[160] HIV-Protease wurde modifiziert durch eine eingeführte Erkennungssequenz für IgA-Protease. Die Verfolgung der Proteolyse wurde mithilfe von *surface-plasmon-resonance* (SPR) durchgeführt. Detektiert wurde die Zunahme von abgespaltem Protein.

Die IgA-Protease wurde in einer neuen Methode zur Reinigung von Abwasser, welches Schwermetalle enthält, eingesetzt. Es wurde eine Fusion hergestellt zwischen *metallothein-mause-MTS* und der β -Domäne der IgA-Protease. Die β -Domäne sorgt für das Ausscheiden des Proteins außerhalb der Zelle. Das Metallothioninmodul hat die Fähigkeit durch seinen hohen Anteil an Cystein, die Schwermetalle zu komplexieren. Dieses Fusionsprotein muß in einem Organismus produziert werden, der hohe Konzentrationen an Schwermetallen aushalten kann. Das aus der Zelle ausgeschiedene Protein sollte die Schwermetalle aus dem Abwasser komplexieren und dadurch entsorgen.^{[161][162]}

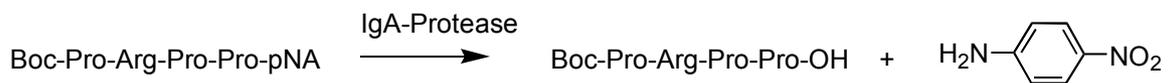
7. Aktivität der IgA-Protease.

7.1. Bisherige Aktivitätstests und ein neues Aktivitätsassay

Die bisher in der Literatur beschriebenen Aktivitätstests für die IgA-Protease sind zeit- und arbeitsaufwendig. Als Substrat benutzte man das menschliche Immunglobulin A, das nach einer bestimmten Zeit durch das Enzym in zwei Fragmente: Fc und Fab gespalten wurde. Detektiert wurde die Zunahme von gebildeten Fc und Fab Fragmenten, die entweder radioaktiv markiert wurden und mit Hilfe von SDS PAGE separiert wurden, ^[163] oder durch eine Verwendung von immunologischen Methoden (ELISA ^[164], *rocket immunoelectrophoresis* ^[165]) quantitativ bestimmt werden konnten. Die Verwendung der HPLC zur Detektion von Spaltungsprodukten ^[166] reduzierte erheblich den Zeit- und Arbeitsaufwand der Tests.

Es bestand die Aufgabe, einen Aktivitätstest so zu gestalten, dass man die Enzymaktivität innerhalb von ein paar Minuten eindeutig bestimmen kann. Die Idee war, ein einfaches, chromogenes Substrat mit einer durch das Enzym erkennbaren Sequenz enzymatisch zu hydrolysieren und die Zunahme des gebildeten Produktes spektrophotometrisch zu verfolgen.

Die Untersuchungen wurden schon von Ch.Seitz begonnen^[36]. Als Substrate wurden damals *Boc-PTPP-βNA*, *Boc-PRPP-pAA*, *Boc-PT(Bzl)PP-pNA* und *Boc-PRPP-AMC* benutzt. Eine brauchbare Vorschrift ist nur für *Boc-PRPP-AMC* erarbeitet worden. Aus seinen Untersuchungen ergab sich, dass die optimale Sequenz für IgA1-Protease an der Position P_4-P_1 -Pro-Arg-Pro-Pro- ist. Aus diesem Grund wurde *Boc-PRPP-pNA* als Substrat verwendet, das durch enzymatische Spaltung p-Nitro-anilin freisetzt.



Die Zunahme von p-Nitroanilin in der Reaktionslösung wurde spektrophotometrisch bei der Wellenlänge $\lambda = 405 \text{ nm}$ detektiert. Die Bildung von p-Nitroanilin konnte auch durch die Farbänderung von farblos auf gelb nachgewiesen werden. Die Untersuchungen wurden in einem Tris-Puffer (100 mM, EDTA 1 mM) bei pH=8.0 und einer Temperatur von 25°C durchgeführt. Ein pH von 8.0 garantiert eine hohe Enzymaktivi-

tät. Unter oben genannten Bedingungen wurde eine Spontanhydrolyse des Substrates nicht beobachtet.

Der Aktivitätstest sollte ermöglichen, unterschiedliche Enzymchargen miteinander zu vergleichen und den Verlust der Enzymaktivität zu bestimmen. Die kleinsten Fehler bei der Aktivitätsbestimmung erhält man, wenn die Reaktionsgeschwindigkeit unabhängig von der Substratkonzentration ist, also für eine Substratkonzentration, bei der das Enzym mit dem Substrat gesättigt ist. Man kann davon ausgehen, dass man bei einer Substratkonzentration von $[S]=10 \times K_M$ Sättigung des Enzyms mit dem Substrat beobachtet. Der erste Schritt zur Erarbeitung eines Aktivitätsassay war deshalb die Bestimmung des K_M -Wertes für das ins Auge gefasste chromogene Substrat.

7.2. Bestimmung des K_M -Wertes.

Der K_M -Wert wurde aus dem kinetischen Verlauf der Hydrolyse von *Boc-PRPP-pNA* bestimmt. Gemessen wurde die Änderung der Extinktion mit der Zeit, was der Anfangsgeschwindigkeit der Bildung von chromophorem Produkt (p-Nitroanilin) bei der gewünschten Substratkonzentration entsprach.

Die gemessene Änderung der Extinktion des gebildeten Produktes über die Zeit für unterschiedliche Substratkonzentrationen konnte unter Verwendung des Lambert-Beer-Gesetz und des molaren Extinktionskoeffizientes für p-Nitroanilin ($\epsilon^*_{405}=10700 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) auf die Reaktionsgeschwindigkeit umgerechnet werden. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde in Form der Enzymaktivität angegeben (A [U]). Ausgerechnet wurde zusätzlich die spezifische Aktivität (spez. Akt. [U/ μg Protein]). Die spezifische Enzymaktivität (angegeben für ein μg Protein) ermöglicht den direkten Vergleich zwischen unterschiedlichen Enzymchargen, soweit der Enzymaktivitätsassay mit dem gleichen Substrat unter denselben Bedingungen durchgeführt wurde. Die erhaltenen Daten sind in der *Tabelle 10* und in *Abbildung 32* dargestellt.

Aus den in *Abbildung 32* gezeigten Daten wurden der K_M -Wert und V_{max} bestimmt. Da man die beste Bestimmung für die kinetischen Parameter mit der *Eadie-Hofstee-Methode* erreicht, wurden die kinetischen Daten nach dieser Auftragung ermittelt.

Tabelle 10: Kinetische Daten für die enzymatische Hydrolyse von Boc-PRPP-pNA. Parameter: $T=25^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=8.0$, Konzentration der Stammlösung: $c_S=4.0\text{ mM}$ (10% EtOH). Konzentration des Enzyms in der Messküvette: $c_E=0.19\text{ }\mu\text{g/ml}$. Zur Fertigung aller Lösungen wurde Tris-HCl-Puffer (100 mM, EDTA 1mM, $\text{pH} = 8.0$) benutzt.

c_s [mM]	$dE/dt \times 10^2$	A [U] $\times 10^4$	spez. Akt. [U/ μg]
0,000	0,000	0,00	0,000
0,040	0,228	2,13	1,121
0,080	0,310	2,90	1,525
0,120	0,397	3,71	1,953
0,160	0,421	3,93	2,071
0,200	0,460	4,30	2,263
0,279	0,460	4,30	2,263
0,399	0,460	4,30	2,263

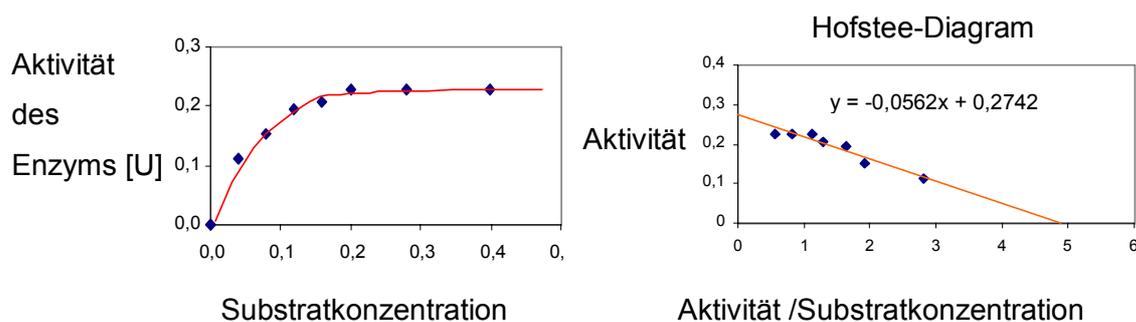


Abbildung 32: Kinetischer Verlauf der enzymatischen Hydrolyse von Boc-PRPP-pNA und Hofstee-Diagramm zur Bestimmung von K_M und V_{\max} Werten.

Aus der *Abbildung 32* kann man K_M und V_{\max} ablesen. K_M erhält man aus der Geradensteigung ($\text{tg}\alpha=-K_M$); für Boc-PRPP-pNA beträgt sie $0,056\text{ mmol/l}$. Aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate kann man V_{\max} ablesen, die $5,2 \cdot 10^{-4}\text{ U}$ für Boc-PRPP-pNA beträgt.

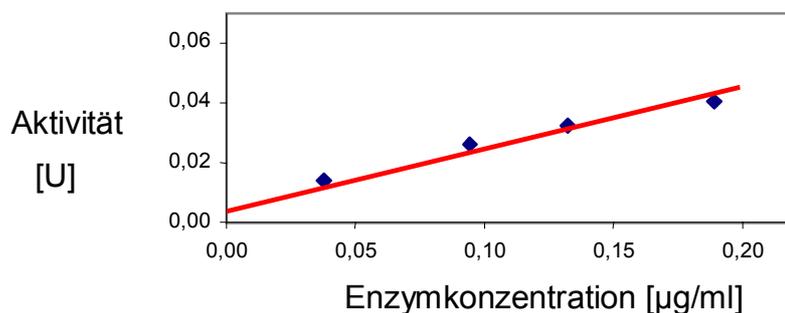
$$K_M = 0,056\text{ mmol/l}$$

$$V_{\max} = 5,2 \cdot 10^{-4}\text{ U}$$

Anlehnend an die Annahme, dass man bei der Substratkonzentration von $10 \times K_M$ die Sättigung des Enzyms mit dem Substrat erhält, wurde eine Vorschrift für einen Aktivitätstest bei $0,4\text{ mM Boc-PRPP-pNA}$ ($\approx 7 \times K_M$) erarbeitet, was einem Kompromiss zwi-

schen der gewünschten und der experimentell wegen der Substratlöslichkeit realisierbaren Substratkonzentration entspricht.

Um die einzelnen Enzymchargen miteinander mithilfe der spezifischen Aktivität vergleichen zu können, mußte sicher gestellt werden, dass die Menge des Enzyms linear abhängig von der Hydrolysegeschwindigkeit ist. Diese Korrelation wird in *Abbildung 33* präsentiert. Die Zunahme der Enzymmenge verursacht einen nahezu proportionalen Zuwachs der Hydrolysegeschwindigkeit.



*Abbildung 33: Einfluss der Enzymmenge auf die Hydrolysegeschwindigkeit. Parameter: $T=25^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=8.0$, Konzentration des Substrates in der Messküvette: $C_S=1.57\text{mM}$
Zur Fertigung der Lösungen wurde Tris-Puffer (100mM, EDTA 1mM, $\text{pH}=8.0$) verwendet.*

Aufgrund dieser Untersuchungen konnten die Bedingungen für einen Aktivitätstest bestimmt werden. Der Aktivitätstest ist unentbehrlich, sowohl um verschiedene Enzymchargen miteinander zu vergleichen, als auch zur Bestimmung des Aktivitätsverlustes der IgA-Protease mit der Zeit.

Ein K_M -Wert von 0,056 mM wurde für *Boc-PRPP-pNA* bestimmt. Der K_M -Wert für *Boc-PRPP-AMC*, der von Ch.Seitz bestimmt wurde (Tris-Puffer, 2.5% DMSO) beträgt zum Vergleich $K_M=0.141\text{mM}$.

7.3. Die Aktivitätsunterschiede in verschiedenen IgA-Protease Chargen

Der oben beschriebene Aktivitätstest erwies sich als unentbehrlich, um die Aktivitäten von unterschiedlichen Enzymlösungen miteinander zu vergleichen. In dieser Arbeit wurde IgA-Protease von zwei unterschiedlichen Herstellern verwendet. Die Lösung der Firma Roche hatte eine Konzentration von 0,19 µg Enzym/µl und enthielt Tris-HCl-Puffer, EDTA und Ethylenglycol in unbekannt Konzentrationen. Im Vergleich dazu hatte die Lösung von Firma MoBiTec eine Konzentration von 0,25 µg Enzym/µl (Charge_1 Januar 2001) und 0,17 µg Enzym/µl (Charge_2 Juli 2001). Die Lösungen enthielten 50mM Kaliumphosphatpuffer und 50% Glycerin. Die Aktivitätsunterschiede für die verschiedenen Chargen der beiden Hersteller wurden mit dem neuen Aktivitätsassay bestimmt und sind in *Abbildung 34* gezeigt.

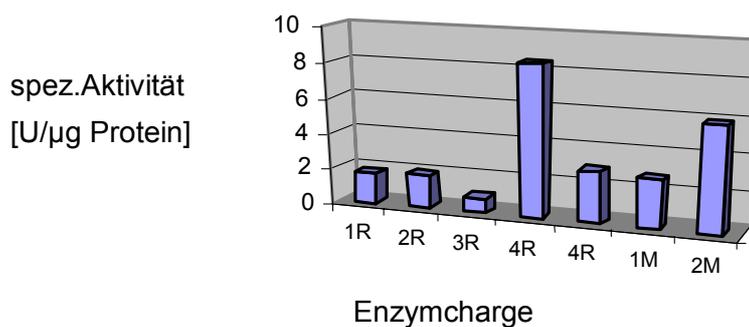


Abbildung 34: Aktivitätsunterschiede für verschiedene Enzymchargen. Mit Buchstabe R wurden die Chargen von Firma Roche bezeichnet, mit Buchstabe M von Firma MoBiTec.

Die ersten drei Säulen 1R-3R entsprechen Enzymaktivitäten von 'älteren' und schon früher benutzten Enzymchargen der Firma *Roche*. Diese Enzymchargen verfügten nicht mehr über hohe Aktivitäten, was auf die niedrige Stabilität des Enzyms unter normalen Lagerbedingungen zurückgeführt werden kann und noch weiter unten beschrieben wird.

Für die unbenutzte Charge 4R sind zwei Säulen aufgeführt. Die Säule mit höchster Aktivität überhaupt zeigt die Aktivität nach der ersten Operation 'Auftauen'. Diese hohe Aktivität konnte nicht länger erhalten werden und war schon nach der zweiten Operation 'Auftauen/Einfrieren' viel niedriger (zweite Säule 4R). Gearbeitet wurde mit

der Aktivität der zweiten Säule (und niedriger³). Dieser Aktivitätsbereich wird als Arbeitsaktivität weiter bezeichnet.

Die letzten zwei Säulen symbolisieren Aktivitäten für zwei Enzymchargen von *MoBi-Tec* nach der ersten Operation von 'Auftauen'. Beide Aktivitäten unterscheiden sich stark voneinander.

Im Laufe der experimentiellen Arbeit hat sich herausgestellt, dass die Aktivität von gleichen Chargen in der Zeit stark reduziert wird, was auf die niedrige Enzymstabilität bei Raumtemperatur zurückzuführen ist. Beide Hersteller erwähnen die niedrige Enzymstabilität bei Raumtemperatur. Das Enzym wird als 'stabil' bezeichnet bei Temperaturen von -15°C bis -25°C. Man sollte das wiederholte Erwärmen (15-25°C) vermeiden und auf rasches Arbeiten achten.^{[126] [171]} Gleichzeitig werden alle in der Literatur beschriebenen Aktivitätstests (auch die von den Herstellern selbst) bei T=37°C durchgeführt, was etwas verwirrend ist. Die IgA-Protease produzierende Bakterien leben hauptsächlich auf der menschlichen Schleimhaut, und die IgA-Protease wird aus der Zelle ausgeschieden, was eigentlich dafür spricht, dass das Enzym im Bereich von 36-37°C aktiv sein sollte.

7.4. Einfluss der Operationen 'Auftauen/Einfrieren' auf die Enzymaktivität

Die Operationen 'Einfrieren und Auftauen' konnte man bei der Arbeit mit dem Enzym nicht vermeiden. Das Enzym musste bei der Temperatur von -18°C aufbewahrt werden, wenn man die Aktivität über längere Zeit behalten wollte. Die Hydrolyse- und Transferasereaktionen, die in weiteren Kapiteln beschrieben werden, wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, so dass man die gleiche Enzymlösung mehrmals auftauen und einfrieren musste. Das Auftauen und Einfrieren der Enzymlösung verursachte eine starke Reduktion der Enzymaktivität. Die *Abbildung 35* zeigt einen Verlust der Enzymaktivität mit der Zahl der durchgeführten Operationen 'Einfrieren/Auftauen' für drei verschiedene Chargen von Roche. Für alle Chargen beobachtet man sehr starken Aktivitätsverlust. Am stärksten wird dieser Verlust während der zwei ersten Operationen beobachtet (Charge 3, *Abbildung 35*). Für zwei andere Chargen waren die ersten Daten nicht vorhanden. Ab der zweiten Operation beob-

³ Die Aktivität 4R, zweite Säule wurde noch durch Inkubation bei Raumtemperatur und weitere Operationen 'Auftauen/Einfrieren' reduziert.

achtet man einen linearen Aktivitätsverlust, der unterschiedlich stark für unterschiedliche Chargen ist und anscheinend von der Ausgangsaktivität abhängt.

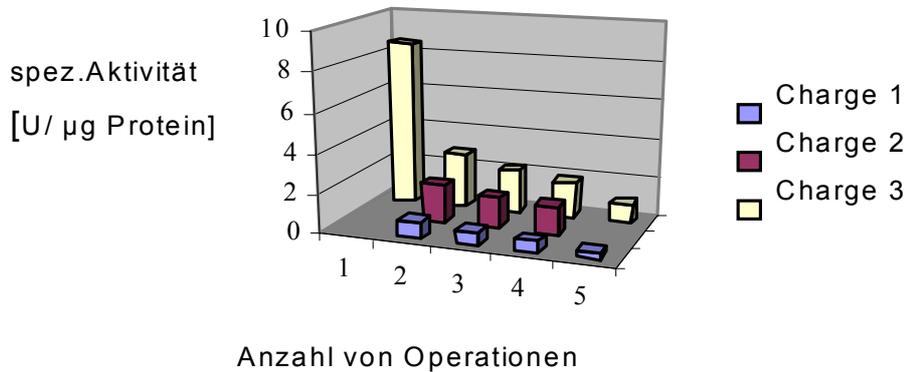


Abbildung 35: Enzymaktivitätsverlust nach mehrfachem 'Einfrieren/Auftauen' für drei Chargen von Roche.

Die Interpretation der oben gezeigten Daten ist einfacher, wenn man den relativen Anteil der behaltene Enzymaktivität gegen die durchgeführten 'Auftauen/Einfrieren'-Operationen aufträgt. Als 100%-prozentige Aktivität für den Arbeitsbereich wurde die Aktivität nach der Operation 2 angenommen. Erstaunlich ist, dass trotz der unterschiedlichen Anfangsaktivität die Geschwindigkeit des Aktivitätsverlustes für alle Chargen ähnlich ist.

Die Enzymlösung von MoBiTec hatte eine andere Zusammensetzung. Deshalb konnten die oben beschriebenen Daten nicht einfach übernommen werden. Der Aktivitätsverlust nach mehrfachem Auftauen und Einfrieren für die MoBiTec-Lösung wurde auch ermittelt und ist in *Abbildung 36* präsentiert.

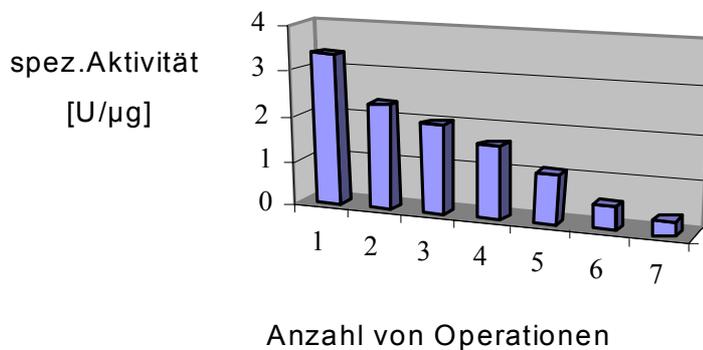


Abbildung 36: Änderung der Enzymaktivität nach 'Auftauen/Einfrieren'-Operationen für Charge von Firma MoBiTec.

Die Korrelation zwischen Aktivitätsänderung und Anzahl von durchgeführten 'Auftauen/Einfrieren'-Operationen ist für die MoBiTec-Lösung linear. Man beobachtet nicht mehr einen genauso starken Aktivitätsverlust bei der zweiten Operation wie für die Roche-Lösung. Nach Umrechnen diese Daten auf den Aktivitätsverlust, konnte man die Daten für die MoBiTec-Lösung mit den Daten der Roche-Lösung vergleichen, was in der Abbildung 37 gezeigt wird.

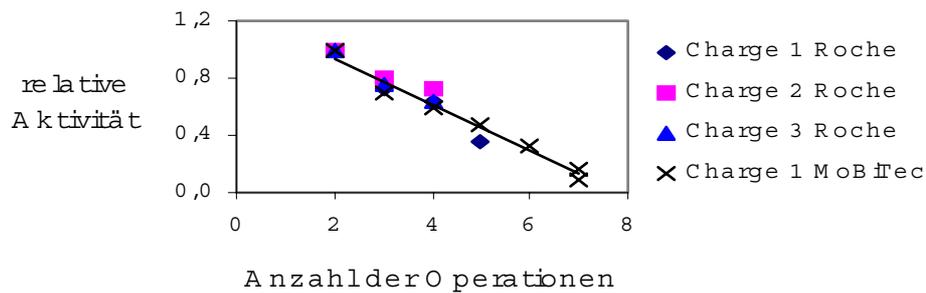


Abbildung 37: Vergleich des Aktivitätsverlustes nach 'Auftauen/Einfrieren'-Operationen für verschiedene Enzymchargen.

Bei allen untersuchten Chargen der beiden Hersteller beobachtet man einen ähnlichen Verlauf des Aktivitätsverlustes nach 'Auftauen/Einfrieren'-Operationen.

Der Aktivitätsverlust kann auch durch schnelles Portionieren der Enzymlösung in solche Portionen minimiert werden, die auf einmal verbraucht werden. Die Aktivität solcher Enzymportionen ist vergleichbar, wie man in der Abbildung 38 sieht.

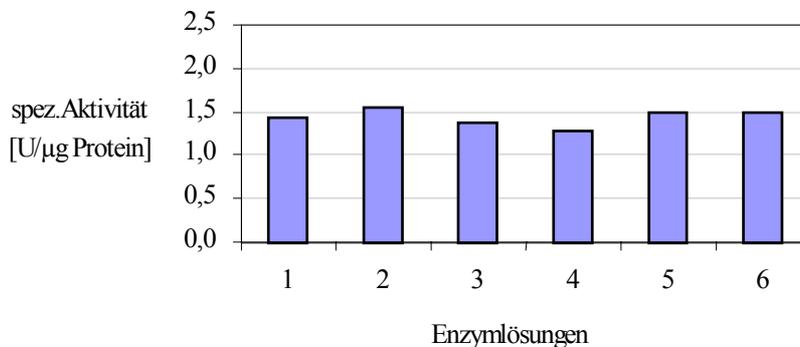


Abbildung 38 : Aktivitätsvergleich für portionierte Chargen von Firma Roche.

7.5. Einfluss der Inkubationszeit auf den Aktivitätsverlust

Aufgrund der niedrigen Stabilität des Enzyms bei Raumtemperatur, wurde ein Aktivitätsverlust während dieser Inkubationszeit beobachtet. In *Abbildung 39* wurde der Aktivitätsverlust während Inkubation bei 25°C für eine Enzymlösung von Firma Roche vorgestellt.

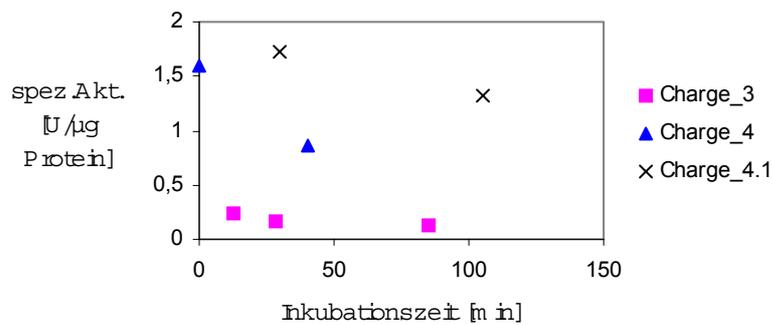


Abbildung 39 : Aktivitätsverlust der IgA-Protease von Firma Roche während Inkubation bei 25°C.

Die Geschwindigkeiten des Aktivitätsverlustes für unterschiedliche Chargen unterscheiden sich voneinander. Dabei es ist schwierig Schlussfolgerungen zu ziehen, ausser einer allgemeinen Tendenz zu relativ starkem Aktivitätsverlust in der Inkubationszeit. Der Aktivitätsverlust für Charge 3 ist viel langsamer im Vergleich zu zwei anderen Chargen, was sehr wahrscheinlich mit der niedrigen Ausgangsaktivität dieser Enzymcharge zusammenhängt.

Um die Geschwindigkeit des Aktivitätsverlustes zu reduzieren, wurde die Temperatur der Inkubation auf 0-4°C erniedrigt. In *Abbildung 40* wird die Korrelation zwischen Enzymaktivität und Inkubationszeit gezeigt. Aus dem Diagramm sieht man, dass der Aktivitätsverlust durch Erniedrigung der Inkubationstemperatur stark zurückgeht.

Die Inkubation des Enzyms war nur die Vorbereitung des Enzyms für weitere Untersuchungen (Aktivitätstest, Hydrolyse und Aminolyse Reaktionen), die bei anderer Temperatur durchgeführt wurden. Das Zugabevolumen des Enzyms war aber so klein im Vergleich zum Reaktionsvolumen dieser Ansätze, sodass die Temperatur der gesamten Lösung nicht die angenommene Fehlerbreite von $\pm 1^\circ\text{C}$ überschritt. Dabei wurde keine Trübung der Reaktionslösung beobachtet, dass man die Ausfällung von Enzym wegen seiner Denaturierung ausschliessen konnte.

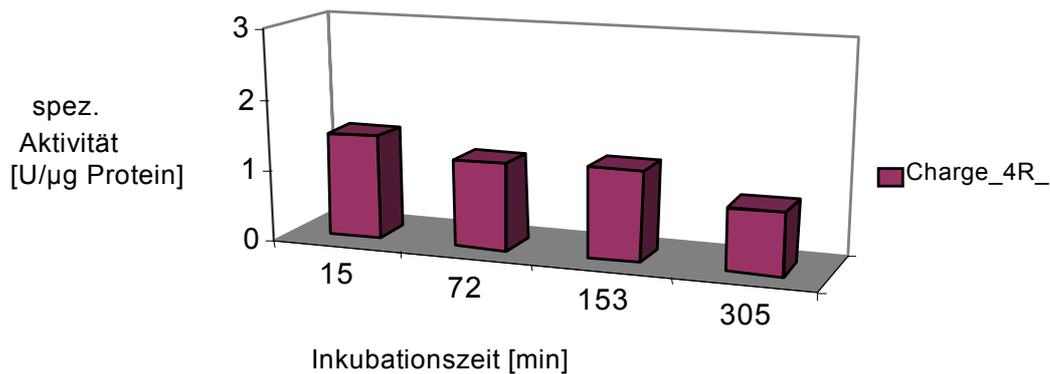


Abbildung 40: Aktivitätsänderung der IgA-Protease (Roche) während der Inkubation bei 0-4°C.

Da die Zusammensetzung der Enzymlösungen von Roche und MoBiTec unterschiedlich war, wurde die Geschwindigkeit des Aktivitätsverlustes auch für die MoBiTec-Lösung untersucht. In *Abbildung 41* wird der Aktivitätsverlust während der Inkubation bei 25°C dargestellt.

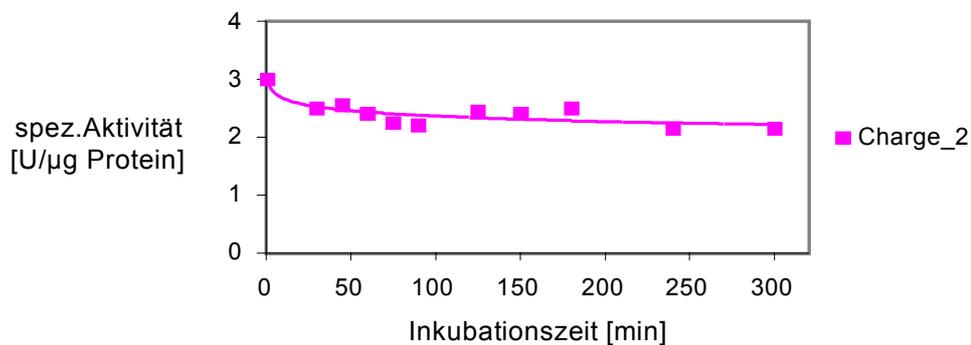


Abbildung 41: Aktivitätsverlust der IgA-Protease von Firma MoBiTec während der Inkubation bei 25°C.

Die Charge von MoBiTec scheint viel stabiler zu sein. Die erhöhte Stabilität kann man auf die Zusammensetzung zurückführen. Die Enzymstammlösung enthält 50% Glycerin, welches anscheinend stabilisierend auf das Enzym wirkt (was noch weiter genauer untersucht wurde).

Aus dem Diagramm sieht man, dass nach der Inkubationszeit von 30 min, in der man einen etwas stärkeren Aktivitätsverlust beobachtet, das Enzym mindestens über 4,5 Stunden stabil bleibt.

7.6. Einfluss der Enzymverdünnung auf den Aktivitätsverlust

Die Aktivität der Protease wurde stark durch Verdünnung reduziert, wodurch man die Arbeit mit verdünnten Lösungen vermeiden sollte. Der Aktivitätsverlust der IgA-Protease in einer 10 fach verdünnten Enzymstammlösung wird in *Abbildung 42* gezeigt.

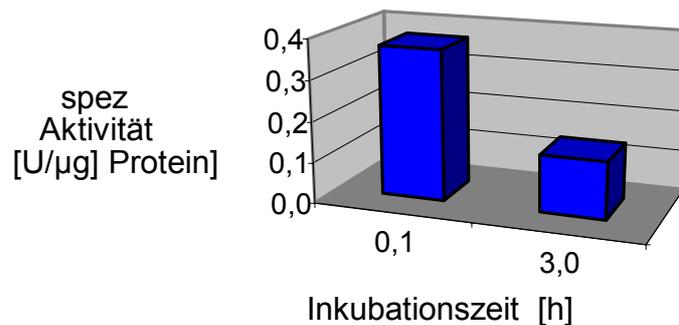


Abbildung 42: Aktivitätsverlust einer in Verhältnis 1:10 mit TAPS-Puffer verdünnter Enzymlösung während der Inkubation bei 25°C.

Aus dem Diagramm erkennt man einen Aktivitätsverlust von über 60% in der Zeit von drei Stunden. Die Geschwindigkeit des Aktivitätsverlustes für die 1:10 verdünnte Lösung ist damit ein wenig höher als für die unverdünnte Lösung von Roche. Die 100 mal verdünnte Lösung verliert fast vollständig (um über 90%) die Aktivität in der Zeit von wenigen Stunden. Danach ist die Enzymaktivität niedriger als zur Durchführung der reversen Proteolyse unbedingt erforderlich ist.

Der Aktivitätsverlust der verdünnten Enzymlösung ist wahrscheinlich auf den Anteil von stabilisierenden Zusatzstoffen zurückzuführen. In der MoBiTec-Lösung wirkt Glycerin als Stabilisator, in der Enzymlösung von Roche ist das sehr wahrscheinlich Polyethylenglykol. Mit der Verdünnung der Enzymlösung nimmt der Anteil an diesen Stabilisatoren ab, wodurch man eine Steigerung des Aktivitätsverlustes beobachtet.

7.7. Einfluss der Glycerinmenge auf die Aktivität der IgA-Protease

Aufgrund von Literaturbefunden wurde vermutet, dass Glycerin als Stabilisator für die IgA-Protease wirken kann. Die Stabilisierung des Enzymes war sehr wichtig, weil man zunächst bei Transferasereaktionen sehr niedrige Ausbeuten erhalten hatte. Vermutet wurde, dass die niedrige Ausbeute durch Aktivitätsverlust des Enzymes in der Pufferlösung verursacht war.

Als erstes wurde der Einfluss der Glycerinmenge auf die Aktivität des Enzymes untersucht. Die Anwesenheit des Glycerins in der Testlösung reduziert allerdings die Enzymaktivität. Drei verschiedene Meßreihen für 0, 10, 20, 30 und 50% Glycerin zeigen die gleiche Tendenz. (Abbildung 43)

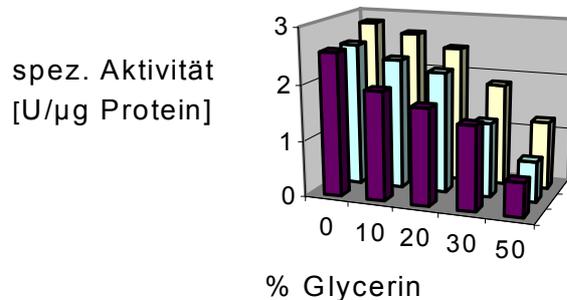


Abbildung 43: Einfluß der Glycerinmenge auf die Aktivität der IgA-Protease. Messung nach 1 Minute.

Der Mittelwert der Aktivitätsabnahme aus diesen drei Messreihen ergibt in der Auftragung gegen die zugehörige Glycerinkonzentration eine annähernd lineare Korrelation. (Abbildung 44)

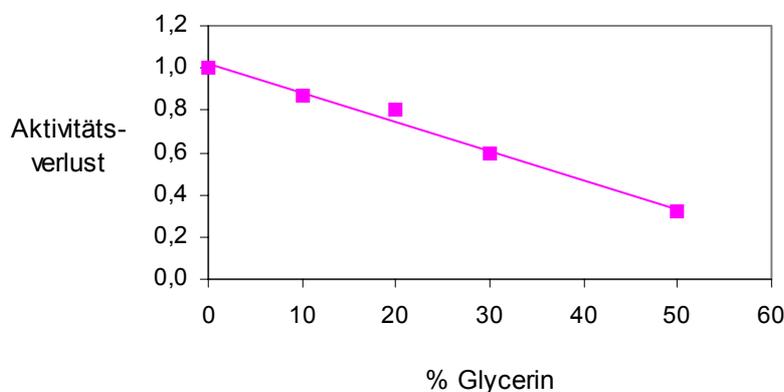


Abbildung 44: Aktivitätsverlust der IgA-Protease für bestimmte Glycerinkonzentrationen.

Aufgrund des Aktivitätsverlustes während der Inkubationszeit musste zusätzlich untersucht werden, wie stark der Verlust für unterschiedliche Glycerinkonzentrationen ist und bei welcher Glycerinmenge das Enzym über mehrere Stunden stabil bleibt.

Die Aktivität wurde für Lösungen mit 50, 30, 20 und 0% Glycerin über mehrere Stunden getestet. (Abbildung 45) Man beobachtete einen Aktivitätsverlust für alle Glycerinkonzentrationen. Allerdings stieg die Enzymstabilität mit höherem Glyceringehalt in der Reaktionslösung. Bei 20 und 30% Glycerin beobachtete man zwar einen Aktivitätsverlust, aber der Verlust war wesentlich kleiner als für die Reaktionslösung mit 0% Glycerin. Die Lösung mit 50% Glycerin zeigte stabile Werte über mehrere Stunden. Der einzige Aktivitätsverlust für diese Messreihe wurde am Anfang der Inkubationszeit (die ersten zwei Messpunkte) beobachtet. Die Meßreihe mit 50 prozentigem Glycerinanteil kann man mit der *Abbildung 41* aus dem Kapitel 7.5 vergleichen. Beide Untersuchungen wurden unter gleichen Bedingungen durchgeführt (die gleiche Glycerinkonzentration, die gleiche Inkubationstemperatur von 25°C); beide Enzyme bleiben unter diesen Bedingungen stabil.

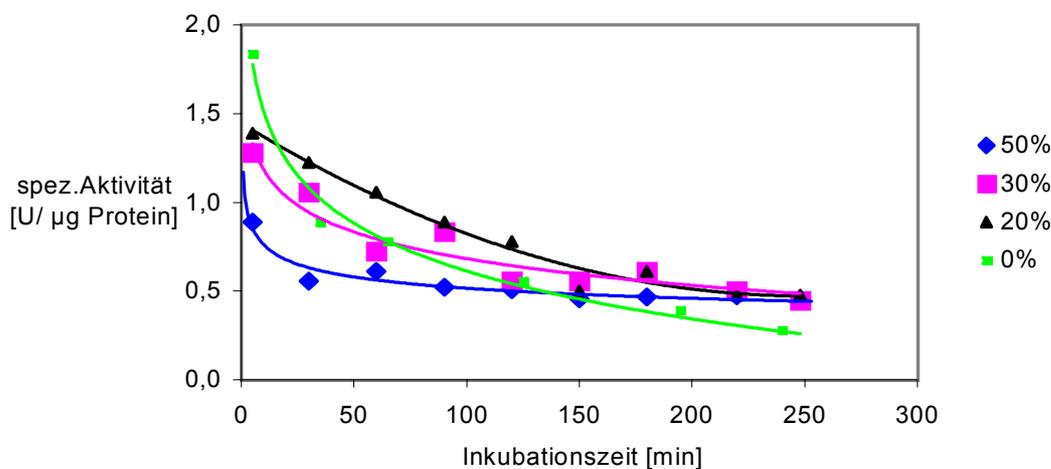


Abbildung 45: Stabilität der IgA-Protease bei unterschiedlichen Glycerinkonzentrationen während der Inkubation bei 25°C.

Da eine 20% Glycerinkonzentration für die geplante Transferasereaktion im Zeitintervall bis 180 min dem Reaktionssystem die höchsten Aktivitäten bereitstellt, wurde diese Stabilisatorkonzentration für die präparativen Umsetzungen herangezogen.

8. Enzymatische Hydrolyse mit geeigneten Substraten

8.1. Verbesserung der Substratstruktur

In der Dissertation von C.Seitz ^[36] wurden Variationen der Acyldonorstruktur untersucht. Durch Vergleich des kinetischen Verlaufes der enzymatischen Hydrolyse für unterschiedliche Substrate stellte sich heraus, dass die beste Acyldonorstruktur ein Arginin an der P₃-Position enthält. Zusätzlich wurde der Einfluss der Abgangsgruppe auf die Hydrolyse untersucht. Aus dem Vergleich der Kinetik der enzymatischen Hydrolyse für drei unterschiedliche Ester, die als Acyldonoren dienten: OtBu, OMe und OBzl konnte man feststellen, dass die beste Abgangsgruppe ein OBzl-Ester ist. Es ist allgemein bekannt, dass die Prolinreste an den Positionen: P₁, P₂ und P₄ unentbehrlich sind, um die Aktivität der IgA-Protease überhaupt beobachten zu können. Aufgrund dieser Informationen konnte man die beste Acyldonorstruktur zusammenstellen:

P ₄	P ₃	P ₂	P ₁	Abgangsgruppe
Pro	Arg	Pro	Pro	OBzl

Man hat sich überlegt, ob man die Substratstruktur so verbessern kann, dass die Affinität des Substrates zum Enzym und damit die Geschwindigkeit der enzymatischen Umsetzung vergrößert wird. Wenn man statt eines Tetrapeptidesters ein längeres Peptid als Substrat verwendet, wird die Erkennungssequenz für das Enzym verlängert. Man kann davon ausgehen, dass dadurch die Affinität des Substrats an das Enzym verbessert wird (auf diese Art wird der K_M-Wert beeinflusst). Je kleiner der K_M-Wert ist, desto höhere Affinität besitzt das Substrat zu dem Enzym, so dass das Enzym mit niedrigeren Substratkonzentrationen gesättigt wird. Die beste Erkennungssequenz für die IgA-Protease wurde auch von C.Seitz gesucht und wie folgt bezeichnet:

P ₄	P ₃	P ₂	P ₁	P ₁ '	P ₂ '	P ₃ '	P ₄ '
Pro	Arg	Pro	Pro	Ala	Pro	Ser	Trp
				Gly		Trp	Tyr
						Tyr	

Da bekanntermassen die Estersubstrate leichter als Amide hydrolysiert werden, ist es besser, statt einer Amidbindung an der P₁-P₁' Spaltungsposition eine Esterbindung einzubauen. Als Strukturanaloga am nächsten stehen Milchsäure als Analogon von Alanin und Glycolsäure als Analogon von Glycin. Die beiden α -Hydroxysäuren

sollten also in die Peptide eingebaut werden, so dass im Endeffekt Depsipeptide entstehen, die anstatt Alanin und Glycin an der P₁'-Position eine L-Milchsäure oder Glycolsäure enthalten.

Durch einen synergistischen Effekt von der verlängerten Erkennungssequenz und Esterbindung an der Spaltungstelle der Protease kann man eine Verbesserung des $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert erwarten sowohl im Vergleich zu Peptiden als auch Peptidestern.

8.2. Theoretische Grundlagen für die Modifizierung

In den verbesserten Substraten wurden zwei Eigenschaften modifiziert. Als Erstes wurde die Länge des Substrats verändert, so dass man über eine längere Erkennungssequenz verfügte und dadurch theoretisch auch eine höhere Affinität des Substrats zu der IgA-Protease erreichen konnte. Der K_{M} -Wert kann als Gleichgewichtskonstante aufgefasst werden, die die Dissoziation des ES-Komplexes beschreibt. Je kleiner sie ist, desto stabiler ist der ES-Komplex. Wie man aus dem Energiediagramm (*Abbildung 46*) sieht, entspricht der K_{M} -Wert der freien Assoziationsenthalpie der ES-Zwischenverbindung.

Die zweite Modifikation war die Einführung einer Esterbindung anstatt der Peptidbindung an der Spaltungsstelle. Es ist aus Arbeiten mit anderen Proteasen bekannt, dass die Esterbindung an der Spaltungsstelle leichter hydrolysiert wird. Damit wird der k_{cat} -Wert erhöht und die Aktivierungsenergie des Gesamtprozesses erniedrigt. Der Vorteil dieser Strukturvariation wird sichtbar, wenn man Depsipeptide mit Substraten vergleicht, die eine Peptidbindung an dieser Stelle enthalten.

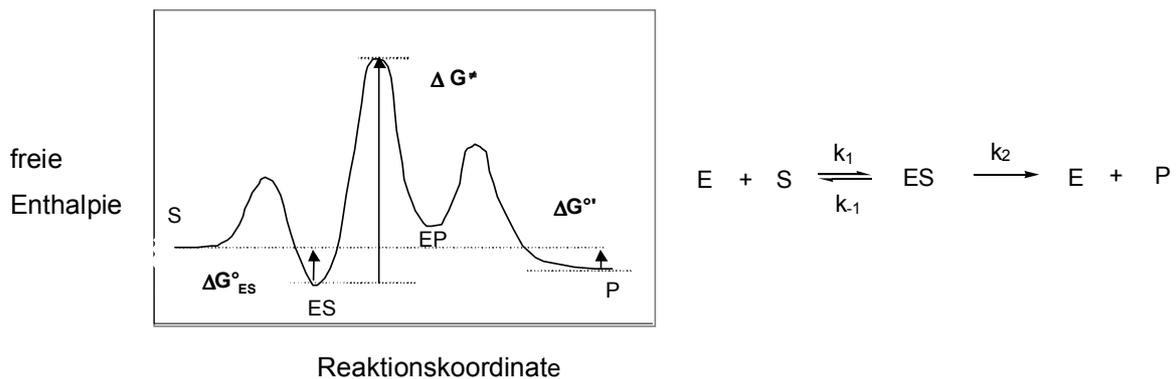


Abbildung 46: Energiediagramm für die enzymatische Katalyse der Hydrolysereaktion. Die Verbesserung des Substrates (Reduktion des K_M , Steigerung von k_{cat}) ist direkt mit den freien Enthalpien ΔG° , ΔG^\ddagger gekoppelt und hat Einfluss auf die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion und Affinität des Substrats an das Enzym. Den Zusammenhang beschreiben folgende Gleichungen: $\Delta G^\circ = -RT \ln K'_{eq}$, wobei $K'_{eq} = [\text{Produkt}] / [\text{Substrat}]$; Gleichgewichtskonstante unter biochemischen Standardbedingungen, $\Delta G_{ES}^\circ = -RT \ln K_M$ wobei $K_M = k_{-1} + k_2 / k_1$ und $k_2 \ll k_{-1}$, $\Delta G^\ddagger = -RT \ln k_{cat}$

8.3. Synthese von verbesserten Substraten

8.3.1. Synthese von Boc-Pro-Arg-Pro-Pro-O[Gly]-Pro-Trp-NH₂ 12

Die Synthese könnte am festen Träger oder in der Lösung durchgeführt werden. Da man für kinetische Untersuchungen relativ große Mengen von Depsipeptid brauchte, wurde der Synthese in der Lösung der Vorzug gegeben, was zwar wegen der Aufarbeitung nach jeder Stufe und der Optimierung der einzelnen Stufen arbeitsaufwendiger aber auch preiswerter ist.

Die Strategie der Synthese ist in *Abbildung 47* dargestellt. Die Synthese sah die Kupplung von drei Segmenten vor: Boc-Pro-[OGly]-OH **4**, H-Pro-Trp-NH₂ **8** und Boc-Pro-Arg-Pro-OH **11**. Die zwei letzten Segmente wurden auf die übliche Art durch Verwendung von Kupplungsreagenz (HBTU) mit einem Überschuß von organischen Basen (EDIPA, TEA, NMM) synthetisiert. Dabei wurden als Schutzgruppen Boc- und Z- Gruppen verwendet. Die beiden Gruppen sind leicht abspaltbar, entweder mit Trifluoressigsäure in Gegenwart von Triethylsilan (Abspaltung der Boc-Gruppe) oder durch Hydrogenolyse mit 10% Palladium auf Kohle als Katalysator (Abspaltung der Z-Gruppe).

Das Dipeptid wurde durch Reaktion von Benzylbromoacetat mit geschütztem Prolin hergestellt. Man konnte auf dieser Weise die Optimierung der Reaktion zwischen Glycolsäure und *H-Pro-Trp-NH₂* **8** vermeiden (die entsprechende Reaktion für Milchsäure musste optimiert werden). Die hier beschriebene Reaktion lief mit fast quantitativer Ausbeute und lieferte keine nennenswerten Nebenprodukte. Das Produkt verfügte über hydrophobe Schutzgruppen, die die Aufarbeitung im Vergleich zu dem freiem Glycolsäurederivat *HO[Gly]-Pro-Trp-NH₂* sehr erleichterte.

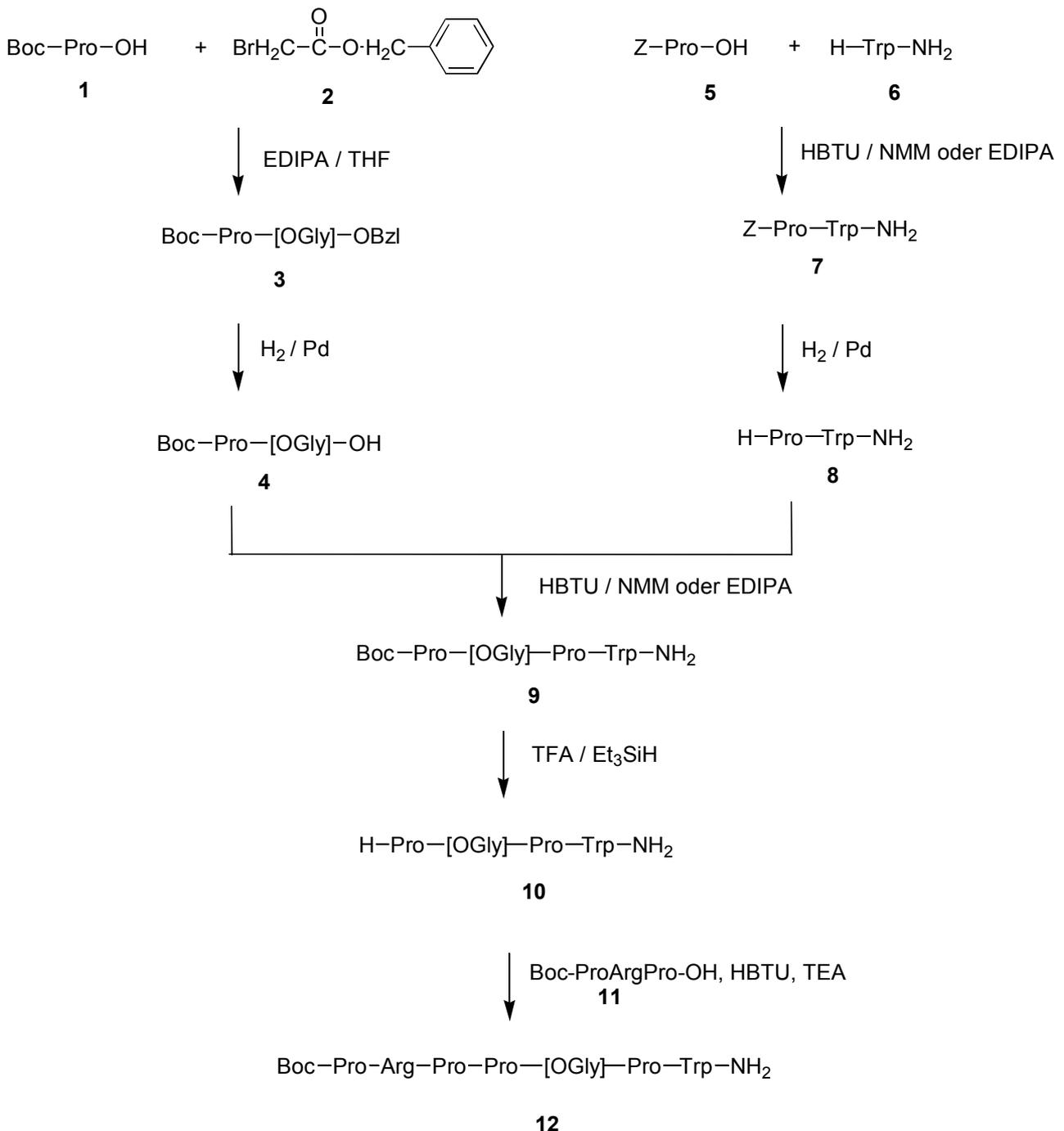


Abbildung 47: Synthesestrategie für Boc-Pro-Arg-Pro-Pro-O[Gly]-Pro-Trp-NH₂ **12**.

Die Kupplungsmethode wurde von Suich et al. ^[167] zur Herstellung von Fmoc-Tyr(OtBu)-O[Gly]-OBzl beschrieben. Für unsere Zwecke musste man andere Schutzgruppen verwenden und die Reaktion optimieren, was zu viel kürzeren Reaktionszeiten als in der Literatur angegeben führte.

Die Kupplung zwischen den zwei Segmenten *H-Pro-O[Gly]-Pro-Trp-NH₂ 10* und *Boc-Pro-Arg-Pro-OH 11* verlief mit etwa 80% Ausbeute (HPLC, nach der Isolierung 60%). Wichtig für die Reaktion war wasserfreies Lösungsmittel, da sonst das Kupplungsreagenz HBTU schnell inaktiviert wurde und die Reaktion dann mit niedrigerer Ausbeute verlief. Die Reaktionsbedingungen mußten für diese Kupplung optimiert werden. Die zwei nächsten Tabellen: *Tabelle 11* und *Tabelle 12* fassen die Bedingungen für die erfolgreichen und mißlungenen Kupplungen zusammen.

Tabelle 11: Kupplungsexperimente zur Herstellung von Verbindung 12.

Experiment	1	2	3	4
Ansatzgrösse 10 [mMol]	1	1	1	1
Ansatzgrösse 11 Mol %	100	100	120	120
Kupplungsreagenz Mol %	Mukaiyama, 150	Mukaiyama, 150	HBTU, 150	HBTU, 150
Base, Mol %	NMM, 500	NMM, 500	TEA, 400	TEA, 400
Lösungsmittel (über Al ₂ O ₃ filtriert)	CH ₂ Cl ₂ /DMF, (10:1 v:v)	CH ₂ Cl ₂	DMF	DMF

Tabelle 12: Nicht erfolgreiche Kupplungsexperimente zur Herstellung von Verbindung 12.

Experiment	5	6	7
Ansatzgrösse 10 [mMol]	1	1	1
Ansatzgrösse 11 , Mol %	120	120	120
Kupplungsreagent, Mol %	HBTU, 150	HBTU, 150	HBTU, 150
Base, Mol %	NMM, 400	NMM, 400	TEA, 400
Lösungsmittel	CH ₃ CN / DMF, 4:2 (v:v)	CH ₃ CN	DMF

Das Produkt konnte nicht auf die übliche Weise aufgearbeitet werden, weil die enthaltene Esterbindung in wässrigen alkalischen und sauren Lösungen labil war. Der Basenüberschuss sowie der Hauptteil der noch vorhandenen Kupplungsreagenzien und des in der Reaktion entstehenden HOBt konnte aus der Reaktionslösung mit leicht saurer Pufferlösung ausgewaschen werden. Das Depsipeptid wurde dann aus Acetonitril mit kaltem tBuOMe ausgefällt. Die Sauberkeit des erhaltenen Produktes war für die enzymatische Untersuchungen nicht ausreichend, weshalb die Verbindung über Ionenaustauschchromatographie und Reverse Phase Mitteldruckchromatographie gereinigt wurde. Dafür musste wässriger Puffer verwendet werden, um starke pH-Wert Schwankungen zu vermeiden. Abgesehen von der Hydrolyse zersetzte sich das Produkt auch in der Luft, so dass man während der Chromatographie rasch arbeiten musste. Die Oxidation zu einem Zersetzungsprodukt wurde auch während der Lagerung des Produktes bei 4°C beobachtet. Das gleiche Zersetzungsprodukt wurde auch bei der Lagerung des Depsipeptides bei -18°C beobachtet. Erst beim Aufbewahren unter Argon oder Stickstoffatmosphäre blieb das Produkt stabil, unabhängig davon, ob das Peptid bei -18°C oder in flüssigen Stickstoff aufbewahrt wurde. Die während der Lagerung entstandenen Produkte wurden isoliert und mit ESI-MS analysiert. Die gefundenen Massen waren Produkten zuzuschreiben, die durch Oxidation des Indolrings des Tryptophans mit Luftsauerstoff, intramolekulare Umlagerung von Depsipeptiden oder während der Reduktion mit Palladium entstehen konnten. Alle drei Reaktionen wurden für ähnliche Strukturen schon in der Literatur beschrieben. ^[168] ^[172]-^[174] In der *Abbildung 48* sind Strukturen gezeigt, die naheliegen und mit den beobachteten Massen kompatibel sind.

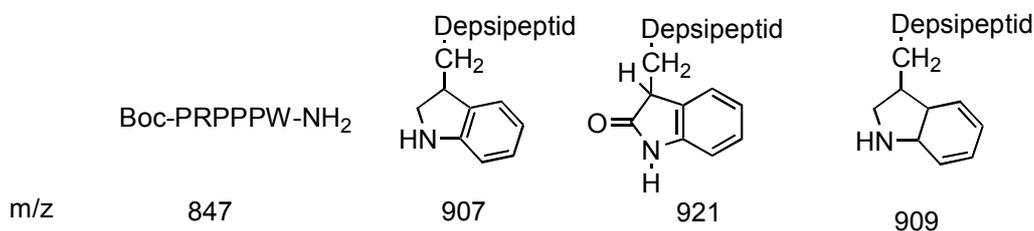


Abbildung 48: Beispiele für potentielle Strukturen der Zersetzungsprodukte von Boc-Pro-Arg-Pro-O[Gly]-Pro-Trp-NH₂ 12.

Die Charakterisierung des Peptoids **12** erfolgte durch NMR-Spektroskopie und Massenspektroskopie. In Abbildung 49 ist das ^{13}C Spektrum abgebildet. Charakteristisch für diese Verbindung und erkennbar sind Signale der Boc-Gruppe (bei 82 ppm) und aromatische Signale des Tryptophans (im Bereich 110-140 ppm). Außerdem kann man im ^{13}C -Spektrum 8 Kohlenstoffe von Carbonylgruppen (im Bereich 168-177 ppm), 23 Signale von aliphatischen Kohlenstoffen und ein Signal für Guanidiniumgruppe des Arginins (bei 159 ppm) erkennen, was für die gewünschte Struktur spricht. Durch Massenspektroskopie konnte die Identität der Verbindung eindeutig nachgewiesen werden. In Abbildung 50 wird ein ESI-MS Spektrum dargestellt mit einem Hauptpeak, der dem Molekülpeak $[\text{M}+\text{H}]^+=906,5$ entspricht.

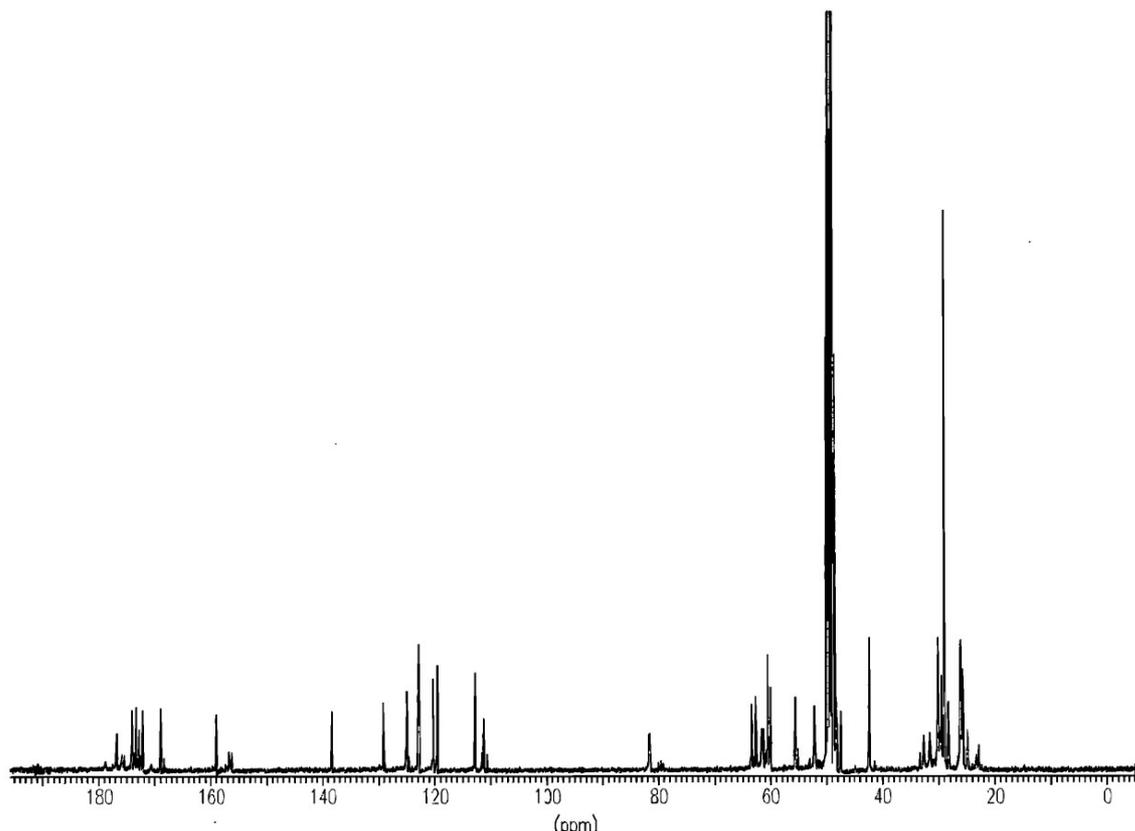


Abbildung 49: ^{13}C -NMR Spektren von Peptoid **12** in MeOD.

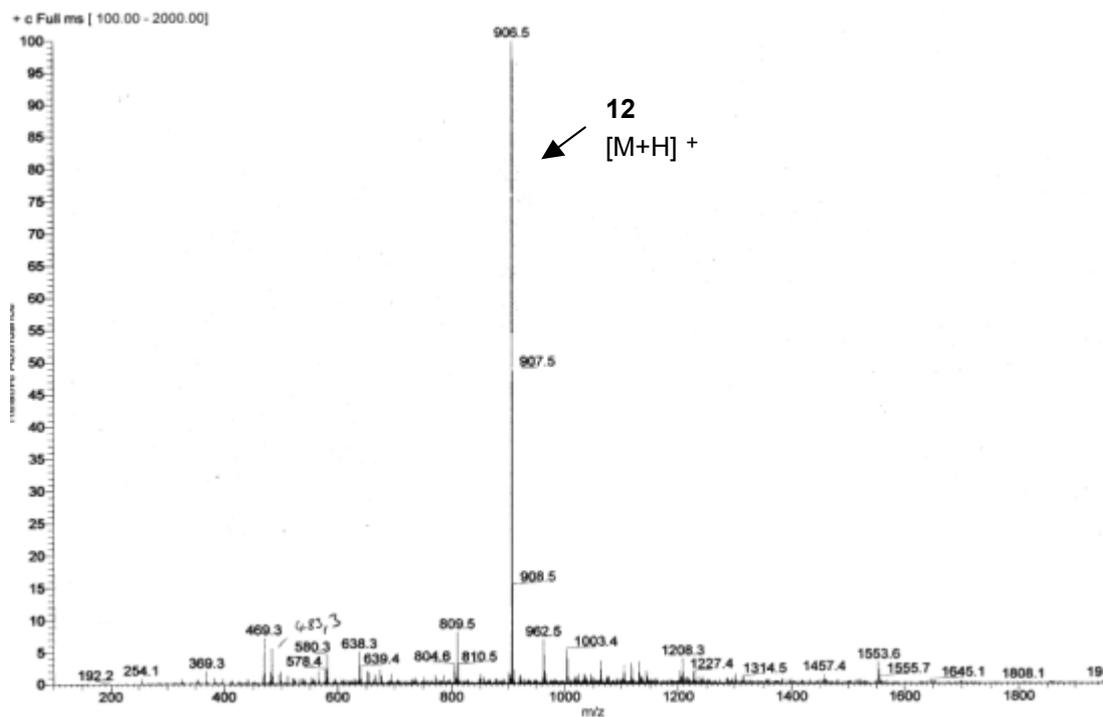


Abbildung 50: ESI-MS von Peptoid **12**.

8.3.2. Synthese von *Boc-Pro-Arg-Pro-Pro-O[Ala]-Pro-Trp-NH₂* **19**

Die Synthese des Milchsäurederivats **19** wurde unter Verwendung der Boc-Strategie durchgeführt (Abbildung 51) und bestand aus der Kupplung von zwei Segmenten: dem Depsipeptid mit einer Milchsäureeinheit *H-Pro-O[Ala]-Pro-Trp-NH₂* **18** und einem Tripeptid *Boc-Pro-Arg-Pro-OH* **11**. Das benötigte Tripeptid war identisch mit dem Tripeptid, das man zur Synthese des Glykolsäurederivats brauchte. Die Synthese des Milchsäurederivats wurde abweichend von der des Glykolsäurederivats **12** durchgeführt. Die Milchsäure wurde direkt an das Prolyltryptophanamid **8** gekuppelt. An dieser Stelle hat man Milchsäure in verschiedenen Formen an das Peptidylamid angehängt: als freie Säure, als Natriumlactat und mit über Acetylierung geschützter α -Hydroxygruppe.

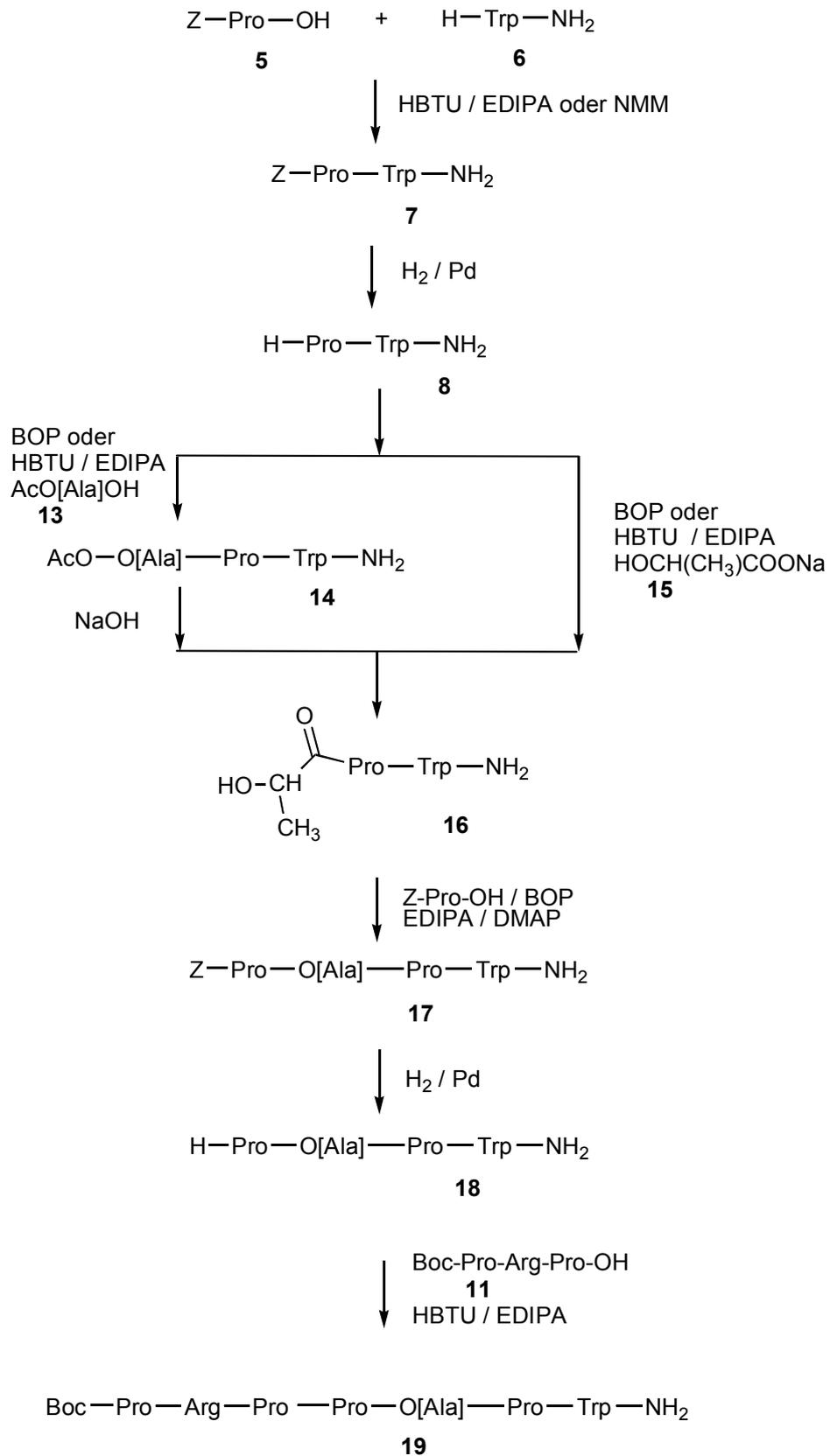


Abbildung 51: Schema der Synthese von Boc-Pro Arg-Pro-Pro-O[Ala]-Pro-Trp-NH₂ **19**.

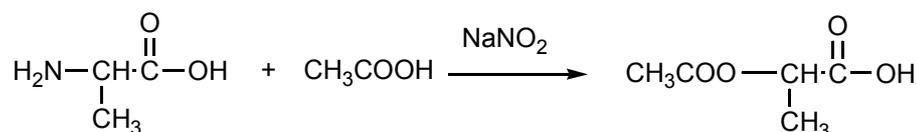
Bei der Kupplung zwischen Milchsäure und Prolyltryptophanamid mußten die Bedingungen optimiert werden, weshalb unterschiedliche Milchsäurederivate verwendet und Kupplungsreagenzien, Basen und Lösungsmittel variiert wurden. Die einzelnen Experimente wurden in der *Tabelle 12* zusammengefasst.

Tabelle 12: Optimierung der Synthese von HO-[Ala]-Pro-Trp-NH₂ 16.

#	Edukte	Kupplungsreagenz	Base	Lösungsmittel	Ausbeute (mit HPLC bestimmt)	Reaktionszeit / Temperatur
1.	Milchsäure (1,2 Äq.) + H-PW-NH ₂	HBTU 1,2 Äq.	NMM 1,2 Äq.	CH ₃ CN	30%	4 h, RT
2.	Natriumlactat (1,0 Äq.) + H-PW-NH ₂	BOP 1,0 Äq.	EDIPA 1,9 Äq.	CH ₃ CN/DMF (5:1, v:v)	60%	24 h, RT
3.	Natriumlactat (1,0 Äq.) + H-PW-NH ₂	BOP 1,0 Äq.	EDIPA 1,2 Äq.	CH ₃ CN	80%	3 h, RT
4.	Natriumlactat (1,0 Äq.) + H-PW-NH ₂	BOP 1,0 Äq.	EDIPA 1,9 Äq.	DMF	0%	60 h, RT
5.	acetyliertes Natriumlactat (1,0 Äq.) + H-PW-NH ₂	BOP 1,0 Äq.	EDIPA 1,0 Äq.	CH ₃ CN/DMF (3,5:1, v:v)	5%	2 h, RT
6.	acetyliertes Natriumlactat (1,0 Äq.) + H-PW-NH ₂	EDC 1,0 Äq.	EDIPA 1,2 Äq.	CH ₃ CN/DMF (8:1, v:v)	25%	48 h, RT
7.	acetyliertes Natriumlactat (1,0 Äq.) + H-PW-NH ₂	BOP 1,0 Äq.	EDIPA 1,2 Äq.	CH ₃ CN/DMF (8:1, v:v)	80% (70%)	48 h, RT (1 h.)
8.	acetyliertes Natriumlactat (1,0 Äq.) + H-PW-NH ₂	HBTU 1,0 Äq.	EDIPA 1,2 Äq.	CH ₃ CN/DMF (8:1, v:v)	80% (71%)	48 h, RT (4 h)
9.	acetyliertes Natriumlactat (1,0 Äq.) + H-PW-NH ₂	Mukaiyama Reagenz 1,0 Äq.	EDIPA 1,2 Äq.	CH ₃ CN/DMF (8:1, v:v)	43%	48 h, RT
10.	acetyliertes Natriumlactat (1,0 Äq.) + H-PW-NH ₂	BOP 1,5 Äq.	EDIPA 2,5 Äq.	CH ₃ CN/DMF (10:1, v:v)	90%	50 min, 60°C
11.	acetyliertes Natriumlactat (1,0 Äq.) + H-PW-NH ₂	HBTU 1,5 Äq.	EDIPA 5,0 Äq.	CH ₃ CN/DMF (8:1, v:v)	90%	12 h, 60°C

Die Reaktion mit Milchsäure, die nicht in einer anionischen Form eingesetzt wurde, erreichte schlechtere Ausbeuten. Aus diesem Grund wurden die weiteren Reaktionen mit Milchsäure in der Form des Natriumsalzes durchgeführt. Ungeachtet des Protonierungszustands der Milchsäure wurde das gleiche Produkt erhalten, was über HPLC-Koinjektion bewiesen wurde. Die Reaktion mit Acetylmilchsäure brachte ein Produkt, das nach alkalischer Hydrolyse das identische Produkt ergeben hat, wie Produkte nach der Kupplung mit Milchsäure in nicht acetylierter Form. Sowohl die nicht-geschützte als auch die acetylierte Milchsäure reagierten praktisch ohne Nebenreaktionen. Die Menge an Nebenprodukten war in allen Fällen niedriger als 5%. Interessant war der Einfluss des Lösungsmittel auf die Reaktion. Die Reaktion in reinem DMF war wesentlich schlechter als die in einer DMF/Acetonitril-Mischung oder Acetonitril selbst.

Die zur Kupplungsreaktion zwischen Milchsäure und dem Prolyltryptophanamid benötigte acetylierte Milchsäure, wurde durch Reaktion von L-Alanin mit Essigsäure in Anwesenheit von NaNO_2 gewonnen. ^[175]



13

Die besten Kupplungsreagenzien für die Anknüpfung der Milchsäure an das Dipeptidylamid waren BOP und HBTU. Die beiden Reagenzien ergaben ähnliche Ausbeuten und nur geringe Mengen an Nebenprodukten.

Die nächste Stufe war die Bildung der Esterbindung zwischen einem Prolinderivat und dem Milchsäurederivat. Die Bildung der Peptoidbindung wurde in der Literatur beschrieben und kann auf unterschiedliche Weise realisiert werden. In der *Tabelle 13* sind die einzelnen Methoden mit entsprechenden Literaturstellen aufgelistet.

Tabelle 13: Methoden zur Synthese der Peptoidbindung.

Nu.	Methode	Lit.
1.	HBTU, 10% DMAP, EDIPA, CH₃CN	[176]
2.	EDC, 16% DMAP, EDIPA, CH ₃ CN	[177]
3.	DCC, N-OH succinimide, DMAP, CH ₂ Cl ₂	[178]
4.	DCC, DMAP, NMM oder EDC, HOBT, NMM	[179]

Schließlich wurde die Methode mit HBTU und DMAP zur Bildung der Peptoidbindung verwendet. Zur laut HPLC quantitativ verlaufenden Kupplung benötigte man einen großen Überschuss von EDIPA (5,5 Äq.), HBTU (1,7 Äq.) und DMAP (1,0 Äq.) und trockenes DMF.

Eine weitere Reaktion, die optimiert werden musste, war die Kupplung zwischen Depsitetrapeptid **18** und dem Tripeptid **11**. Die mißlungenen und erfolgreichen Experimente sind in *Tabelle 14* zusammengefasst. In den Reaktionen 2 und 3 wurde noch zusätzlich Molekularsieb 4Å zur Reaktionslösung gegeben, so dass das sich im Laufe der Reaktion bildende Wasser abgefangen wurde.

Tabelle 14: Erfolgreiche (1,2,3,4,5) und nicht erfolgreiche (6,7,8) Experimente der Segmentkupplung von **11** und **18**.

Exp.	BocPRPPOH 11	Kupplungsreagenz	Base	Lösungsmittel
1.	1.1 Äq.	HBTU, 3.0 Äq.	EDIPA, 5.0 Äq.	DMF
2.	1.2 Äq.	HBTU, 1.5 Äq.	TEA, 8.0 Äq.	DMF
3.	1.2 Äq.	HBTU, 3.7 Äq.	EDIPA, 7.5 Äq.	DMF
4.	1.0 Äq.	HBTU, 1.2 Äq.	EDIPA 1.5 Äq.	CH ₃ CN
5.	1.0 Äq.	HBTU, 1,5 Äq.	TEA, 2.0 Äq.	CH ₃ CN
6.	1.0 Äq.	BOP, 2.0 Äq.; DMAP, 4.0 Äq.	EDIPA, 4.0 Äq.	DMF
7.	1.0 Äq.	Mukaiyama, 1.5 Äq.	NMM, 5.0 Äq.	CH ₂ Cl ₂
8.	1.2 Äq.	HBTU, 1.5 Äq.	NMM, 4.0 Äq.	CH ₃ CN/DMF, (4:5, v:v)

Die beste Ausbeute ergab die dritte Reaktion, in der man einen großen Überschuss an Kupplungsreagenz und Base verwendete. Wenn man die beiden Tabellen vergleicht, sieht man, dass der große Überschuss an Base und Kupplungsreagenz entscheidend für den erfolgreichen Verlauf der Reaktion war. Wieder spielt auch der Wassergehalt in der Reaktion eine wichtige Rolle. In allen Fällen, in denen ein getrocknetes Lösungsmittel verwendet wurde, wurden auch höhere Ausbeuten erreicht. Bei der Aufarbeitung und Aufbewahrung des Heptadepsipeptids mußten die gleichen Regeln wie für das Glycolsäurederivat eingehalten werden (gepufferte Wasserlösung während der Extraktion und Chromatographie, Stickstoff oder Argonatmosphäre während Lagerung bei -18°C oder in flüssigen Stickstoff), sonst beobachtete man die Zersetzungsreaktion.

Die Charakterisierung des Peptoids **19** erfolgte durch NMR-Spektroskopie und Massenspektroskopie. In *Abbildung 52* ist das ^{13}C -NMR Spektrum abgebildet. Außer charakteristischen Signalen, die analog zu den Signalen der Verbindung **12** sind, findet man Signale der Milchsäure bei 24,9 ppm (Methylgruppe) und bei 30,2 ppm (α -CH-Gruppe). Durch Massenspektroskopie konnte die Identität der Verbindung eindeutig nachgewiesen werden. In *Abbildung 53* ist das ESI-MS Spektrum dargestellt mit einem Hauptpeak, der dem Molekülpeak $[\text{M}+\text{H}]^+=920,5$ entspricht.

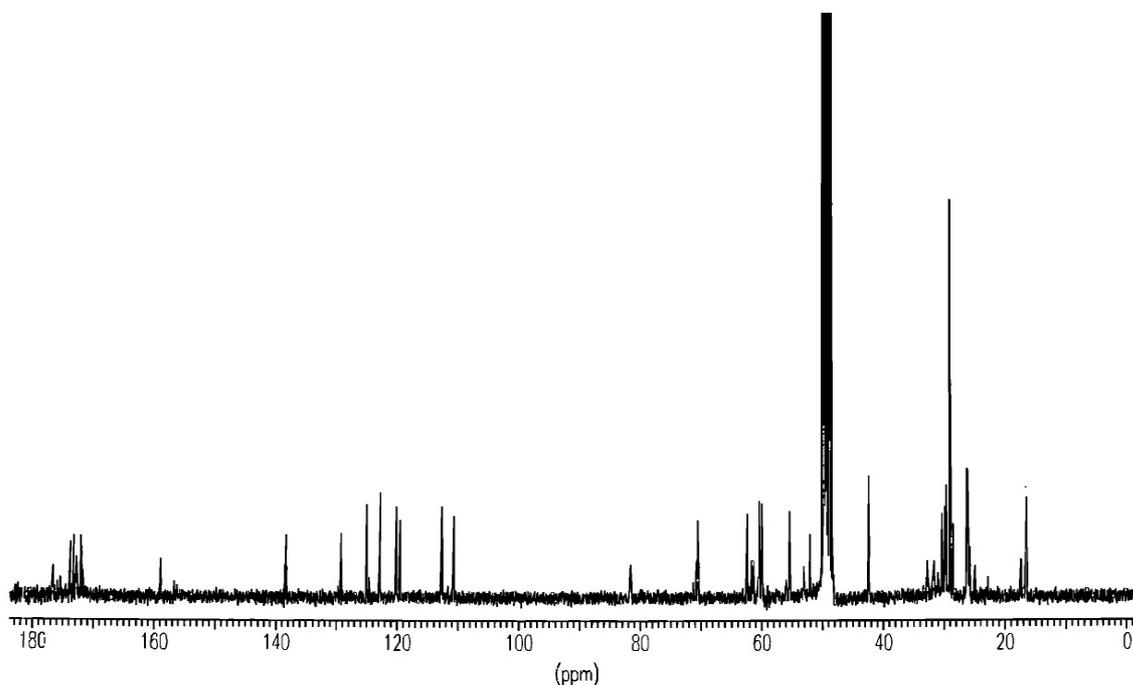


Abbildung 52: ^{13}C -NMR Spektrum von Peptoid **19**.

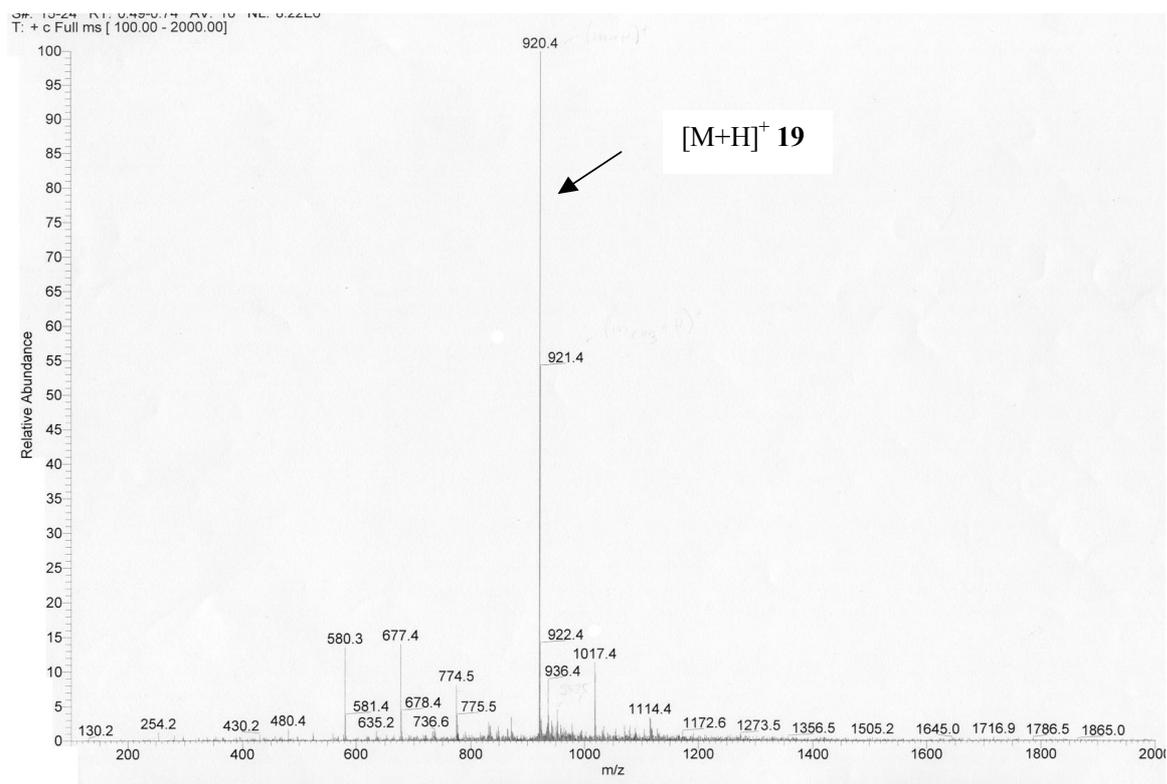


Abbildung 53: ESI-MS von Peptoid 19.

8.3.3. Synthese von Boc-Pro-Arg-Pro-OH 11

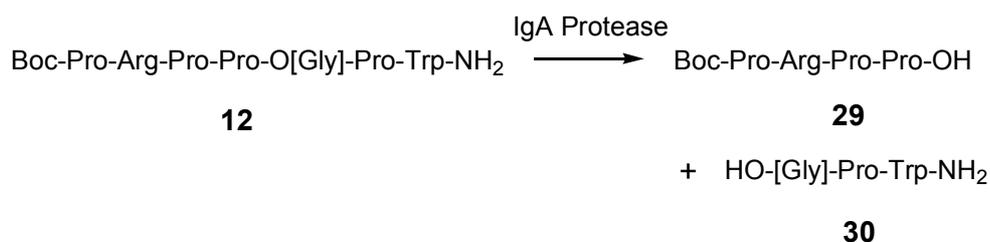
Die Synthese wurde nach der Boc-Strategie (Abbildung 54) durchgeführt. Als Schutzgruppe wurde die Z-Gruppe eingesetzt, weil sie in einem Schritt abgespalten werden konnte. Das Produkt wurde als Segment bei der Darstellung der Milchsäure und Glykolsäure enthaltenden Depsipeptide, sowie für weitere Enzymsubstrate wie : Boc-Pro-Arg-Pro-Pro-OMe **26**, Boc-Pro-Arg-Pro-Pro-pNA **27**, Boc-Pro-Arg-Pro-Pro-OBzl **28** verwendet.

8.4. Kinetik der enzymatischen Hydrolyse von Depsipeptiden

8.4.1. Kinetik der Hydrolyse von *Boc-PRPPO[Gly]PW-NH₂* **12**

Es wurde erwartet, dass die Peptoide bessere Substrate als die Ketten-verkürzten Ester oder Peptide sind. Um diese Substrate mit anderen vergleichen zu können, brauchte man die K_M und k_{cat} -Werte, die über Affinität und turnover informieren. Aus diesem Grund wurde die Kinetik der Hydrolyse von *Boc-PRPPO[Gly]PW-NH₂* **12** untersucht.

Der Verlauf der enzymatischen Hydrolyse des Glycolsäurederivats **12** wurde mit HPLC untersucht. Da sowohl Produkt als auch Substrat Fluorophore enthalten (den Indolring von Tryptophan), konnte man die Fluoreszenzsignale beider Verbindungen messen und auf die Menge des Substrats oder Produktes umrechnen.



Bedingungen:

Reaktion 1: 17mmol/l Glycolsäurederivat, TAPS Puffer (200mM, EDTA 1mM), pH = 7,9, 16% MeOH, c_E in Reaktionslösung = 23 $\mu\text{g/ml}$, $A = 26 \text{ U/ml}$.

Reaktion 2: 18 mM Lösung Glycolsäurederivat, TAPS Puffer(wie oben), $T=25^\circ\text{C}$, 15 % MeOH, c_E in Reaktionslösung = 28 $\mu\text{g/ml}$, $A = 47.6 \text{ U/ml}$.

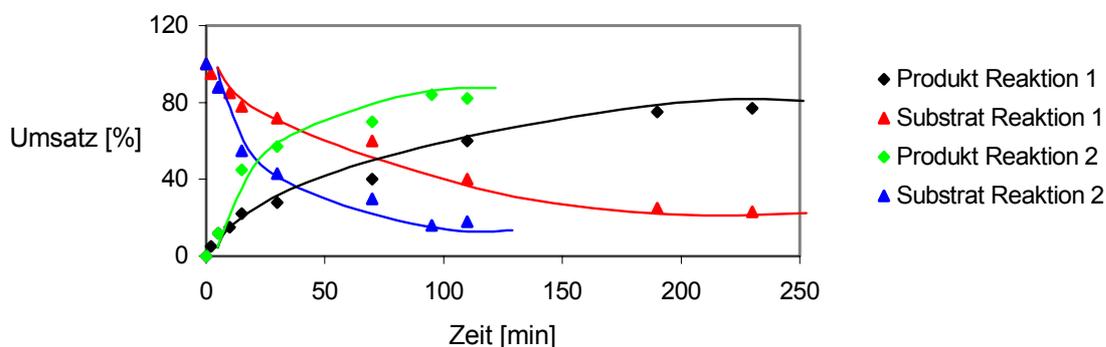


Abbildung 55: Kinetischer Verlauf der enzymatischen Hydrolyse von *Boc-Pro-Arg-Pro-Pro-O[Gly]-Pro-Trp-NH₂* **12** mit IgA-Protease.

Abhängig von der Enzymaktivität verläuft die Hydrolyse mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Aus dem Verlauf der Kurve sieht man, dass die Reaktion nicht mit 100% Ausbeute verläuft. Nach etwa 180 min beobachtete man keinen Umsatz mehr. Man kann davon ausgehen, dass nach dieser Zeit das Enzym nicht mehr aktiv war und man nur spontane Hydrolyse beobachtet hat.

8.4.2. Praktische Schwierigkeiten bei der Bestimmung des K_M -Werts

Bei der K_M -Wert Bestimmung der IgA-Protease mit **12** lagen die Schwierigkeiten zunächst an der schlechten Löslichkeit des Substrates in der wässrigen Lösung, was wegen des grösseren Anteils an hydrophoben Aminosäuren (Pro, Trp) nicht unerwartet war. Die Löslichkeit konnte durch Zusatz von organischen Lösungsmitteln (MeOH, EtOH, DMSO) verbessert werden. Der Anteil an organischen Lösungsmitteln sollte dabei nicht zu hoch sein wegen seiner inhibierenden Wirkung auf die Aktivität des Enzyms.

Daneben beobachtete man einen starken Aktivitätsverlust des Enzyms während der kinetischen Messung. Parallel dazu fand außerdem spontane Hydrolyse des Peptoids statt, so dass man Schwierigkeiten hatte, die Kinetiken nach der Michaelis-Menten Korrelation zu analysieren und zu reproduzieren. Die erhaltenen kinetischen Daten zeigten statt einer hyperbolischen Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit der Hydrolyse von der Substratkonzentration eher eine lineare Abhängigkeit. Solche Ergebnisse waren auf die vorherrschende Spontanhydrolyse des Substrats und die sehr niedrige Aktivität der eingesetzten Enzymcharge zurückzuführen. Ein Beispiel für die erhaltene Kinetik ist in *Abbildung 56* gezeigt. Dabei muss man an dieser Stelle erinnern, dass schon während der Synthese der Peptide die starke Labilität der Peptidbindung festgestellt wurde.

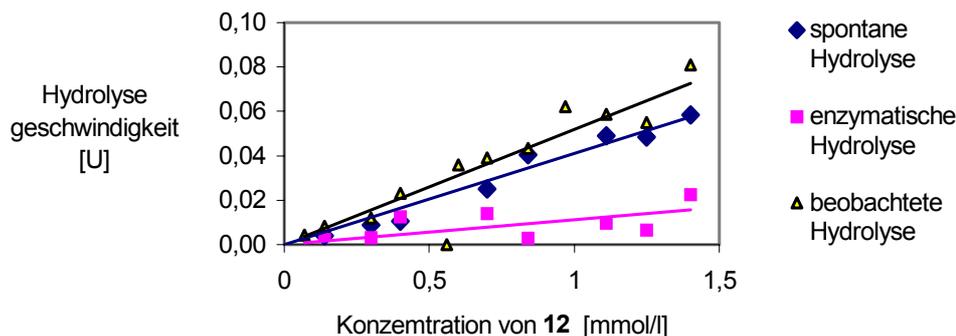


Abbildung 56: Anteil der Spontanhydrolyse bei der enzymatischen Spaltung von Boc-Pro-Arg-Pro-Pro-O[Gly]-Pro-Trp-NH₂ **12**. Bedingungen: T=32°C, c_E=0.1 µg/ml, n_E= 50 ng, TAPS-Puffer (200mM, EDTA 1mM), pH=8.7.

Bei der starken spontanen Hydrolyse (die sowohl in der Substratstammlösung als auch während der Reaktion selbst zu beobachten ist), war der enzymatische Anteil an der Gesamthydrolyse sehr klein. Bei höheren Enzymkonzentrationen und höherer Aktivität des Enzyms sollte eine Michaelis-Menten-Korrelation abgeleitet werden.

Im Weiteren wurden die Reaktionsbedingungen optimiert, so dass die störenden Faktoren (wie z.B. die Spontanhydrolyse) unterdrückt werden konnten.

8.4.3. Spontane Hydrolyse

Das Problem der Spontanhydrolyse während der enzymatischen Proteolyse ist bekannt und wurde schon in der Literatur an ähnlichen Verbindungen beschrieben.^[180]
[181]

Schon während der Synthese des Depsipeptides wurde beobachtet, dass die Esterbindung labil ist und leicht gespalten wird. Die Vermutung war, dass die Spontanhydrolyse einen wesentlichen Teil der Reaktion ausmacht. Der Anteil an Spontanhydrolyse sollte dem zufolge von der Aktivität und Menge des Enzyms im Reaktionsansatz abhängen. Da die Kinetik auf der HPLC-chromatographischen Bestimmung der Gesamtmenge an Produkt beruht, wird sowohl der durch Spontanhydrolyse in der Stammlösung als auch während der eigentliche Messung gebildete Produktbeitrag erfasst.

Die spontane Hydrolyse in der Stammlösung fällt viel stärker ins Gewicht als die während der Reaktion, weil die Konzentration des Peptoids in der Stammlösung viel hö-

her ist und damit die Reaktionsgeschwindigkeit ebenfalls höher. Dieser Beitrag wurde dadurch reduziert, dass man die Lösung bei -18°C aufbewahrte und so kurz wie möglich bei Raumtemperatur handhabte.

Die Hydrolyse während der Reaktion beträgt zwar nur einen Bruchteil der Hydrolyse in der Stammlösung, weil die Konzentration des Peptoids entsprechend niedriger ist und die Reaktion kürzer dauert. Allerdings ist dieser Hydrolysebeitrag besonders stark bei höheren Temperaturen ($35\text{-}37^{\circ}\text{C}$) zu beobachten.

Um den Anteil der Spontanhydrolyse zu reduzieren, wurde der Einfluss der Reaktionsbedingungen wie dem pH-Wert, der Pufferart, der Pufferkonzentration und der Temperatur auf die Hydrolysegeschwindigkeit untersucht.

Zunächst bestimmte man den Einfluss des pH-Wertes auf die Spontanreaktion. Man untersuchte aber nur den Bereich, der sich für Hydrolyse und Transferasereaktion anbot, das heißt in pH-Bereich = $7.5\text{-}8.7$, in dem das Enzym das Aktivitätsmaximum besitzt.^[36] Die Hydrolyse ist wie erwartet umso schneller, je alkalischer die Reaktionslösung ist. Aber auch in Lösungen mit nahezu neutralem pH-Wert ist sie zu beobachten.

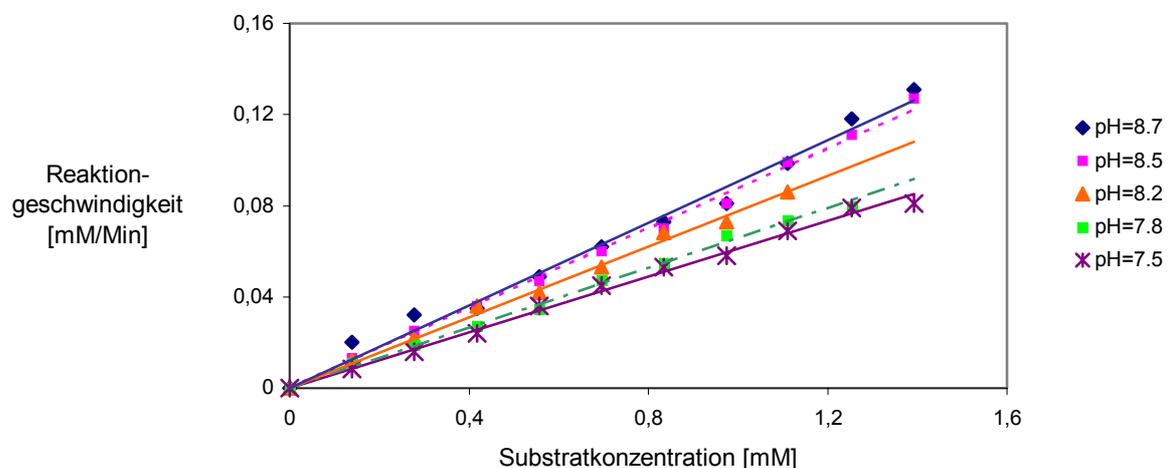


Abbildung 57: Anfangsgeschwindigkeiten der spontanen Hydrolyse von Glycylsäupeptoid **12** bei unterschiedlichen pH-Werten. Bedingungen: TAPS-Puffer (200mM, EDTA 1mM), $T = 35^{\circ}\text{C}$.

Aufgrund der beobachteten Spontanhydrolyse bei nahezu neutralen pH-Werten im TAPS Puffer wurde die Abhängigkeit der Reaktionsrate vom Puffertyp untersucht. Abhängig davon, ob sekundäre oder tertiäre Amine als Puffersubstanzen eingesetzt werden, muss man wegen der unterschiedlichen Basizität einen Effekt auf die

Spontanhydrolyse erwarten. Hydrolyse ist abhängig vom Puffertyp und damit als allgemeine Säure-Base Katalyse einzuordnen. Laut Brönstedt hängt sie damit vom pK_B -Wert der basischen Spezies und ihrer Konzentration ab. Für drei Puffersubstanzen sind die Kinetiken in *Abbildung 58* gezeigt.

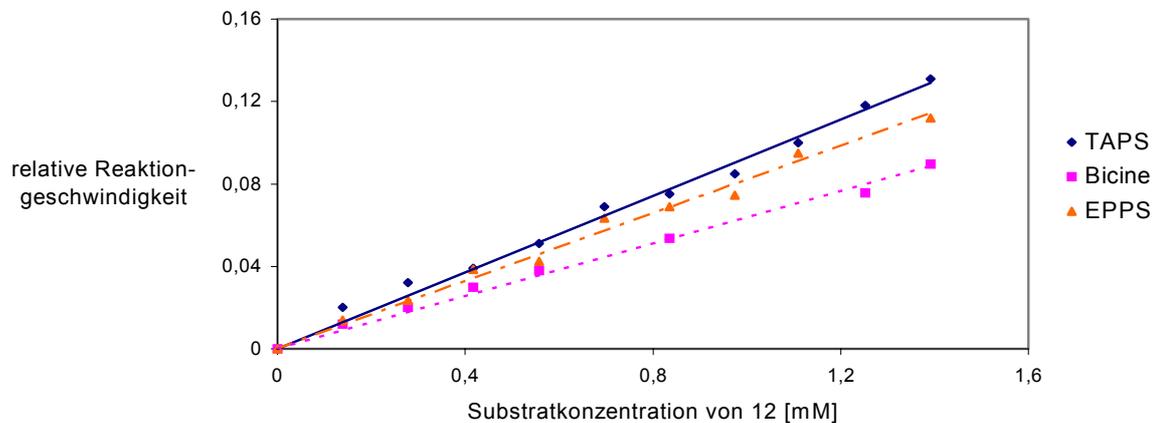


Abbildung 58: Anfangsgeschwindigkeit der Spontanhydrolyse in unterschiedlichen Puffern. Bedingungen: Puffer (200mM, EDTA 1mM), $T = 35^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 8,7$.

Der Einfluss der Pufferkonzentration wurde am Beispiel von TAPS ermittelt (*Abbildung 59*) und folgte den Erwartungen.

Den grössten Einfluss auf die Spontanhydrolyse hatte die Temperatur. Die Reaktion wurde bei 25°C und 35°C untersucht (*Abbildung 60*). Wie erwartet beobachtet man eine starke Geschwindigkeitsteigerung durch Erhöhung der Temperatur um 10°C in diesem Bereich.

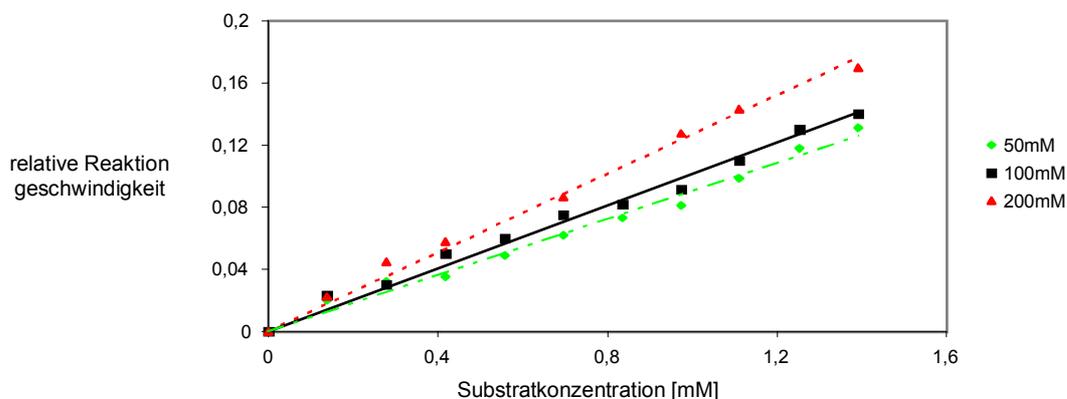


Abbildung 59: Spontane Hydrolyse des Glycolsäurepeptoid 12 bei unterschiedlicher Pufferstärke (Pufferkonzentration). Bedingungen: TAPS-Puffer (EDTA 1mM), $T = 35^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 8,7$.

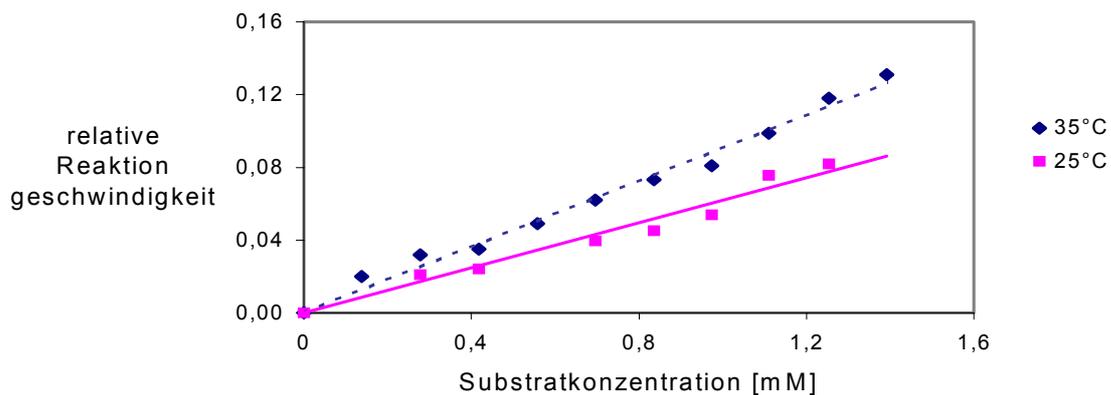


Abbildung 60: Spontane Hydrolyse des Glycolsäurederivats **12** bei 25° und 35°C. Bedingungen: : TAPS-Puffer (200 mM, EDTA 1mM), pH = 8,7.

Alle oben präsentierten Untersuchungen sollten der Unterdrückung der Spontanhydrolyse während der enzymatischen Reaktion dienen. Daraus ergab sich als zweckmäßigste Bedingungen für weitere Untersuchungen die Reaktion bei pH=8,2 in Bicin Puffer (100mM, EDTA 2mM) bei 25°C.

8.4.4. Bestimmung des K_M -Werts für *Boc-Pro-Arg-Pro-Pro-O[Gly]-Pro-Trp-NH₂* **12**

In der experimentiellen Beobachtung erfasst man die Summe der enzymatischen und spontanen Hydrolyse. Die ausgewählten Reaktionsbedingungen sollten dafür sorgen, dass die enzymatische Hydrolyse einen möglichst großen Anteil der Gesamthydrolyse einnimmt. Aufgrund der starken Spontanhydrolyse in der Stammlösung gab es in der Reaktionslösung schon von Anfang an ca. 15% hydrolysiertes Produkt. Die Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeiten berücksichtigte diesen Ausgangswert.

Abbildung 61 zeigt die Michaelis-Menten-Kinetik aus den Anfangsgeschwindigkeiten der enzymatischen Hydrolyse von **12** und die nach der Eadie-Hofstee-Methode aufbereiteten Daten.

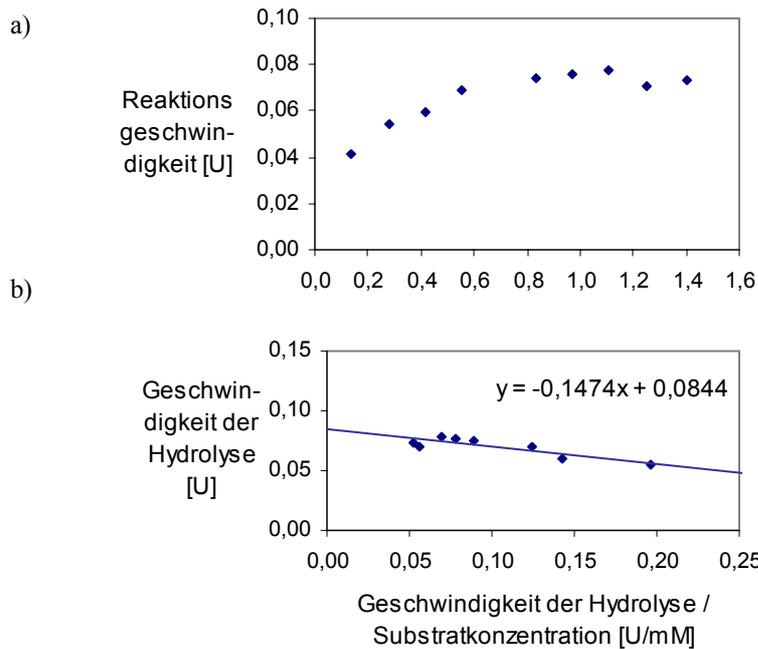


Abbildung 61: a) Michaelis-Menten Kinetik für die Hydrolyse von Boc-Pro-Arg-Pro-Pro-OGly-Pro-Trp-NH₂ **12** b) Eadie-Hofstee-Diagramm zur Bestimmung von K_M und V_{max} Werten. Bedingungen: TAPS Puffer (200mM, EDTA 2mM), pH = 8,7, T = 35°C, $c_E = 1,9 \mu\text{g/ml}$, 19% MeOH).

Aus der Eadie-Hofstee Auftragung wurden folgende K_M und V_{max} Werte für **12** nach Korrektur (wegen Spontanhydrolyse) erhalten

$$K_M = 0,13 \text{ mM}$$

$$k_{cat} / K_M = 6,2 \times 10^5 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$$

In *Tabelle 14* werden die hier für das Gly-derivat **12** erhaltenen kinetischen Parameter mit Daten für andere Substrate verglichen.

Tabelle 14: Vergleich der K_M und V_{max} -Werten für unterschiedliche Substrate. Abkürzungen: pNA - Boc-Pro-Arg-Pro-Pro-pNA **27**, AMC - Boc-Pro-Arg-Pro-Pro-AMC **31**, Ogly - Boc-Pro-Arg-Pro-Pro-O[Gly]-Pro-Trp-NH₂ **12**, OBzl - Boc-Pro-Arg-Pro-Pro-OBzl **28**

Substrat	pNA 27	AMC 31	Ogly 12	OBzl 28
K_M [μM]	56	120	127	119
V_{max} [$\mu\text{M min}^{-1}$]	0,5	13,0	85,0	56,0
k_{cat} [s^{-1}]	4,7	13	78	51
k_{cat} / K_M [$\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$]	$8,32 \times 10^4$	$1,08 \times 10^5$	$6,18 \times 10^5$	$4,29 \times 10^5$
Bedingungen:				
T [$^{\circ}\text{C}$]	25 $^{\circ}\text{C}$	25 $^{\circ}\text{C}$	35 $^{\circ}\text{C}$	25 $^{\circ}\text{C}$
Puffer	TRIS-HCl	TRIS-HCl	TAPS	Bicin
pH	8,0	8,0	8,7	8,2
Org. Lsm.	10% EtOH	2,5% DMSO	19% MeOH	18% MeOH

Wenn man die K_M -Werte den gewählten Substrate vergleicht, stellt man fest, dass sie für den Benzylester **28**, das Aminomethylcoumarin **31** und das Depsipeptid **12** sehr ähnlich sind. Der K_M -Wert für das p-Nitroanilidderivat **27** ist nur halb so groß wie für die restlichen drei Substrate. Zur Untersuchung der Kinetik der vier Substrate verwendete man unterschiedliche Mengen an Enzym, sodass man V_{max} nicht direkt miteinander vergleichen kann.

Die daraus errechneten monomolekularen Ratenkonstanten k_{cat} für Benzylester, das Aminomethylcoumarin und das Depsipeptid sind in der gleichen Größenordnung, wobei die Hydrolyse von Depsipeptid am schnellsten verläuft. Die Hydrolyse des Benzylesters ist im Vergleich zu Depsipeptid **12** 1,5 mal langsamer, bzw. von Aminomethylcoumarin 6 mal langsamer. Im Vergleich dazu ist k_{cat} für das p-Nitroanilidderivat **27** um mehr als eine Größenordnung kleiner (16,6 mal langsamer als das Depsipeptid **12**). Die Spezifitätskonstante k_{cat}/K_M vereinigt beiden kinetischen Parametern und charakterisiert so die Affinität des Enzyms für das Übergangszustand der Reaktion. Formal entspricht k_{cat}/K_M der bimolekularen Ratenkonstante für das produktive Zusammentreffen von Enzym und Substrat. Die Obergrenze der Geschwindigkeit liegt dabei im Diffusionslimit ($k_{cat}/K_M \approx 10^8 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$).

Für die hier untersuchten Substrate findet man die Größenordnung von 10^4 - 10^5 . Den höchsten k_{cat}/K_M Wert hat Depsipeptid **12** erreicht, wobei der Unterschied im Vergleich zu den restlichen Substraten nicht besonders groß ist. Er beträgt entsprechend für den Benzylester 1,44 mal kleiner, für Aminomethylcoumarin 5,7 mal kleiner, für p-Nitroanilid 7,4 mal kleiner.

Durch Verlängerung des Peptidrückgrates im Depsipeptidsubstrat wurde eigentlich eine Verbesserung der Affinität erwartet. Der K_M -Wert für Heptadepsipeptid **12** ist aber sehr ähnlich zum K_M -Wert des Tetrapeptidesters. Die Affinität wurde auf diese Weise nicht gesteigert.

Ein Vergleich der Kinetiken der Hydrolysereaktion von **12**, **26** und **28** (Abbildung 62) bestätigte noch einmal diese Befunde: Für das Depsipeptid wurde die marginal schnellste Reaktion beobachtet, wogegen der Benzylester nur wenig, der Methylester jedoch deutlich langsamer reagiert.

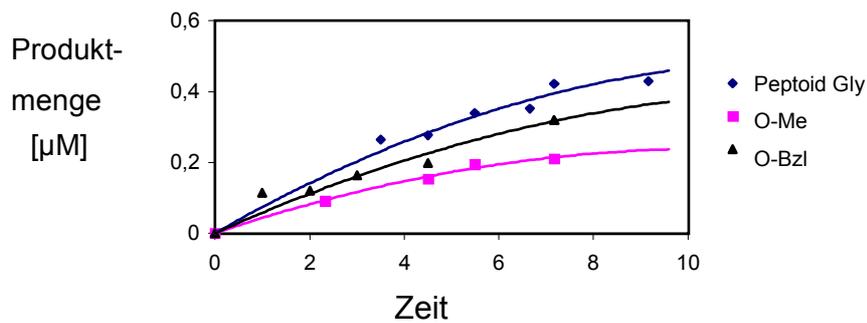


Abbildung 62: Enzymatische Hydrolyse von unterschiedlichen Substraten bei $\text{pH}=8.2$, in Bicin-Puffer (100mM, EDTA 2mM).

8.5. Einfluss der Temperatur auf die Hydrolysegeschwindigkeit.

Bei der Bestimmung des K_M -Wertes für Depsipeptid **12** wurde beobachtet, dass die Geschwindigkeit der enzymatischen Hydrolyse, ähnlich wie bei der Spontanhydrolyse, stark abhängig von der Temperatur ist. Bei der Spontanhydrolyse wurde im Einklang mit normalem Arrhenius-Verhalten eine Steigerung der Geschwindigkeit mit Erhöhung der Temperatur beobachtet. Bei der enzymatischen Reaktion zweier Parallelansätze unter bis auf die Temperatur gleichen Bedingungen, wurde die höhere Geschwindigkeit für die Reaktion bei niedrigerer Temperatur festgestellt. (Abbildung 63)

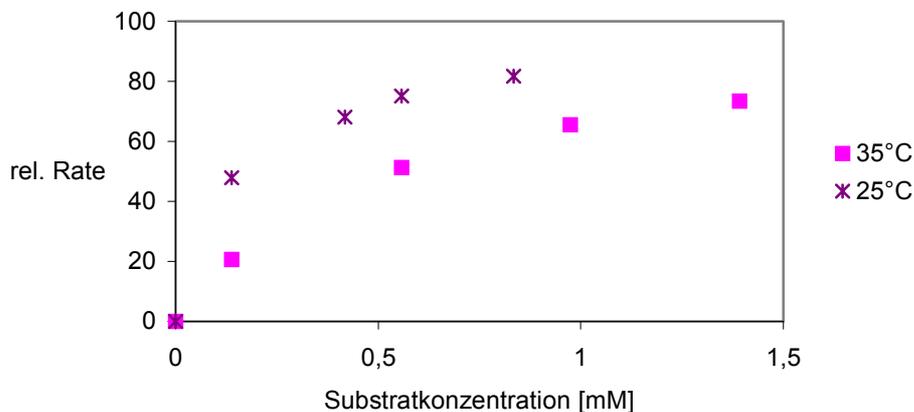


Abbildung 63: Einfluss der Temperatur auf die Enzymaktivität für enzymatische Hydrolyse von Boc-PRPPOGlyPW-NH₂ (Aktivität des Enzyms wurde normalisiert).

Dieser Befund war unerwartet. Die meisten in der Literatur beschriebenen Aktivitätsassays wurden bisher bei $T=35^{\circ}\text{C}$ durchgeführt, weshalb man davon ausgegangen ist, dass die optimale Temperatur bei $35\text{-}37^{\circ}\text{C}$ liegt. Wie das schon im Kapitel 7 über die Aktivität der IgA-Protease beschrieben wurde, war das Enzym sehr instabil und empfindlich auf Änderungen von physikalischen Parametern. Deshalb wurde angenommen, dass das Enzym bei höheren Temperaturen an Aktivität verliert.

Die Geschwindigkeit der Summe von enzymatischer und spontaner Hydrolyse wurde genauer bei mehreren Temperaturen untersucht (Abbildung 64). Um die Geschwindigkeit der Spontanhydrolyse beurteilen zu können, wurden parallele Ansätze ohne Enzymzusatz gemacht.

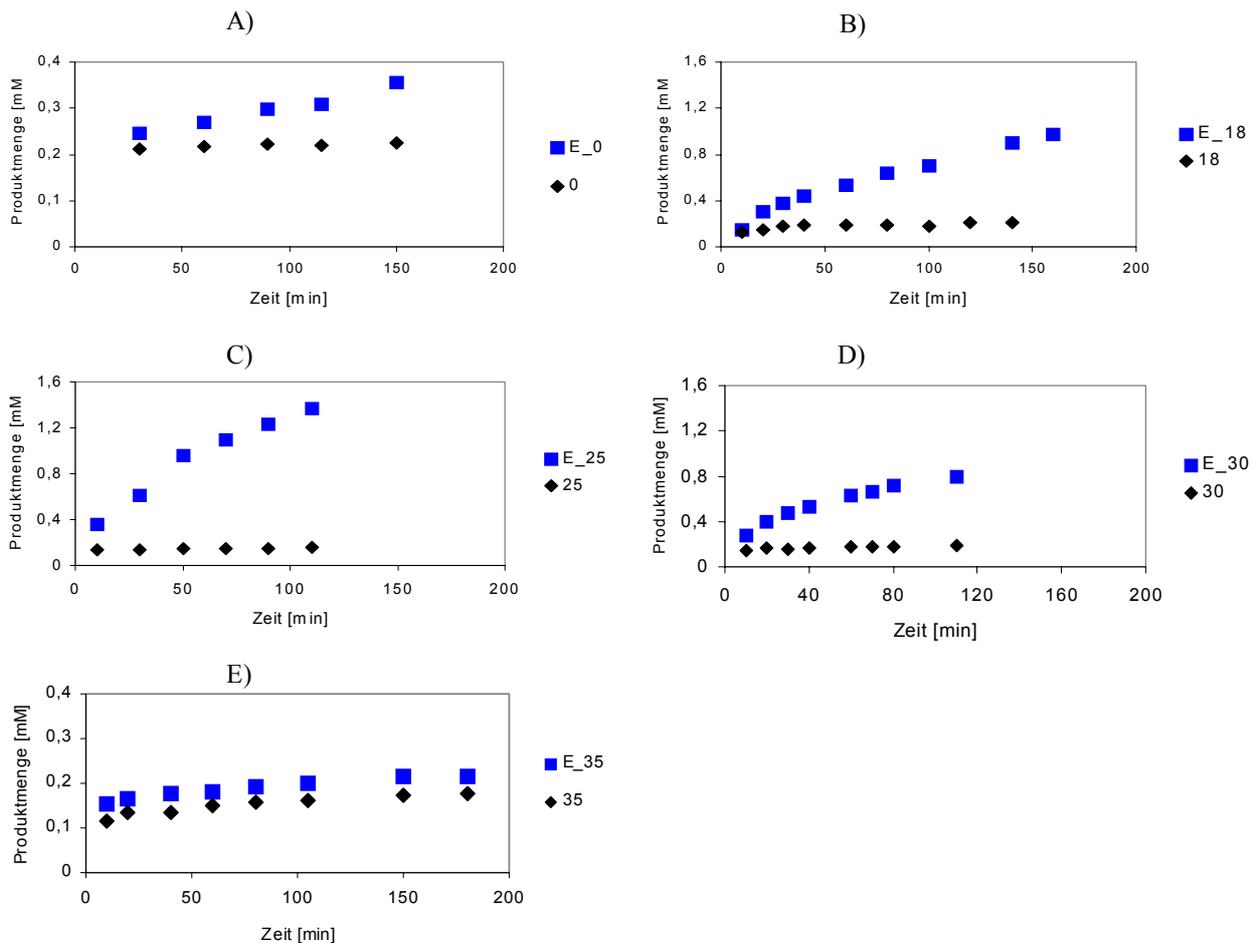


Abbildung 64: Einfluss der Temperatur A) $T=0^{\circ}\text{C}$, B) $T=18^{\circ}\text{C}$, C) $T=25^{\circ}\text{C}$, D) $T=30^{\circ}\text{C}$, E) $T=35^{\circ}\text{C}$ auf die Hydrolyse von $\text{Boc-Pro-Arg-Pro-Pro-O[Gly]-Pro-Trp-NH}_2$ **12**. Eingesetzte Enzymaktivitäten waren unterschiedlich für einzelne Messreihen und betragen: $T=0^{\circ}\text{C}$ $A=0,6\text{ U}$, $T=18^{\circ}\text{C}$ $A=0,5\text{ U}$, $T=25^{\circ}\text{C}$ $A=1,5\text{ U}$, $T=30^{\circ}\text{C}$ $A=1,5\text{ U}$, $T=35^{\circ}\text{C}$ $A=0,4\text{ U}$. Bedingungen: Bicin Puffer 100mM, EDTA 2mM, pH=8.2.

Aus den oben gezeigten Diagrammen kann man folgern, dass das Enzym die höchste Aktivität bei $T=25^{\circ}\text{C}$ zeigt. Man beobachtet, wie inaktiv das Enzym bei $T=35^{\circ}\text{C}$ ist. Bei 35°C beträgt die Spontanhydrolyse fast 90% der gesamten beobachteten Hydrolyse. In den Diagrammen findet man eine Menge Hydrolyseproduktes in der Zeit $t=0\text{ min}$, was auf die Hydrolyse in der Stammlösung zurückzuführen ist.

Aus den Auftragungen dieser Daten wurden maximale Anfangsgeschwindigkeiten der Hydrolyse (Tangenten an die Kurve im Ursprung) für die verschiedenen Temperaturen ermittelt. Außerdem wurde die Enzymaktivität dieser Ansätze normalisiert. Man erhält dann ein Diagramm über die Abhängigkeit der Hydrolysegeschwindigkeit von der Temperatur (Abbildung 65).

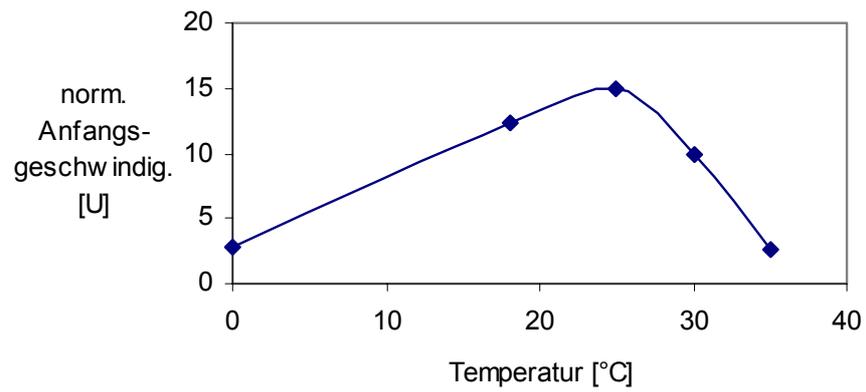


Abbildung 65: Maximale Anfangsgeschwindigkeiten der Hydrolyse bei unterschiedlichen Temperaturen. Die Aktivitätsbestimmung des Enzyms wurde im Assay mit p-Nitroanilidderivat als Substrat durchgeführt. Anschließend wurde die Enzymaktivität normalisiert.

9. Transferasereaktionen

9.1. Reverse Proteolyse - Optimierung der Reaktionsbedingungen

Die enzymatische Peptidsynthese mit Hilfe der IgA-Protease ist eine Zwei-Schritt-Reaktion mit einer festgelegten Reihenfolge. In der Reaktion nehmen drei Substrate teil: ein Acyldonor (S_1) und zwei Nukleophile - Wasser (S_2) und ein Amin (S_3). (Abbildung 66)

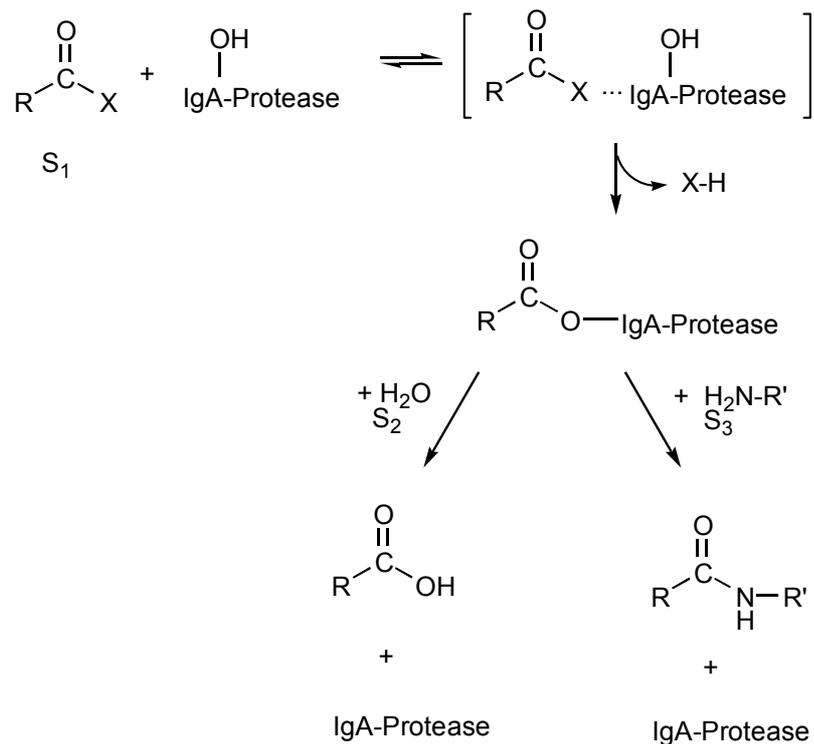


Abbildung 66: Schema der enzymatischen Peptidsynthese mit Hilfe der IgA-Protease in der Reaktion der reversen Proteolyse.

Der erste Schritt - die Acylierung des Enzyms - ist sowohl für die Hydrolyse als auch Aminolyse identisch. In dem ersten Schritt der enzymatischen Reaktion wird das Substrat S_1 an das Serin im aktiven Zentrum über eine kovalente Bindung gebunden. Im zweiten Schritt wird sie dann durch eine nukleophile Attacke entweder durch das Amin oder das Wasser gespalten und die Acyleinheit wird entsprechend auf das Wassermolekül oder Amin übertragen. Die beiden Substrate S_2 und S_3 konkurrieren um den Acyldonor, der im aktiven Zentrum des Enzyms gebunden ist. Die Hydrolyse ist die energetisch günstigere Reaktion (niedrigere Aktivierungsenergie) und liefert

thermodynamisch stabile Produkte. Im Gegenteil dazu ist die Aminolyse eine kinetisch kontrollierte Reaktion mit erheblicher Aktivierungsbarriere und thermodynamisch instabilen Produkten. Die Optimierung der Transferreaktion besteht in der Verschiebung des Verhältnisses zwischen Geschwindigkeit der Hydrolyse und Aminolyse zugunsten der Aminolyse.

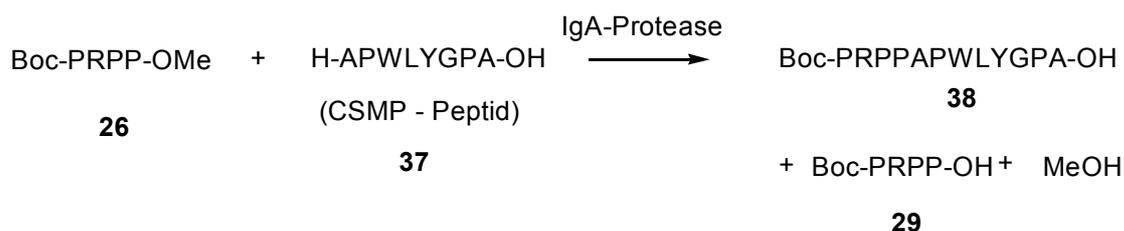
9.2. Transferreaktion mit dem Depsipeptid Boc-Pro-Arg-Pro-Pro-O[Gly]-Pro-Trp-NH₂ **12**

Die Zusammenstellung der k_{cat}/K_M Werte für verschiedene Acyldonoren (Kap. 8.4.4) zeigte, dass das Depsipeptid **12** schneller als die klassischen Substrate in der Hydrolysereaktion abgebaut wurde. Da in der Hydrolyse und Aminolysereaktion nur die erste Etappe der ES-Komplexbildung ähnlich ist, kann man die K_M und k_{cat} Werte der Hydrolyse nicht direkt auf die Aminolysereaktion übertragen. Das heißt, dass ein Substrat, das schnell in der Hydrolysereaktion abgebaut wird, nicht unbedingt genauso schnell die Transferasereaktion eingehen muss.

9.3. Kinetik der Transferasereaktion

9.3.1 Methylester als Acyldonor

Die reverse Proteolyse zwischen Methylester **26** und CSMP **37** als Nukleophil verläuft nach einem Schema:



Diese Reaktion wurde mit HPLC verfolgt. Detektiert wurde UV-Absorption (220nm) und Fluoreszenz des Tryptophanrestes. Nach bestimmten Zeitabschnitten wurden aus der Reaktionslösung Proben entnommen und die Reaktion gestoppt. Aus der Höhe der HPLC-Peaks von **37** und **38** wurden die Kupplungsausbeuten ausgerechnet. Die Kinetik wurde in *Abbildung 67* gezeigt. Nachdem die maximale Kupplungsausbeute (37%) erreicht wurde, wurde die Reaktion gestoppt, das Produkt isoliert und charakterisiert. Die mit Maldi-TOF gemessenen Massen von **37** und **38** sind in *Abbildung 68* gezeigt.

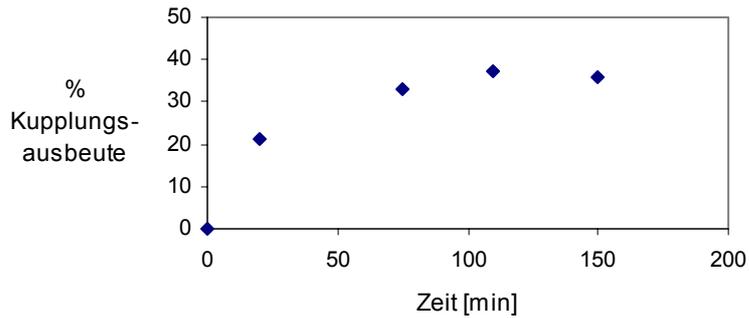


Abbildung 67: Der kinetische Verlauf der enzymatischen Peptidsynthese zwischen Boc-PRPP-OMe und dem CSMP-Peptid.

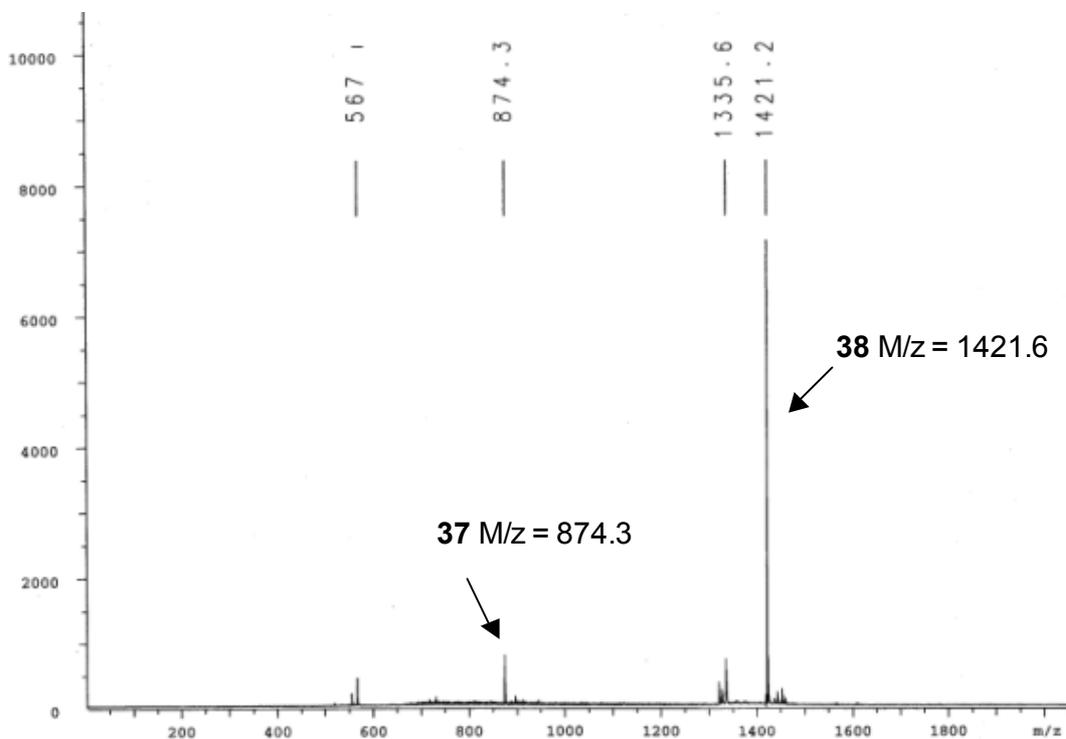
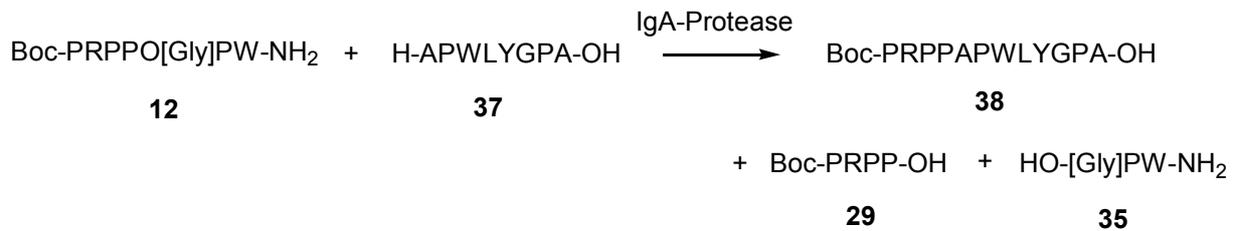


Abbildung 68: MALDI-TOF MS Spektren des unmodifizierten **37** und modifizierten CSMP **38**.

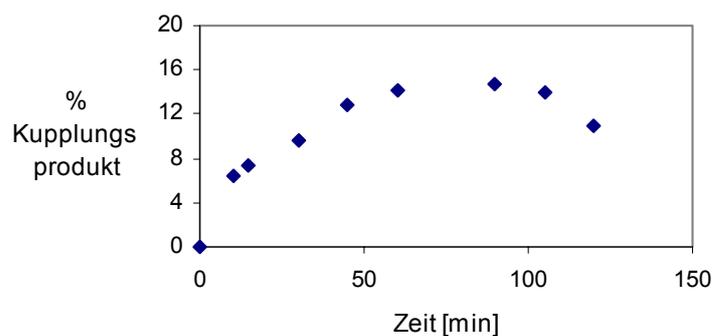
Die Masse des modifizierten Peptids **38** beträgt $[M+H]^+=1421,2$, die Masse des CSMP **37** beträgt $[M+H]^+=874,2$. Beide Massen sind in Maldi-TOF-MS zu erkennen. (Abbildung 68)

9.3.2 Depsipeptid **12** als Acyldonor

Die enzymatische Reaktion zwischen Depsipeptid **12** und CSMP **37** als Nukleophil verlief nach dem Schema:



Diese Reaktion wurde ähnlich wie die vorige Reaktion verfolgt. Der kinetische Verlauf der Peptidsynthese wird in *Abbildung 69* gezeigt. Die maximale Ausbeute für das Kupplungsprodukt betrug 15%. Das entstandene Kupplungsprodukt wurde isoliert und charakterisiert. Durch eine HPLC-Koinjektion wurde festgestellt, dass das gleiche Produkt entstanden ist wie in der enzymatischen Kupplung zwischen dem Methyl ester **26** und CSMP **37**. Das isolierte Produkt wurde mit Maldi-TOF-MS analysiert. Laut Masse war das Produkt war identisch mit dem Produkt der Kupplung zwischen **26** und **37**.



*Abbildung 69: Kinetischer Verlauf der enzymatischen Reaktion zwischen Boc-PRPPOGlyPW-NH₂ **12** und dem CSMP-Peptid **37**. Bedingungen: $c_{Ac}=37,7\text{mM}$, $c_{CSMP}=3,75\text{mM}$, $c_E=6,2\mu\text{g/ml}$, $\text{pH}=8,7$; $T=35^\circ\text{C}$, TAPS 100mM, EDTA 2mM.*

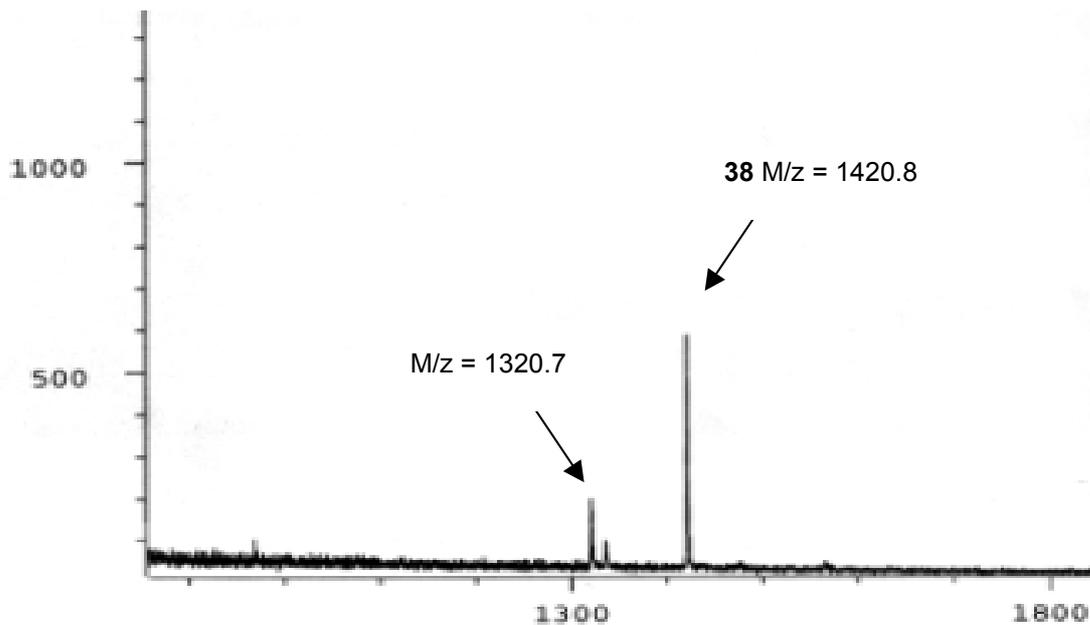


Abbildung 70: Maldi-TOF-MS des Kupplungsproduktes **38**.

Die Masse des modifizierten CSMP **38** beträgt $[M-H]^- = 1420,8$. Ausser dieser Masse ist noch in *Abbildung 70* ein Abspaltungsprodukt der Boc-Gruppe mit einer Masse von $[M-H]^- = 1320,7$ zusehen.

9.4. Optimierung der Transferasereaktion zwischen Glykolsäuredepsi-peptid **12** und CSMP-Peptid **37**

9.4.1 Allgemeine Voraussetzungen

Das Ziel dieser Optimierung ist die Erarbeitung von Vorschriften für die N-terminale Modifikation von Proteinen. Die durchgeführten Experimente sind in der *Tabelle 15* zusammengefasst.

*Tabelle 15: Bedingungen und Ausbeuten der Kupplungsexperimente zwischen Glykolsäure-derivat **12** und CSMP **37**.*

Nu.	C_{Ac}	C_{Nu} [mM]	C_E [μ g/ml]	MeOH	T °C	pH	Puffer	Enzymakt.	Ausbeute
1.	2,6	0,19	8,6	0	25	8,7	TAPS	1,68	0
2.	37,7	3,75	6,2	12	35	8,7	TAPS	n.b.	18
3.	24,0	6,00	16,2	6	30	8,7	TAPS	n.b.	16
4.	37,7	3,75	6,2	12	35	8,7	TAPS	1,28	2
5.	37,7	3,75	6,2	20	35	8,7	TAPS	1,2	15
6.	3,7	0,92	8,74	18,6	35	8,2	Bicin	n.b.	5
7.	3,5	0,86	8,2	18,6	35	8,2	Bicin	n.b.	0

8.	2,8	0,80	8,2	13, 14%	25	8,2	Bicin	n.b.	1
9.	1,4	0,20	0,93	18,7	0	8,2	Bicin	0,028	0
10.	1,3	7,30	6,9	0	25	8,2	Bicin	1,52	0
11.	1,3	0,08	6,9	0	25	8,2	Bicin	2,17	0
12.	1,1	0,5	3,4	0	25	8,2	Bicin	0,77	1,5
13.	1,1	0,5	3,4	0	25	8,7	Bicin	0,63	1,8
14.	36,0	3,1	3,6	0	25	8,7	Bicin	0,95	7,3
15.	36,0	3,1	25,2	0	25	8,7	Bicin	n.b.	23,5
16.	35,0	2,7	19	0	25	8,7	Bicin	1,9	23
17.	35,0	1,4	19	0	25	8,7	Bicin	4,33	15
18.	35,0	1,38	19	0	25	8,7	Bicin	2,85	11
19.	34,5	0,7	19	0	25	8,7	Bicin	2,86	12
20.	34,6	0,35	19	0	25	8,7	Bicin	2,85	18
21.	34,6	0,18	19	0	25	8,7	Bicin	2,85	28,4
22.	34,6	2,1	19	0	25	8,7	Bicin	2,86	17
23.	11,5	2,1	19	0	25	8,7	Bicin	2,81	7,3
24.	11,5	0,7	19	0	25	8,7	Bicin	2,81	5,3
25.	11,5	0,7	19	0	25	8,7	Bicin	2,81	5

In vielen dieser Experimente wurde kein Kupplungsprodukt gebildet. Die Konzentration des Acyldonors garantierte in allen Fällen zu Anfang eine Sättigung des Enzyms. Trotzdem reichte das nicht immer um einen Kupplungsumsatz zu beobachten, vermutlich weil die Konzentration an Acyldonor im Zuge der Reaktion zu schnell abnahm und damit das Peptidprodukt der Hydrolyse zugänglich wurde.

Eine Schlüsselrolle spielte der pH-Wert. Bei $\text{pH} < \text{pKa}$ wird die freie N-terminale Aminogruppe zum großen Teil protoniert und ist dadurch zur Peptidkupplung ungeeignet. Der pKa-Wert einer solchen Aminogruppe liegt bei 8,0. Bei niedrigeren pH-Werten beobachtete man entweder keinen oder geringen Umsatz.

9.4.2. Einfluss der Acyldonorkonzentration

In *Tabelle 16* sind zwei Reaktionen mit unterschiedlicher Acyldonorkonzentration dargestellt. Obwohl die Acyldonorkonzentration höher als $10 \times K_M$ war, beobachtet man eine Verbesserung der Kupplungsausbeute mit Steigerung der Acyldonorkonzentration.

Tabelle 16: Einfluss der Acyldonorkonzentration auf die Kupplungsausbeute.

#	C _{Ac} [mM]	C _{Nu} [mM]	C _E [µg/ml]	% Me-OH	T°C, pH, Puffer	Enzymaktivität [U/100µl]	Ausbeute %
22	34,6	2,1	19	0	25; 8,7; Bicin	1,5	17,0
23	11,5	2,1	19	0	25; 8,7; Bicin	1,5	7,3

Die hohen Acyldonorkonzentrationen sind nötig, weil das Enzym nicht nur am Anfang der Reaktion, sondern über die ganze Reaktionszeit mit dem Acyldonor gesättigt sein muss. Nur ein an das Enzym gebundener Acyldonor kann auf das Amin übertragen werden.

9.4.3. Einfluss der Nukleophilkonzentration

Da in der enzymatischen Peptidsynthese zwei Substrate teilnehmen, kann man davon ausgehen, dass die steigende Konzentration des Nukleophils die Geschwindigkeit der Synthesereaktion verbessern kann. Die in der Tabelle dargestellten Daten zeigen den Einfluss der Nukleophilkonzentration auf die Kupplungsausbeute der Peptidsynthese.

Tabelle 17: Experimente, mit der variierten Nukleophilkonzentration und ihrer Einfluss auf die Kupplungsausbeute.

#	C _{Ac} [mM]	C _{Nu} [mM]	C _E [µg/ml]	T°C, pH, Puffer, ohne Me-OH	Enzymaktivität [U/100µl]	Ausbeute %	max. Produktkonz. [mM]
16	35,0	2,70	19	25; 8,7; Bicin	1,90	23	0,621
17	35,0	1,40	19	25; 8,7; Bicin	4,33	15	0,210
18	35,0	1,38	19	25; 8,7; Bicin	2,85	11	0,152
19	34,5	0,70	19	25; 8,7; Bicin	2,86	12	0,084
20	34,6	0,35	19	25; 8,7; Bicin	2,85	18	0,063
21	34,6	0,18	19	25; 8,7; Bicin	2,85	28	0,051
22	34,6	2,10	19	25; 8,7; Bicin	2,86	17	0,357

Auf den ersten Blick sieht man keine Korrelation zwischen der Nucleophilkonzentration und der Kupplungsausbeute. Die Kupplungsausbeute ist nur ein relativer Wert, der von der Anfangskonzentration des Nucleophils abhängig ist. Wenn man die Menge des Produktes aber als absoluten Wert - maximale Produktkonzentration - ausdrückt, ist der Einfluss der Nucleophilkonzentration auf die Ausbeute sofort verständlich. Je höher die Nucleophilkonzentration, desto höhere Kupplungsausbeuten erreicht man. Die Korrelation ist in *Abbildung 71* dargestellt.

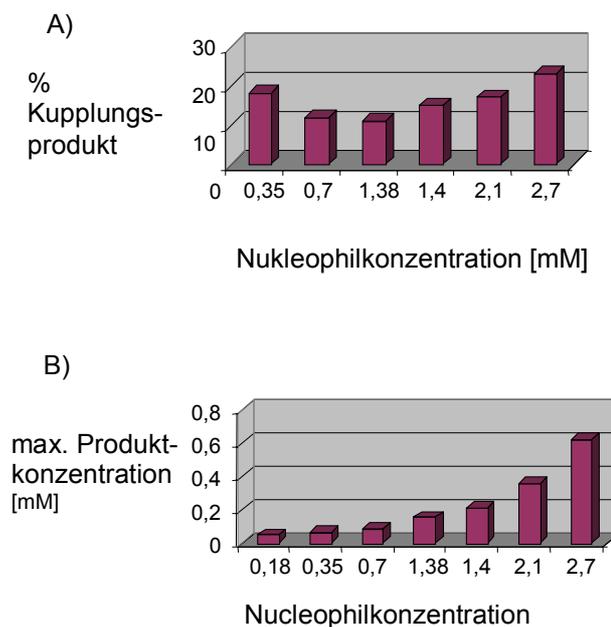


Abbildung 71: Einfluss der Nucleophilkonzentration auf die Kupplungsausbeute. A) Die Kupplungsausbeute wurde auf die Anfangskonzentration des Nucleophils bezogen und ist dadurch ein relativer Wert. B) Die Menge des Produktes wurde als Produktkonzentration in der Reaktionslösung vorgestellt und ist ein absoluter Wert.

9.4.4. Einfluss der Enzymkonzentration auf die Kupplungsausbeute

Die Enzymkonzentration sollte nur einen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit und nicht auf die Ausbeute haben. Diese Annahme stimmt nur in Reaktionen, bei denen das Enzym seine Aktivität über die Reaktionszeit behält. In den hier präsentierten Reaktionen beobachtete man einen starken Aktivitätsverlust des Enzyms über die Reaktionszeit. Wenn aufgrund höherer Enzymkonzentrationen sich mehr enzymstabilisierende Substanzen in der Reaktionslösung befinden (leider keine Informationen in der Produktspezifikation von Roche), ist ein größerer Anteil des Enzyms über

längere Zeit aktiv. Dies macht sich in besseren Kupplungsausbeuten bemerkbar. Die entsprechenden experimentellen Daten befinden sich in *Tabelle 18* bzw *Abbildung 72*.

Tabelle 18: Einfluss der Enzymkonzentration auf die Kupplungsausbeute.

#	C _{Ac} [mM]	C _{Nu} [mM]	C _E [µg/ml]	% MeOH	T°C, pH, Puffer	Enzym-aktivität [U/100µl]	Ausbeute %
5.	37,7	3,75	6,2	20	35; 8,7; TAPS	1,20	15
14.	36,0	3,10	3,6	20	25; 8,7; Bicin	0,95	7
15.	36,0	3,10	25,2	20	25; 8,7; Bicin	n.b.	24
16.	35,0	2,70	19,0	20	25; 8,7; Bicin	1,90	23

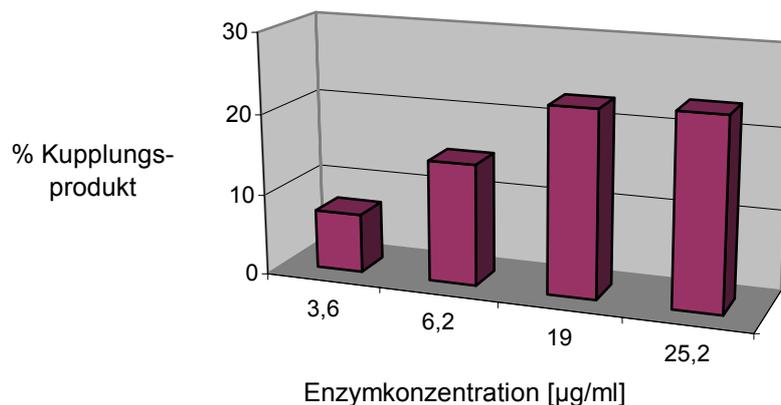


Abbildung 72: Einfluss der Enzymmenge auf die Kupplungsausbeute.

9.4.5. Einfluss des MeOH-Gehaltes auf die Kupplungsausbeute

Der Methanolgehalt reduziert die Aktivität des Enzyms während der Kupplungsreaktion. Dies beeinflusst die Kupplungsausbeute. Je höher der Methanolgehalt in der Reaktionslösung ist, desto niedrigere Kupplungsausbeuten sind zu beobachten (*Tabelle 19*).

Tabelle 19: Reaktionsbedingungen für Experimente mit unterschiedlicher MeOH-Menge in der Reaktionslösung.

#	c_{AC} [mM]	c_{Nu} [mM]	c_E [μ g/ml]	% MeOH	T°C, pH, Puffer	Enzymaktivität [U/100 μ l]	Ausbeute %
2.	37,7	3,75	6,2	12	35; 8,7; TAPS	n.b.	18
5.	37,7	3,75	6,2	20	35 8,7; TAPS	1,2	15

9.5. Verschiedene Substrate in der Reaktion des Acyltransfers

Die kinetischen Daten für die enzymatische Hydrolyse mit IgA-Protease als Katalysator sind nicht direkt übertragbar auf die enzymatische Aminolyse, da die Aktivierungsenergien für beide Prozesse unterschiedlich sind. Aus diesem Grund mussten die verschiedenen Substrate in der Transferasereaktion unter gleichen Bedingungen getestet werden. Als Acyldonoren wurden Tetrapeptidmethylester **26**, Tetrapeptidbenzylester **28** und zwei Heptadepsipeptide mit Milchsäure **19** und Glykolsäure **12** als Aminosäureanaloge verwendet. In der *Tabelle 20* sind die Bedingungen und erreichten Ausbeuten vorgestellt.

*Tabelle 20: Die maximalen Kupplungsausbeuten für enzymatische Reaktionen zwischen CSMP und vier unterschiedlichen Acyldonoren: Boc-PRPP-OMe **26**, Boc-PRPP-OBzl **28**, Boc-PRPPO[Gly]PW-NH₂ **12**, Boc-PRPPO[Ala]PW-NH₂ **19**. Die Reaktionsbedingungen waren für alle Reaktionen gleich: c_{AC} =37,7mM, c_{Nu} =3,75mM, c_E =6,2 μ g/ml, 12 % MeOH, T=35°C, pH=8,7, 200mM TAPS Puffer, 2mM EDTA.*

Acyldonor	Max. Kupplungsausbeute %
26	18
28	22
12	18
19	20

Aus dem Vergleich der unterschiedlichen Acyldonorsubstraten unter gleichen Bedingungen ergab sich, dass der Benzylester **28** das beste Substrat ist. Die maximale Kupplungsausbeute für Depsipeptide entspricht der Ausbeute von einfachen Peptidestern. Die Einführung von α -Hydroxysäuren erbrachte nicht die erwartete Verbesserung der Kupplungsausbeute. Der Methylester erreichte die gleiche Ausbeute wie das Depsipeptid mit Glykolsäureeinheit.

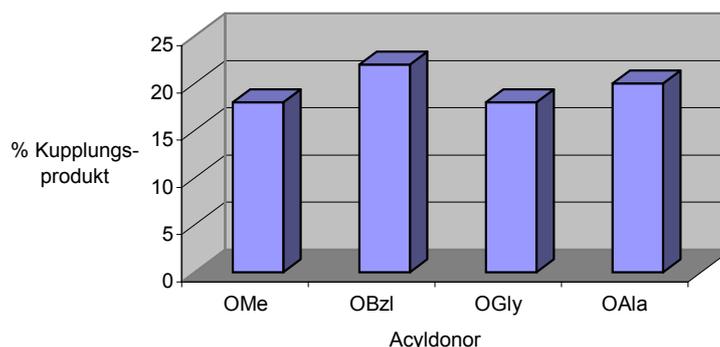


Abbildung 73: Maximale Kupplungsausbeute für unterschiedliche Acyldonoren. Bedingungen: $c_{Ac} = 37,7mM$, $c_{Nu} = 3,73mM$, $c_E = 6,2 \mu g/ml$, 12% MeOH, TAPS-Puffer 200mM, EDTA 2mM.

9.6. Vergleich des kinetischen Verlaufes der enzymatischen Kupplungsreaktion für Peptidmethylester **26** und Depsipeptid **12**.

Der Methylester **26** und Depsipeptid **12** wurden aufgrund der letzten Experimenten als ähnliche Substrate klassifiziert. Dieses Ergebnis war unerwartet, weshalb der kinetische Verlauf der enzymatischen Peptidsynthese für Methylester **26** und Glykolsäuredepsipeptid **12** genauer untersucht wurde.

9.6.1. Transfer den Acyldonoren **12** und **26** bei 35°C

In der *Abbildung 74* ist die Kinetik der enzymatischen Kupplung dargestellt. Als Standardnukleophil wurde ein CSMP-Peptid **37** verwendet. Die Kupplung mit Methylester **26** als Acyldonor verläuft schneller und mit besserer Ausbeute als für Glykolsäuredepsipeptid **12**.

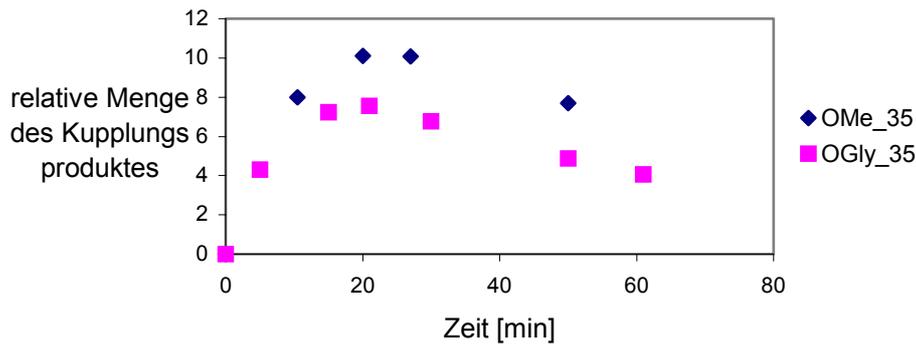


Abbildung 74: Transferase assay für Peptoid-Gly **12** und Methylester **26** bei $T=35^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=8.2$ in Bicin Puffer (100mM, EDTA 2mM), $c_{\text{Ac}}=3,7\text{mM}$, $c_{\text{Nu}}=0,9\text{mM}$, $c_{\text{E}}=8,7\mu\text{g/ml}$, 15% MeOH, 17% Glycerin.

9.6.2. Transfer der Acyldonoren **12** und **26** bei 25°C

Die Kupplungsreaktion zwischen den gleichen Substraten und unter den gleichen Bedingungen mit Ausnahme von $T=25^{\circ}\text{C}$ ist in *Abbildung 75* gezeigt. Die Unterschiede in den Kupplungsausbeuten für diese zwei Acyldonoren sind bei dieser Temperatur grösser als bei 35°C und bestätigen, dass Methylester **26** ein besseres Substrat als das Depsipeptid **12** ist.

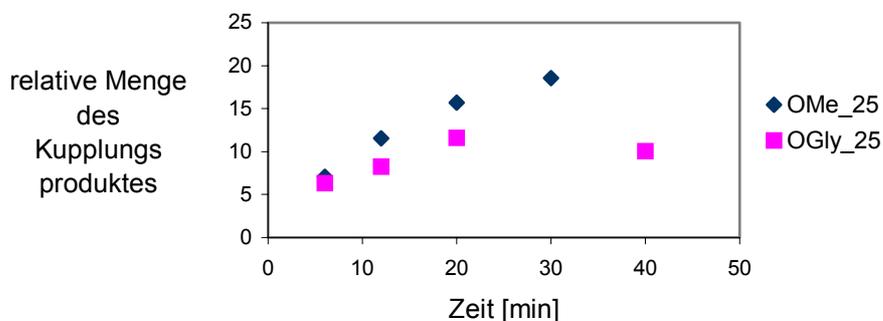


Abbildung 75: Transferase assay für Peptoid-Gly **12** und Methylester **26** bei $T=25^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=8.2$ in Bicin Puffer (100mM, EDTA 2mM), $c_{\text{Ac}}=3,7\text{mM}$, $c_{\text{Nu}}=0,9\text{mM}$, $c_{\text{E}}=8,7\mu\text{g/ml}$, 15% MeOH, 17% Glycerin.

Die letzten Experimente bestätigen, dass der Methylester **26** höhere Kupplungsausbeuten als das Glykolsäurederivat **12** liefert. Die Produktmengen sind für die Reaktionen bei 25°C und 35°C direkt miteinander vergleichbar. Bei 25°C braucht man zwar längere Zeit um die maximale Ausbeute zu erreichen als bei 35°C , dafür ist aber die Ausbeute bei 25°C höher als bei 35°C . Der Einfluss der Temperatur auf die Reaktionsgeschwindigkeit und die Kupplungsausbeute ist auf die unterschiedliche

Aktivität und Stabilität des Enzymes bei unterschiedlichen Temperaturen zurückzuführen.

10. Transferasereaktion mit dem Methylester als Acyldonor.

10.1. Optimierung der reversen Proteolyse

In den vorherigen Experimenten wurde bestätigt, dass Methylester **26** ein besseres Substrat als das Peptoid mit Glykolsäureeinheit **12** ist. Aus diesem Grund wurde eine weitere Optimierung der reversen Proteolyse mit Methylester **26** als Acyldonor durchgeführt. Die Experimente sind in *Tabelle 21* zusammengestellt.

Tabelle 21: Kupplungsexperimente zwischen OMe 26 und CSMP. Bicin - 100 mM Bicin-HCl Puffer, EDTA 2 mM; TAPS - 100 mM TAPS-HCl-Puffer, EDTA 2 mM.

#	C _{Ac} [mM]	C _{Nu} [mM]	C _E ⁴ [µg/ml]	Pufferart, pH	spez. Aktivität [U]/µg Protein	Aktivität in 100 µl Ansatz [U]	% Glycerin	max. Ausbeute %
26.	41,6	0,7	20	Bicin, 8,7	3,7	7,0	0	15,0
27.	70,0	0,7	20	Bicin, 8,7	3,0	5,8	0	16,0
28.	70,0	0,7	30	Bicin, 8,7	3,0	8,4	0	22,0
29.	70,0	0,7	90	Bicin, 8,7	1,9	17,2	19	23,5
30.	70,0	0,7	50	Bicin, 8,7	1,9	8,6	9	20,2
31.	70,0	0,7	90	Bicin, 8,7	2,0	18,5	19	23,0
32.	70,0	0,7	90	TAPS, 8,7	2,0	18,5	19	17,0
33.	70,0	0,7	90	Bicin, 8,9	2,0	18,5	19	24,4
34.	7,0	0,7	90	Bicin, 8,9	1,0	10,2	19	0,0
35.	7,0	0,7	90	Bicin, 8,9	1,8	22,5	19	8,0
36.	70,0	0,7	50	Bicin, 8,9	1,3	11,5	46	4,0
37.	70,0	0,7	50	Bicin, 8,9	0,9	11,5	46	6,2
38.	70,0	0,7	50	Bicin, 8,9	1,6	14,1	20	39,0
39.	70,0	0,7	50	Bicin, 8,9	1,6	14,1	50	8,3
40.	70,0	0,7	50	Bicin, 8,9	1,6	14,6	20	37,0
41.	70,0	0,7	50	Bicin, 8,9	2,7	24,6	20	36,0

⁴ Enzymkonzentration in der Reaktionslösung am Anfang der Reaktion. Diese Konzentration verändert sich im Laufe der Reaktion durch das Entnehmen der HPLC-Proben und in manchen Fällen durch die Zugabe der Acyldonorlösung.

42.	70,0	0,7	50	Bicin, 8,9	2,7	24,6	20	37,0
43.	70,0	0,7	50	Bicin, 8,9	2,2	20,7	20	26,5
44.	70,0	0,7	50	Bicin, 8,9	2,2	20,7	20	28,0
45.	70,0	0,7	50	Bicin, 8,9	1,4	13,0	30	28,0
46.	70,0	0,7	50	Bicin, 8,9	6,2	57,2	30	28,3
47.	70,0	0,7	50	Bicin, 8,9	2,2	20,1	20	34,0
48.	70,0	0,7	50	Bicin, 8,9	3,7	34,4	20	47,0
49.	70,0	0,7	50	Bicin, 8,9	4,7	43,6	20	41,0
50.	70,0	0,7	50	Bicin, 8,9	5,7	52,9	20	38,0
51.	70,0	0,7	50	Bicin, 8,9	4,1	37,7	20	63,0
52.	70,0	0,7	50	Bicin, 8,9	4,1	37,7	20	61,0
53.	75,0	0,7	50	Bicin, 8,9	4,2	38,6	21	66,3

Aus den oben gezeigten Daten sieht man, dass der Einfluß der Konzentration des Acyldonors, Nukleophils oder Enzyms dem des Peptoids **12** gleicht. Aus Reaktionen 26, 27, 33, 35 wird ersichtlich, dass eine hohe Acyldonorkonzentration unentbehrlich für eine gute Transferaseausbeute ist und dass eine 10-fach höhere Konzentration als der K_M -Wert nicht ausreichend ist, um hohe Kupplungsausbeuten zu erreichen.

10.2. Einfluss der Acyldonorkonzentration

Der Einfluß der Acyldonorkonzentration wurde in zwei Reihen untersucht, mit entsprechend 0% und 20% Glycerin in der Reaktionslösung, dargestellt in *Tabelle 21 und Abbildung 76*. In Diagramm B) mit 0% Glycerin in der Reaktionslösung beobachtet man bei zehnfacher Steigerung der Acyldonorkonzentration (von 7mM auf 70mM) fast vierfache Steigerung der Kupplungsausbeute (von 8 auf 30%). Diagramm A) zeigt, dass in einem Konzentrationsbereich, in dem das Enzym über die ganze Reaktionszeit mit dem Substrat gesättigt wird, eine zweifache Steigerung der Acyldonorkonzentration (von 42mM auf 70mM) einen wesentlich kleineren Zuwachs der Kupplungsausbeute (von 14,5 auf 17,4%) bringt.

Tabelle 21: Einfluss der Acyldonorkonzentration auf die Ausbeute des Acyltransfers.

#	C_{AC} [mM]	C_{Nu} [mM]	C_E [µg/ml]	Pufferart, pH	spez. Aktivität [U]/µg Protein	Aktivität in 100 µl Ansatz [U]	% Glycerin	max. Ausbeute %
26.	41,6	0,7	20	Bicin, 8,7	3,7	7,0	0	15,0

27.	70,0	0,7	20	Bicin, 8,7	3,0	5,8	0	16,0
33.	70,0	0,7	90	Bicin, 8,9	2,0	18,5	19	24,4
35.	7,0	0,7	90	Bicin, 8,9	1,8	22,5	19	8,0

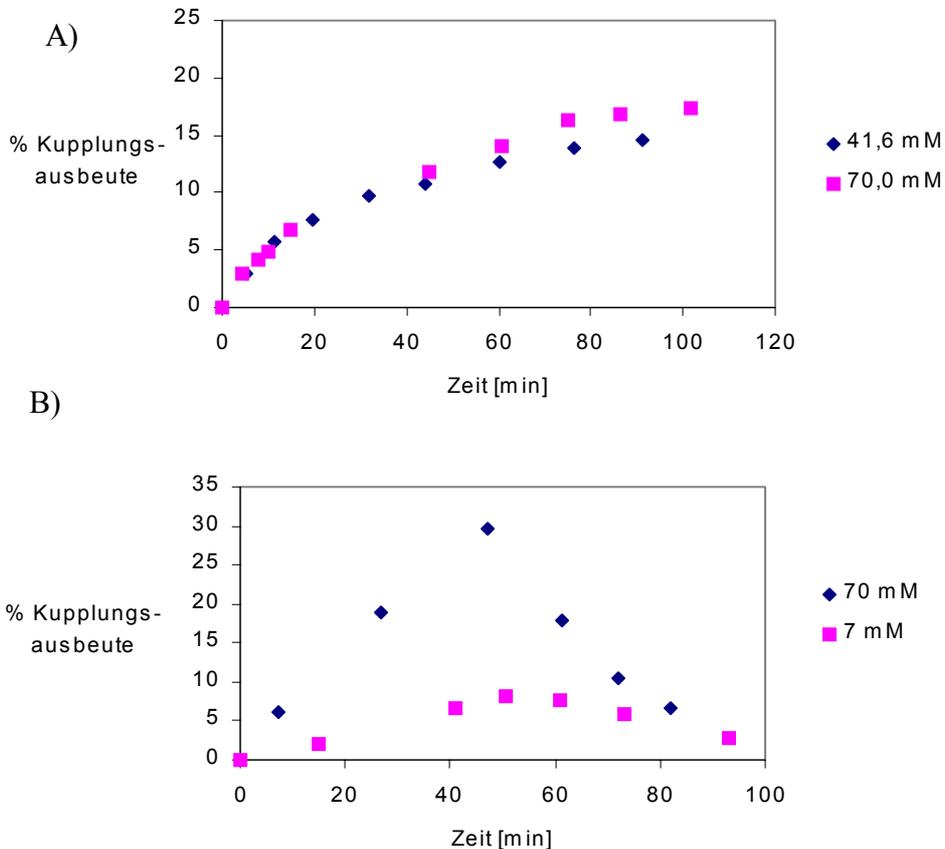


Abbildung 76: Einfluss der Acyldonorkonzentration auf die Kupplungsausbeute und kinetischer Verlauf der reversen Proteolyse von Methyl ester **26** und CSMP **12**. Beide Diagramme unterscheiden sich in der Glycerinmenge in der Reaktionslösung: A) 0% Glycerin, Enzym Roche; B) 19% Glycerin, Enzym MoBiTec. Weitere Reaktionsbedingungen: A) $c_E=20 \mu\text{g/ml}$, $c_{Nu}=0,7 \text{ mM}$, Bicin Puffer 100 mM, EDTA 2 mM, pH=8,7, Akt =7,0 U, B) $c_E=90 \mu\text{g/ml}$, $c_{Nu}=0,7 \text{ mM}$, Bicin Puffer 100 mM, EDTA 2 mM, pH=8,9, Akt =22,5 U.

10.3. Einfluss der Pufferart

Es wurden zwei Pufferarten getestet:

1. TAPS-HCl 100mM, EDTA 2mM Puffer pH=8,7
2. Bicin-HCl 100mM, EDTA 2mM Puffer pH=8,7

Tabelle 22: Einfluss der Pufferart auf die Kupplungsausbeute.

#	c_{Ac} [mM]	c_{Nu} [mM]	c_E [$\mu\text{g/ml}$]	Pufferart, pH	spez. Aktivität [U]/ μg Protein	Aktivität in 100 μl Ansatz [U]	% Glycerin	max. Ausbeute %
32.	70,0	0,7	90	TAPS, 8,7	2,0	18,5	19	17,0
33.	70,0	0,7	90	Bicin, 8,9	2,0	18,5	19	24,4

Die Kupplung verläuft schneller in Bicin-Puffer ($pK_a=8,3$) als in TAPS-Puffer ($pK_a=8,4$), dargestellt in *Abbildung 77*.

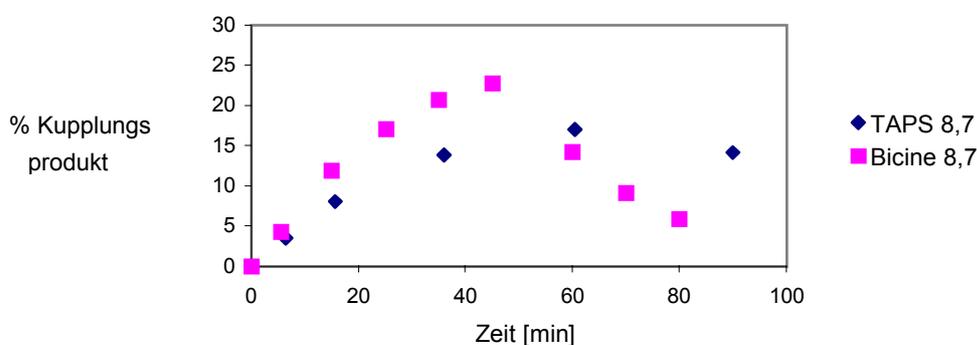


Abbildung 77: Kinetischer Verlauf der Kupplung zwischen OMe 26 und CSMP 12 in unterschiedlichen Pufferarten. Bedingungen: $c_E=90 \mu\text{g/ml}$, $c_{Ac}=70 \text{ mM}$, $c_{Nu}=0,7 \text{ mM}$, Akt.=18,5 U, 19% Glycerin.

10.4. Einfluss des pH-Wertes

Genauer wurden nur zwei pH-Werte getestet, bei denen die höchste Ausbeute erwartet wurde. Die erreichte Ausbeute ist minimal besser für den mehr basischen pH-Wert (*Abbildung 78*).

Tabelle 23: Einfluss des pH-Wertes auf die Kupplungsausbeute.

#	c_{Ac} [mM]	c_{Nu} [mM]	c_E [$\mu\text{g/ml}$]	Pufferart, pH	spez. Aktivität [U]	Aktivität in 100 μl Ansatz [U]	% Glycerin	max. Ausbeute %
31.	70,0	0,7	90	Bicin, 8,7	2,0	18,5	19	23,0
33.	70,0	0,7	90	Bicin, 8,9	2,0	18,5	19	24,4

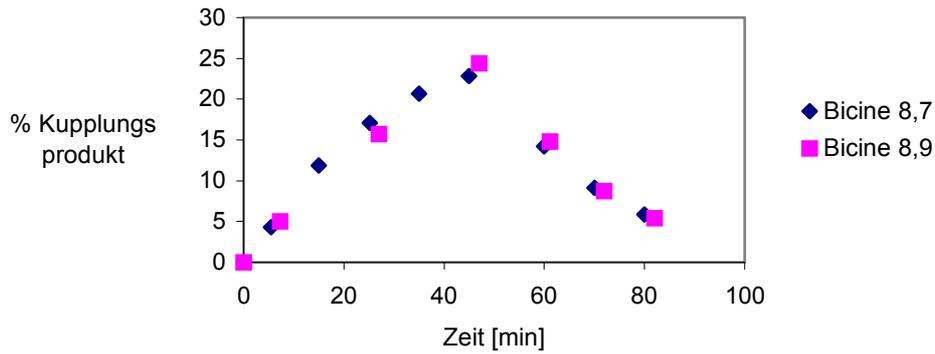


Abbildung 78: Kinetischer Verlauf der Kupplungsreaktion unter variierten pH-Werten. Bedingungen: : $c_E=90 \mu\text{g/ml}$, $c_{AC}=70 \text{ mM}$, $c_{Nu}=0,7 \text{ mM}$, Akt.=18,5 U, 19% Glycerin.

10.5. Einfluss der Inkubationstemperatur

Inkubationszeit und Inkubationstemperatur haben sehr großen Einfluß auf die Kupplungsausbeute, weil sie entscheidend für Enzymaktivität und Stabilität sind. Das bei 25°C für eine Stunde inkubierte Enzym brachte eine um den Faktor 1,6 bessere Kupplungsausbeute als das Enzym, das im Eisbad (0-4°C) über die gleiche Zeit inkubiert wurde (Abbildung 79).

Tabelle 24: Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Kupplungsausbeute.

#	c_{AC} [mM]	c_{Nu} [mM]	c_E [$\mu\text{g/ml}$]	Pufferart, pH	spez. Aktivität [U]/ μg Protein	Aktivität in 100 μl Ansatz [U]	% Glycerin	max. Ausbeute %
36.	70,0	0,7	50	Bicin, 8,9	1,3	11,5	46	4,0
37.	70,0	0,7	50	Bicin, 8,9	0,9	11,5	46	6,2

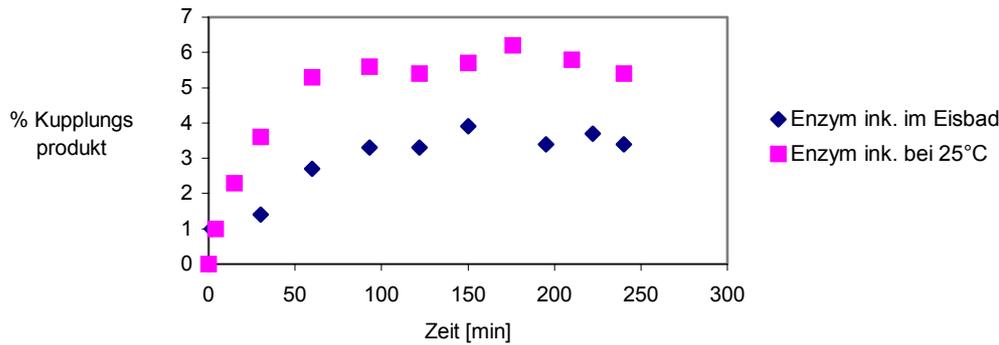


Abbildung 79: Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Kupplungsausbeute. Bedingungen: $c_E=50 \mu\text{g/ml}$, $c_{Ac}=70 \text{ mM}$, $c_{Nu}=0,7 \text{ mM}$, Akt.=11,5 U, 46% Glycerin.

10.6. Einfluss der Glycerinkonzentration

Aus früheren Ergebnissen (Kap.7.7.) weiß man, dass Glycerin auf die IgA-Protease stabilisierend wirken kann. In *Abbildung 80* sieht man, dass mit 20 % Glycerin in der Reaktionslösung eine vierfach bessere Kupplungsausbeute als mit 50% Glycerin erreicht wurde. Aus der Kinetik für den Versuch mit 50% Glycerin ist ersichtlich, dass das Enzym zwar stabil ist, aber nicht über ausreichend hohe Aktivität verfügt. Die 20% Glycerinlösung lieferte schon bei der Hydrolyse die besten Ausbeuten (Kap.7.7.). Bei diesem Glyceringehalt in der Reaktionslösung beobachtete man zwar einen Aktivitätsverlust über die Zeit, trotzdem war die Aktivität während der Reaktion jederzeit am höchsten. Einen ähnlichen Einfluss beobachtet man auch für die Kupplungsreaktion.

Tabelle 25: Einfluss der Glycerinkonzentration auf die Kupplungsausbeute.

#	c_{Ac} [mM]	c_{Nu} [mM]	c_E [$\mu\text{g/ml}$]	Pufferart, pH	spez. Aktivität [U]/ μg Protein	Aktivität in 100 μl Ansatz [U]	% Glycerin	max. Ausbeute %
38.	70,0	0,7	50	Bicin, 8,9	1,6	14,1	20	39,0
39.	70,0	0,7	50	Bicin, 8,9	1,6	14,1	50	8,3

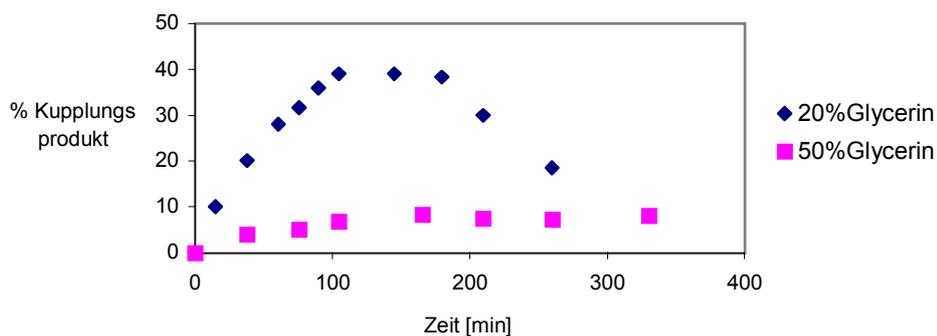


Abbildung 80: Einfluss der Glycerinkonzentration auf die Kupplungsausbeute. Bedingungen: $c_E=50 \mu\text{g/ml}$, $c_{Ac}=70 \text{ mM}$, $c_{Nu}=0,7 \text{ mM}$, Akt.=14,1 U, Bicin-HCl-Puffer 100 mM, EDTA 2 mM, pH=8,9, Vorinkubation 1h bei 25°C.

10.7. Einfluss der EDTA Konzentration

IgA-Protease ist eine Serinprotease. Um ihre Aktivität beobachten zu können, braucht man keine Metallionen im aktiven Zentrum. Trotzdem wurde geprüft, ob die Aktivität durch unterschiedliche Konzentrationen des Metallkomplexbildners beeinflusst wird. In *Abbildung 81* sieht man, dass die höheren EDTA-Konzentrationen die Aktivität des Enzyms hemmen, so dass die Reaktion am langsamsten für die höchste EDTA-Konzentration (10mM) ist. Die Kupplungsgeschwindigkeit bis zum Maximum unterscheidet sich für alle drei Konzentrationen minimal. Erst nach Erreichen des Maximums beobachtet man einen unterschiedlich schnellen Abbau des synthetisierten Peptids. Dieses Verhalten kann man auf eine niedrigere Stabilität des Enzyms bei höheren EDTA-Konzentrationen zurückführen. Aus praktischen Gründen (gebildetes Produkt wird langsamer abgebaut) kann eine niedrigere Enzymstabilität eine positive Wirkung haben. Die maximale Kupplungsausbeute wurde durch unterschiedliche EDTA-Konzentrationen nicht beeinflusst. Dafür wurde das Kupplungsprodukt langsamer abgebaut, was bei der kinetischen Kontrolle und Isolierung des Produktes einige Vorteile haben könnte.

Tabelle 26: Einfluss der EDTA-Konzentration auf die Kupplungsausbeute.

#	C_{Ac} [mM]	C_{Nu} [mM]	C_E [$\mu\text{g/ml}$]	Pufferart, pH	spez. Aktivität[U]/ μg Protein	Aktivität in 100 μl Ansatz [U]	% Glycerin	max. Ausbeute %
40.	70,0	0,7	50	Bicin, 8,9	1,6	14,6	20	37,0
41.	70,0	0,7	50	Bicin, 8,9	2,7	24,6	20	36,0
42.	70,0	0,7	50	Bicin, 8,9	2,7	24,6	20	37,0

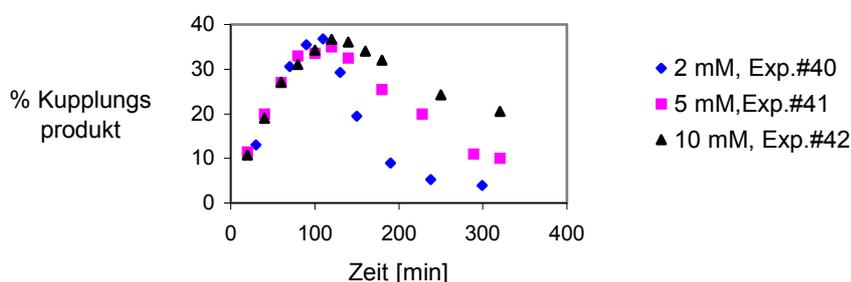


Abbildung 81: Kinetik der Kupplung zwischen Methylester **26** und CSMP **37** unter unterschiedlichen EDTA-Konzentrationen: 2, 5, 10 mM. Reaktionsbedingungen: $c_E=50 \mu\text{g/ml}$, $c_{Ac}=70 \text{ mM}$, $c_{Nu}=0,7 \text{ mM}$, Bicin-HCl-Puffer 100 mM, pH=8,9, Vorinkubation 1h bei 25°C.

10.8. Einfluss der Temperatur

Mit Enzymlösung, die bei gleicher Temperatur inkubiert wurde, hat man reverse Proteolyse bei unterschiedlichen Temperaturen (25°C, 37°C) durchgeführt. In *Abbildung 82* beobachtet man, dass die Reaktion bei 37°C minimal schneller ein Maximum erreicht als die Reaktion bei 25°C, dafür aber ist die maximale Kupplungsausbeute etwas niedriger bei 37°C als 25°C.

Tabelle 27: Einfluss der Temperatur auf die Kupplungsausbeute.

#	C_{Ac} [mM]	C_{Nu} [mM]	C_E [$\mu\text{g/ml}$]	Pufferart, pH	spez. Aktivität[U]/ μg Protein	Aktivität in 100 μl Ansatz [U]	% Glycerin	max. Ausbeute %
43.	70,0	0,7	50	Bicin, 8,9	2,2	20,7	20	26,5
44.	70,0	0,7	50	Bicin, 8,9	2,2	20,7	20	28,0

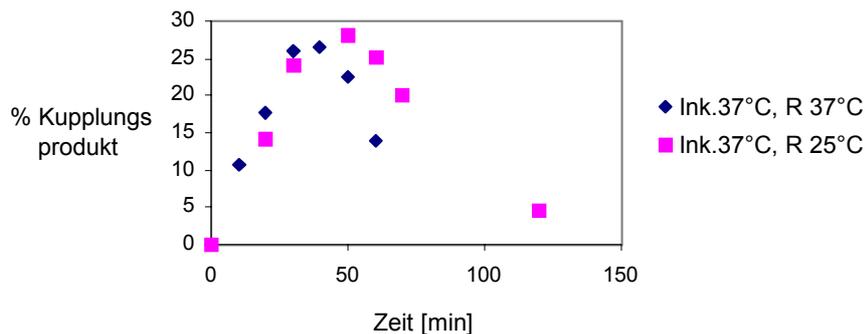


Abbildung 82: Einfluss der Temperatur auf die Kupplungsausbeute in der Reaktion zwischen Methylester **26** und CSMP **37**. Bedingungen: $c_E=50 \mu\text{g/ml}$, $c_{Ac}=70 \text{ mM}$, $c_{Nu}=0,7 \text{ mM}$, Bicin-HCl-Puffer 100 mM , EDTA 2 mM , $\text{pH}=8,9$, Vorinkubation 1 h bei 37°C , $A=20,7 \text{ U}$.

10.9. Verschiedene Arten der Reaktionsführung und ihr Einfluss auf die Kupplungsausbeute

Einer der wichtigsten Parameter in der Optimierung von Kupplungsreaktionen ist die Konzentration des Acyldonors, der in den gleichzeitig stattfindenden Reaktionen Hydrolyse und Aminolyse teilnimmt. Die Konzentration des Acyldonors muss so hoch sein, dass das Enzym über die ganze Reaktionszeit gesättigt wird. Aus diesem Grund wurde überlegt, ob man die Ausbeute verbessert, wenn die hohe Acyldonorkonzentration über die ganze Reaktionszeit konstant bleibt. Zu diesem Zweck wurden Experimente durchgeführt, in denen man

1. einen Acyldonor als gesättigte Lösung über eine bestimmte Zeit kontinuierlich mit einer Spritzenpumpe zugibt
2. den Acyldonor einmalig in Form einer gesättigten Lösung zugibt
3. den Acyldonor einmalig im festen Zustand zugibt.

Der Acyldonor, der als konzentrierte Lösung zugegeben wurde, verändert das gesamte Reaktionsvolumen, was die Enzymkonzentration verringert. Der Acyldonor in fester Form verändert zwar kaum das Reaktionsvolumen. Da man schon am Anfang der Reaktion mit hoch konzentrierten Lösungen arbeitet, stößt man schnell an die Löslichkeitsgrenze, so dass ein Teil des Acyldonors ungelöst bleibt.

Wie man in *Abbildung 83* sieht, erreicht man die beste Kupplungsaktivität, wenn man den Acyldonor mit einer Spritzenpumpe zugibt, also wenn die Acyldonorkonzentration über die ganze Zeit konstant bleibt. Der Acyldonor ist in diesem Fall über die ganze Reaktionszeit vorhanden, weshalb man die vorhandene Enzymaktivität in vollem

Ausmaß ausnutzen kann. In der Reaktion, in der der Acyldonor als Lösung einmalig zugegeben wurde, beobachtet man den Aufbau der Peptidbindung so lange, wie der Acyldonor in der Reaktionslösung vorhanden ist. Danach wurde die synthetisierte Peptidbindung schnell abgebaut. In der Reaktionslösung mit einmalig zugegebenen Acyldonor in Form eines Feststoffes erreicht man niedrigere Ausbeuten. Der Abbau des synthetisierten Peptides ist allerdings ebenfalls langsamer.

Von Interesse war auch, ob ein Unterschied besteht, wenn man den Acyldonor portionsweise oder kontinuierlich mit Spritzenpumpe zugibt. In *Abbildung 84* sieht man, dass die Art der Reaktionsführung keinen Einfluss auf die Kupplungsausbeute hat. In beiden Fällen ist die maximale Ausbeute gleich, der kinetische Verlauf der Kupplungsreaktion ist dafür unterschiedlich.

Tabelle 28: Einfluss der Reaktionsführung auf die Kupplungsausbeute.

#	c_{Ac} [mM]	c_{Nu} [mM]	c_E [µg/ml]	Pufferart, pH	spez. Aktivität [U]/µg Protein	Aktivität in 100 µl Ansatz [U]	% Glycerin	max. Ausbeute %
48.	70,0	0,7	50	Bicin, 8,9	3,7	34,4	20	47,0
49.	70,0	0,7	50	Bicin, 8,9	4,7	43,6	20	41,0
50.	70,0	0,7	50	Bicin, 8,9	5,7	52,9	20	38,0
51.	70,0	0,7	50	Bicin, 8,9	4,1	37,7	20	63,0
52.	70,0	0,7	50	Bicin, 8,9	4,1	37,7	20	61,0
53.	75,0	0,7	50	Bicin, 8,9	4,2	38,6	21	66,3

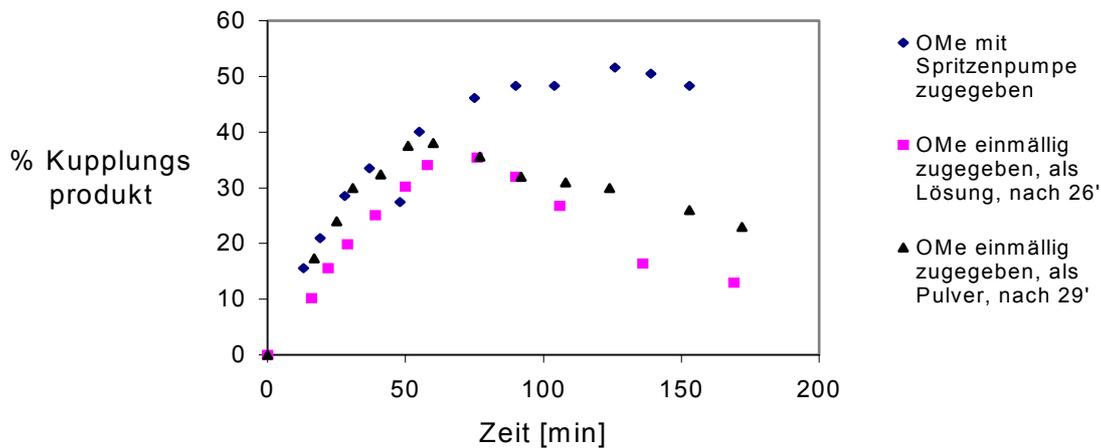


Abbildung 83: Verschiedene Arten der Reaktionsführung und ihr Einfluss auf die Kupplungsausbeute. Bedingungen: $c_E=50 \mu\text{g/ml}$, $c_{Ac}=70 \text{ mM}$, $c_{Nu}=0,7 \text{ mM}$, Bicin-HCl-Puffer 100 mM, EDTA 2 mM, pH=8,9, Vorinkubation 1h bei 25°C, $A=37,7 \text{ U}$.

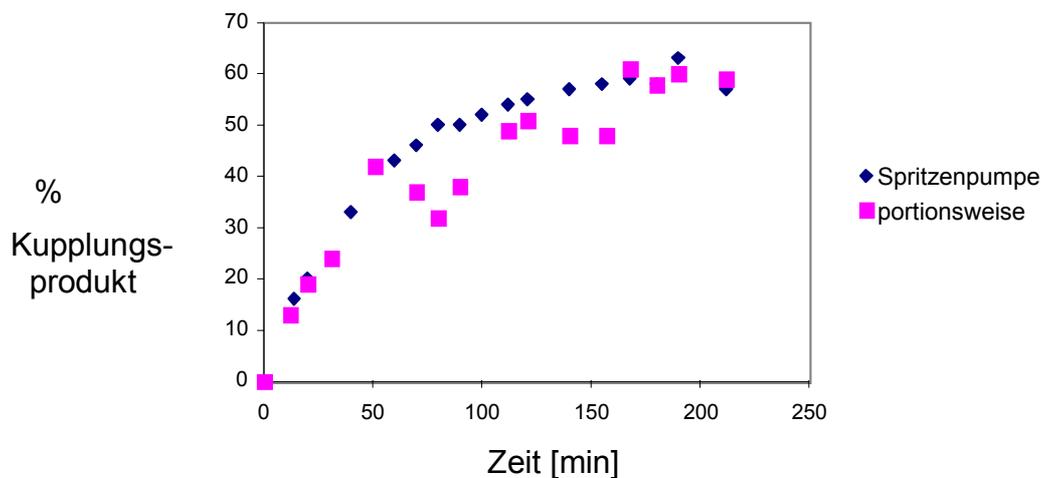


Abbildung 84: Verschiedene Arten der Reaktionsführung (die Acylidonorkonzentration wurde konstant gehalten und entweder kontinuierlich mit Spritzenpumpe oder portionsweise zur Reaktionslösung zugegeben) Bedingungen: $c_E=50 \mu\text{g/ml}$, $c_{Ac}=70 \text{ mM}$, $c_{Nu}=0,7 \text{ mM}$, Bicin-HCl-Puffer 100 mM, EDTA 2 mM, pH=8,9, Vorinkubation 1h bei 25°C, $A=37,7 \text{ U}$.

10.10. Die besten Bedingungen für Transferase

Um die reverse Proteolyse zu optimieren, musste man das Gleichgewicht zwischen Hydrolyse und Aminolyse zugunsten der Aminolyse verschieben und gleichzeitig die Parameter berücksichtigen, die Stabilität und hohe Aktivität des Enzyms garantieren.

Zu den wichtigsten Parametern gehörte die Acyldonorkonzentration. Die hohe Konzentration des Acyldonors war unentbehrlich, um Umsätze der beiden Reaktionen beobachten zu können. Wenn kein Acyldonor in der Reaktionslösung vorhanden war, konnte weder Kupplung noch Hydrolyse des Acyldonors beobachtet werden. Dagegen beobachtete man einen unerwünschten Abbau des in der reversen Proteolyse synthetisierten Peptids - des einzigen in der Lösung vorhandenen Acyldonors. Die Verwendung einer hoher Acyldonorkonzentration wirkte diesem Effekt entgegen.

Laut Jakubke gehört die Partitionskonstante $p = (V_{\text{Amin}}/V_{\text{H}_2\text{O}}) \times [\text{Nu}]$ zu den wichtigsten Parametern, die die reverse Proteolyse beschreiben. Diese Partitionskonstante ist sehr stark von der Konzentration des Nukleophils abhängig. Die Experimente zeigten, dass eine höhere Nukleophilkonzentration zwar eine höhere absolute Produktkonzentration, aber keine höhere Ausbeute bringt. In diesem Fall hat man sich für eine Nukleophilkonzentration entschieden, die günstig wegen der Löslichkeitsgrenze in Pufferlösungen war.

Ein weiterer Parameter war der pH-Wert der Reaktionslösung. Die Reaktion erreichte die besten Ausbeuten bei $\text{pH} = 8,5-8,9$. Dieser pH-Wert war optimal für die IgA-Protease und gleichzeitig der pH-Wert bei dem die α -Aminogruppe des Proteins starke nukleophile Eigenschaften besaß.

In der Literatur wurde ein Zusatz von organischen Lösungsmittel als Parameter beschrieben, der zugunsten der Aminolyse wirkt. In oben beschriebenen Experimenten wurde Glycerin zugesetzt. Der Zusatz von Glycerin beeinflusste hauptsächlich die Aktivität und Stabilität des Enzyms. Zusätzlich verbesserte das Glycerin die Löslichkeit von Reaktionskomponenten und verringerte die Wasserkonzentration in der Reaktionslösung.

Aus den durchgeführten Experimenten hat sich herausgestellt, dass die Natur der Puffersubstanz sehr wichtig ist. Abhängig von der Säurestärke des Puffers beeinflusste man die chemische Hydrolyse in der Reaktionslösung und wirkte dadurch zugunsten oder gegen die Hydrolyse des Acyldonors.

Einen sehr großen Einfluss auf die Ausbeute hatten die Inkubationstemperatur und Reaktionstemperatur. Abhängig von der Temperatur nimmt das Enzym offenbar unterschiedliche Konformationen an, in der Inkubation bei höheren Temperaturen fand Denaturierung statt. Die beste Temperatur sowohl für die Reaktionsführung als auch für die Inkubation war 25°C .

Die Kinetik bei optimalen Bedingungen ist in *Abbildung 85* dargestellt.

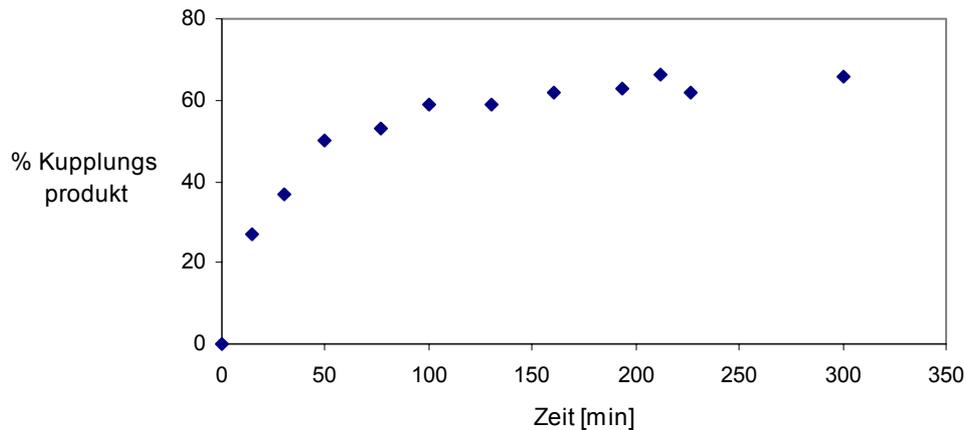


Abbildung 85: Die Kinetik der reversen Proteolyse bei optimalen Reaktionsparametern. Bedingungen: $c_E=50 \mu\text{g/ml}$, $c_{Ac}=75 \text{ mM}$, $c_{Nu}=0,7 \text{ mM}$, Bicin-HCl-Puffer 100 mM , EDTA 2 mM , $\text{pH}=8,9$, Vorinkubation 1 h bei 25°C , $A=37,7 \text{ U}$ im Ansatz, 21% Glycerin, portionsweise oder mit Spritzenpumpe zugegebener Acyldonor.

In oben gezeigtem Versuch wurden die für die reverse Proteolyse optimalen Parameter eingehalten. Die Acyldonorkonzentration wurde über die ganze Reaktionszeit konstant gehalten bei der Konzentration von etwa 75 mM . Der Acyldonor wurde portionsweise, alle 20 min als gesättigte Lösung zugegeben. Die Konzentration des Nukleophils betrug $0,7 \text{ mM}$. Als Puffer wurde Bicin Puffer genommen, bei dem man am langsamsten Spontanhydrolyse im Hintergrund beobachtete. Der pH -Wert von $8,9$ war ein optimaler Wert sowohl wegen der Aktivität des Enzyms als auch wegen der nukleophilen Eigenschaften der Aminogruppe des Nukleophils. In der Reaktionslösung befand sich 20% Glycerin. Das Glycerin verbesserte die Stabilität des Enzyms und Löslichkeit der Reaktionskomponenten. Die 2 mM EDTA Konzentration brachte die besten Ausbeuten. Die effektive Konzentration des Enzyms war $0,05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ bei der Aktivität von $38,6 \text{ U}$ pro $100 \mu\text{l}$ Ansatz.

Unter diesen Bedingungen erreichte man eine maximale Kupplungsausbeute von 66.3% . Diese Bedingungen wurden weiter zur Modifizierung von Proteinen verwendet.

11. Modifikation von Proteinen

11.1. Voraussetzungen für die Modifikation

Um ein Protein am N-Terminus regioselektiv modifizieren zu können, muss es bestimmte Eigenschaften bezüglich seiner primären, sekundären und tertiären Struktur besitzen. In der reversen Proteolyse wird das Protein als Nukleophil verwendet (die Modifikation findet an der freien α -Aminogruppe statt) und muss die entsprechende primäre Sequenz besitzen, um von der IgA-Protease erkannt zu werden. Aus der Erkennungssequenz für die Spaltungstelle kann man die primäre Sequenz für das Nukleophil ablesen:

P ₁ '	P ₂ '	P ₃ '	P ₄ '
Ala	Pro	Ser	Trp
Gly		Trp	Tyr
		Tyr	

Die ersten vier Aminosäuren sind für die Erkennung von der IgA-Protease entscheidend. Die weitere Sequenz des Proteins ist nicht entscheidend dagegen ist die Einbindung des N-Terminus in die sekundäre, tertiäre und quaternäre Struktur wichtig. Der N-Terminus sollte ein unstrukturiertes Element sein (random coil), so dass er für die Bindung an das aktive Zentrum des Enzyms nicht entfaltet werden muss. Am besten eignet sich für eine solche Modifizierung ein Protein mit einer kompakten Struktur mit einem N-Terminus, der weit von der gefalteten Struktur entfernt ist. Das Protein sollte am besten aus nur einer Peptidkette bestehen, so dass es nur über einen N-Terminus verfügt. Das Protein sollte keine weitere Erkennungssequenz besitzen, so dass eine Spaltung und eventuelle Kupplungsreaktionen an anderen Stellen ausgeschlossen ist.

11.2. Anticalin FluA ^[182] ^[183]

Als ein Modellprotein wurde zur Modifikation durch reverse Proteolyse ein Anticalin FluA ausgewählt. Für unsere Zwecke wurde dieses Protein aufgrund seiner Struktur ausgewählt. (*Abbildung 86*) Das Protein verfügt über eine kompakte 3D-Struktur mit einem isoliertem N-Terminus, besteht außerdem aus nur einer Polypeptidkette und besitzt dadurch alle wichtigen Eigenschaften, die zur regioselektiven Modifizierung durch reverse Proteolyse benötigt werden.

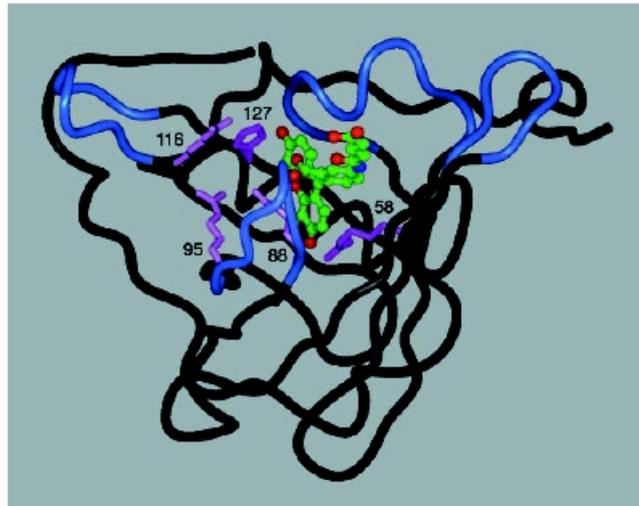


Abbildung 86: 3D-Struktur von Anticalin Flu A mit einem 4-glutarylamidofluorescein als Ligand. Im Gerüst des Anticalin FluA unterscheidet man die β -barrel Struktur (schwarz), die identisch mit der Kristallstruktur des BBP-Proteins ist, 4 mutierten loops (blau), die sich an einem Ende der Molekultasche befinden, Seitenketten von mutierten Resten (violett), die mit Ligand interagieren können. Der Ligand wurde mit drei Farben dargestellt: grün - C, rot - O und blau - N Atome.

Anticalin FluA gehört zur Familie der Lipocaline. Diese Proteinklasse besitzt bestimmte einheitliche Strukturmerkmale, auch wenn die Sequenzähnlichkeit relativ gering ist. Zu den charakteristischen Struktureigenschaften gehört eine zylindrische Faltblattstruktur (β -barrel mit antiparallelen β -Faltblattsträngen). Zu weiteren charakteristischen Strukturen, die aber nicht bei allen Proteinen vorkommen, zählt ein gestrecktes Segment am N-Terminus und eine α -Helix in der Nähe vom C-Terminus, die wieder von einem gestreckten Segment gefolgt wird. Manche Lipocaline besitzen noch zusätzlich einen Membrananker. Die Lipocaline spielen eine bestimmte physiologische Rolle, die aus Speicherung und Transport von verschiedenen Liganden besteht. Ein Ende des β -barrels ist durch eine dichte Aminosäurepackung verschlossen. An anderem Ende bildet das β -barrel eine Bindungstasche, in der Liganden komplexiert werden können. Ein typischer natürlicher Ligand für Lipocaline ist Vitamin A.

Anticaline sind künstliche Proteine, die aus Polypeptiden der Lipocaline dadurch hergestellt wurden, dass man die Aminosäuren, die sich an einem Ende des β -barrels befanden, mutierte. Durch diese Mutation konnte eine neue Affinität zu bestimmten Liganden erworben werden.

Zu Modifizierung des Proteins durch reverse Proteolyse wurde Anticalin FluA gewählt, welches über eine hohe Affinität gegenüber Fluorescein A verfügt. Dieses Protein enthält 184 Aminosäuren:

```
1    DVYHDGACPE VKPVDNFDWS QYHGKWWWEVA KYPSPNGKYG KCGWAEYTPE
51   GKSVKVSRYD VIHGKEYFME GTAYPVGDSK IGKIYHSRTV GGYTRKTVFN
101  VLSTDNKNYI IGYSCRYDED KKGHWHDHVVV LSRSMVLTGE AKTAVENYLI
151  GSPVVD SQKL VYSDFSEAAC KVNNSNWSHP QFEK
```

Anticalin FluA ist ein mutiertes *bilin-binding-protein* (BBP), ein Lipocalin aus *Pieris brassicae*, das in 16 Positionen mutiert wurde:

34-Serin, 35-Prolin, 36-Asparagin, 37-Glycine, 58-Arginine, 60-Asparaginsäure, 69-Methionin, 88-Arginin, 90-Valin, 93-Tyrosine, 95-Arginin, 96-Lysin, 97-Threonine, 114-Serin, 116-Arginin, 125-Tryptophan, 127-Histidin.

Diese 16 Seitenketten bilden 4 loops an einer Seite des β -barrels, verfügen über viele geladene Seitenketten, so dass das mutierte Protein ein neues Ligand-Fluorescein A bindet. Die Bindung der Fluorescein ist spezifisch, mit einer Dissoziationskonstante von $K_d < 35.2$ nM. Anticaline werden durch ihre Bindungseigenschaften mit Immunglobulinen verglichen, weil sie wie die Immunglobuline Zielverbindungen über nicht kovalente Bindungen binden. Fluorescein kann in dieser Hinsicht mit einem Hapten verglichen werden. Am C-Terminus enthält das Anticalin FluA einen Strep-tag (die letzten 10 Aminosäuren).

Für unsere Zwecke wurde das Protein noch zusätzlich am N-Terminus mutiert, so dass es sicher über eine geeignete N-terminale Primärsequenz verfügt. Insgesamt wurden zwei neue Proteine hergestellt, die über einen neuen, durch Insertion erzeugten, N-Terminus verfügten. Das Protein IgAP1 enthielt zusätzlich die vier Aminosäuren Alanin, Prolin, Serin und Tryptophan an ihrem N-Terminus. Mit dem zweiten Protein wurden mehrere Modifikationen durchgeführt: Insertion von Alanin, Prolin und Serin und Deletion von Asparaginsäure und Valin, mit der die Sequenz des unmutierten Proteins begonnen hatte. Die N-terminalen Sequenzen von allen drei Proteinen (IgAP1, IgAP2 und Anticalin Flu A) werden in der *Abbildung 87* gezeigt.

		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.			
FluA:		D	V	Y	H	D	G	A	A	C	P	E			
IgAP1:	A	P	S	W	D	V	Y	H	D	G	A	A	C	P	E
IgAP2:		A	P	S	Y	H	D	G	A	A	C	P	E		

Abbildung 87: Primäre Sequenz der N-terminalen Segmente von unmutiertem Anticalin Flu A und zwei zusätzlich am N-Terminus mutierten Anticalinen Flu A, die als IgAP1 und IgAP2 bezeichnet wurden. Die zwei letzten Proteine besitzen die Erkennungssequenz der IgA-Protease.

Die über *site directed mutagenesis* mutierten Anticaline Flu A wurden nach der Expression charakterisiert. Im Edmann Abbau wurde die Übereinstimmung der gewünschten und der vorhandenen Sequenz bewiesen. Außerdem wurden die Massen der neuen Anticaline bestimmt (Abbildung 88 und 89).

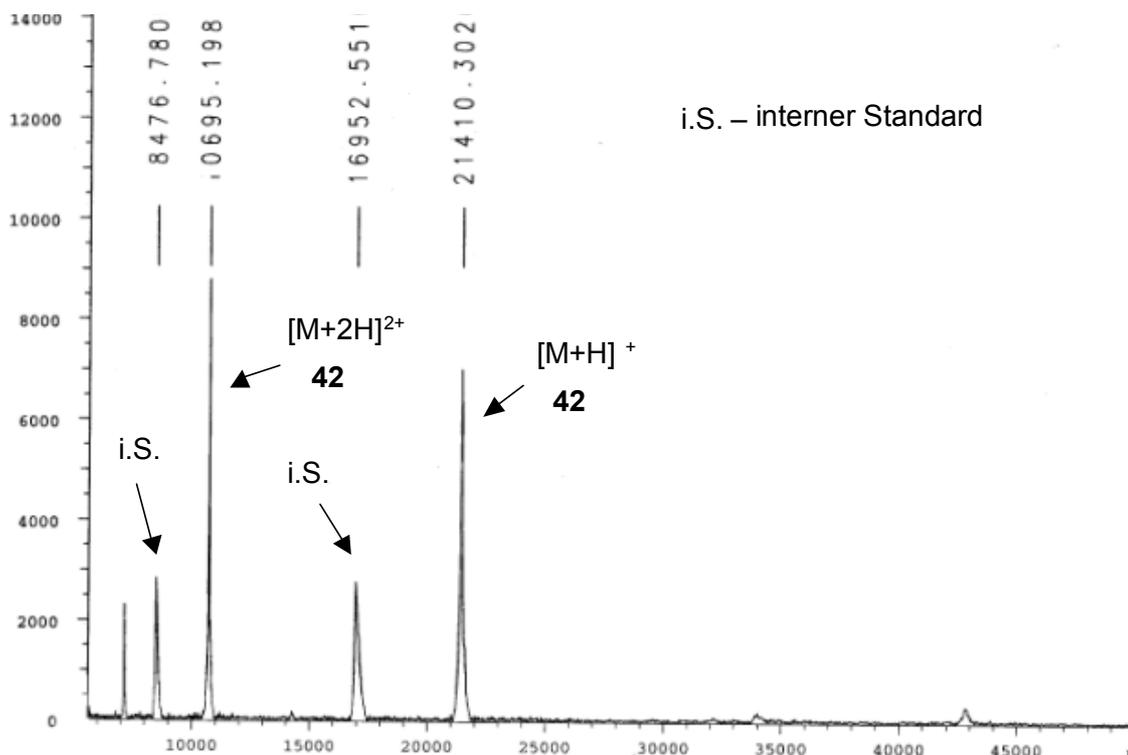


Abbildung 88: MALDI-TOF MS von Anticalin IgAP1 dessen N-Terminus über *site-directed-mutagenesis* mutiert wurde.

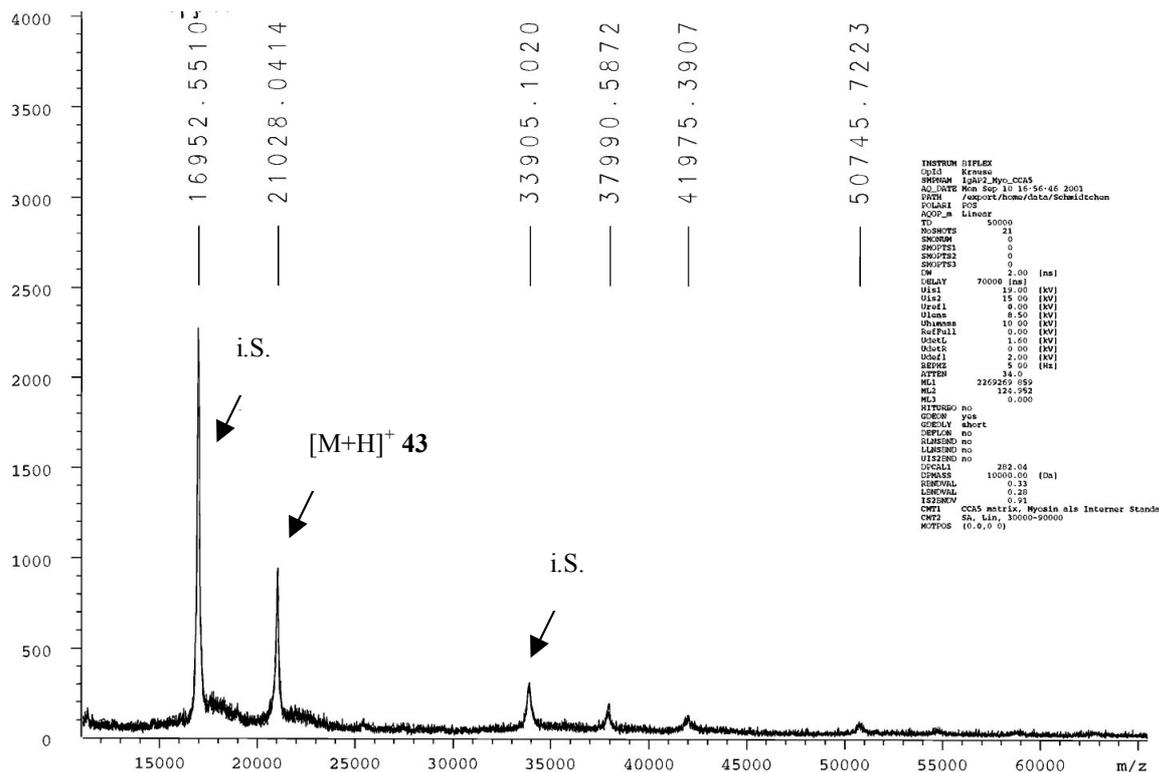


Abbildung 89: MALDI-TOF MS von Anticalin IgAP2 derer N-Terminus über site-directed-mutagenesis mutiert wurde.

Das Maldi TOF MS von IgAP1 **42** wurde mit α -Cyano-4-hydroxymyosin als Matrix mit Zusatz von TFA im linearen und positiven Modus aufgenommen. Das Spektrum wurde intern mit Myoglobin kalibriert, von Myoglobin stammen die Peaks: $[M+H]^+=16952$ und $[M+2H]^{2+}=8476$. Die Masse von IgAP1 beschreiben Peaks: $[M+H]^+=21410$; $[M+2H]^{2+}=10695$; $[M+3H]^{3+}=7137$; $[2M+H]^+=42820$ (Abbildung 88). Mit der N-terminalen Insertion von vier Aminosäuren (Ala, Pro, Ser, Trp) sind auch möglicherweise Gegenionen eingeführt worden, wodurch die erhaltene Masse um 23 Da (Natriumion) höher als erwartet ist.

Das Maldi TOF MS von IgAP2 **44** wurde unter den gleichen Bedingungen, mit der gleichen Matrix und internem Standard aufgenommen. Die Masse von IgAP2 betrug $[M+H]^+=21028$ (Abbildung 89).

11.3. Transferasereaktion mit IgAP1

11.3.1. Kinetischer Verlauf der Transferasereaktion mit IgAP1 **42**

Für die Untersuchung der Kinetik wurden alle optimalen Bedingungen (beschrieben in Kap.10.10.) bis auf die Nukleophilkonzentration übernommen. Statt eines CSMP-Peptides wurde als Nukleophil ein mutiertes Protein Anticalin Flu A (hier bezeichnet als IgAP1) verwendet. Aufgrund der niedrigen Löslichkeit des Proteins in der Reaktionslösung musste die Nukleophilkonzentration verringert werden. Die reverse Proteolyse verlief gemäß der Gleichung:



*Bedingungen: $c_{Ac}=71$ mM, $c_{Nu}=0,11$ mM, $c_E=0,17$ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 3,4 μg Enzym im Ansatz, Bicin 100mM, EDTA 2mM, 20% Glycerin, pH=8.9. Acyldonor wurde portionsweise zur Reaktionslösung zugegeben (jeweils 20 μl gesättigter Lösung von **26**, nach 20, 50 und 90 Minuten zugegeben).*

Die Reaktion wurde per HPLC verfolgt, detektiert wurden UV Absorption (220nm) und Fluoreszenz von Tryptophan, das im Protein **42** an 6 Positionen vorhanden ist. Die Tryptophanfluoreszenz wurde zur Quantifizierung der Reaktionsausbeute verwendet. Die Kinetik dieser reversen Proteolyse von **42** zu **44** ist in *Abbildung 90A* gezeigt. Ein HPLC-Chromatogramm (Fluoreszenzspur) ist in *Abbildung 90B* dargestellt. Die Peaks der Proteine **42** und **44** sind zwar nicht basisliniengetrennt, die Trennung ist aber ausreichend um die Kupplungsausbeute zu bestimmen. Mit i.S. wurde der interne Standard bezeichnet. Außerdem erkennt man im Chromatogramm noch drei weitere Peaks von denen der langsamste schon als Verunreinigung des FluA **42** eingebracht wurde, wogegen die anderen schnell laufenden Verbindungen vor der eigentlichen Reaktion entstanden.

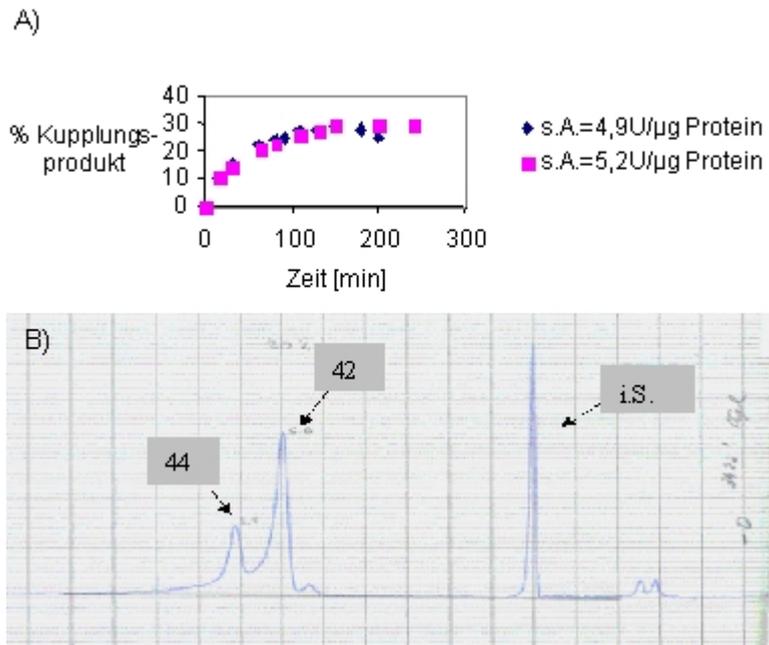


Abbildung 90: A) Kinetik der reversen Proteolyse zwischen Acyldonor **26** und Nukleophil **42**.
 B) HPLC-Chromatogramm mit maximaler Kupplungsausbeute.

Nachdem das Maximum erreicht wurde, wurde die Reaktion mit Essigsäure gestoppt und das Produkt über präparative HPLC abgetrennt. Die Masse des isolierten Produktes wurde mit Maldi TOF analysiert (Abbildung 91).

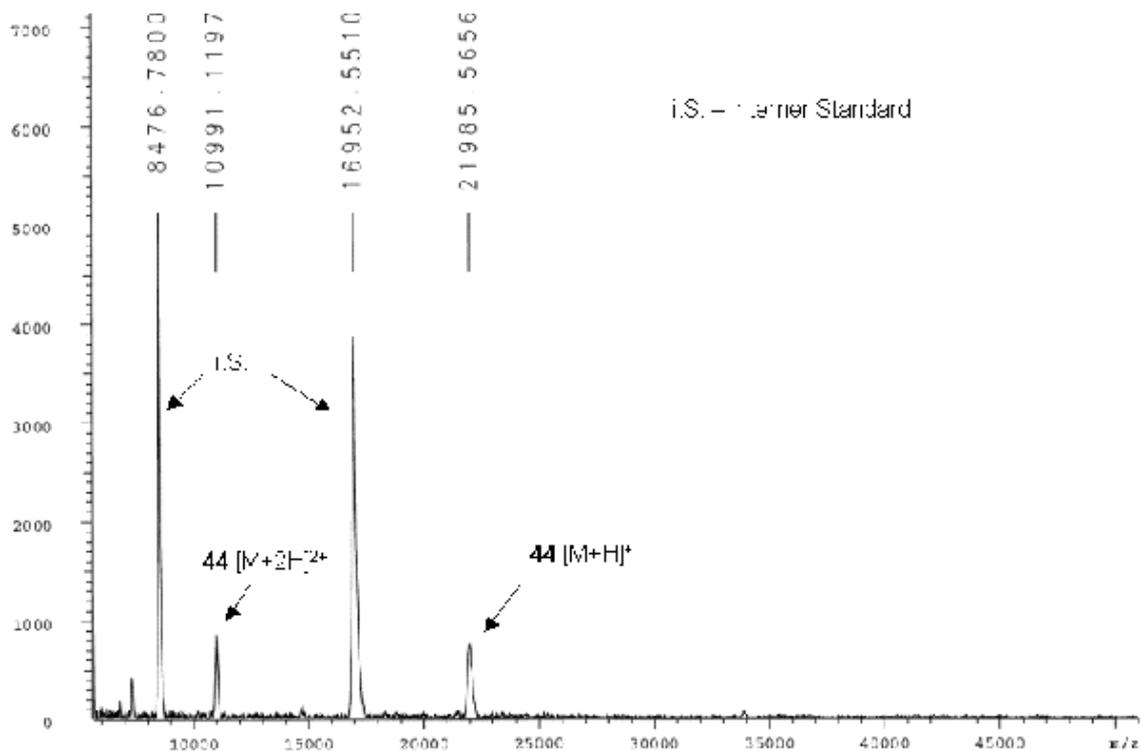


Abbildung 91: Maldi TOF-MS vom isolierten Kupplungsprodukt **44**.

Die experimentell erhaltene Masse des modifizierten Proteins **44** betrug 21985 Da und wurde mit der Masse des unmodifizierten Proteins **42** ($M=21410$ Da) verglichen. Die am N-Terminus angeknüpfte Einheit ohne Gegenion hatte eine Masse von 548,5 Da. Die erhaltene Masse war um 26,8 Da größer als erwartet, was entweder auf das zusätzlich angelagerte Natrium. (Tabelle 29)

Tabelle 29: Experimentell gefundene Massen von IgAP1 und ihrem Produkt nach der Modifikation in der reverse Proteolyse.

Protein	exp. Masse [M+H] ⁺
unmodifiziertes IgAP1 42	21410,3
modifiziertes Protein 44	21985,6
Massenunterschied zwischen 42 und 44	575,3
Masse der in der reversen Proteolyse eingeführten Einheit: BocPRPP- (ohne Gegenion)	548,5
gebliebene Masse (möglicherweise Na ⁺)	26,8

Zusätzlich wurde die Sequenz des modifizierten Proteins mit Edmann Degradation untersucht. Dafür wurde zuerst die Boc-Gruppe vom N-Terminus des Proteins **44** mit

TFA abgespalten. Die Ergebnisse der Edmann Degradation sind in *Tabelle 30* zusammengefasst.

*Tabelle 30: Experimentiell gefundene (Edmann Abbau) Primärsequenz von unmodifiziertem IgAP1 **42** und durch reverse Proteolyse modifiziertem Protein **44**. n.e.b.- nicht eindeutig bestimmt.*

Aminosäure- position	Unmodifiziertes Protein 42	Kupplungsprodukt 44
1	A	P
2	P	R
3	S	n.e.b.
4	n.e.b.	P
5	D	n.e.b.
6	V	P

Die ersten zwei Aminosäuren wurden in beiden Fällen eindeutig bestimmt und sind zusammen mit der Masse ein Beweis dafür, dass die gewünschte Modifikation regio-selektiv am N-Terminus stattgefunden hat.

11.3.2. Vergleich mit der Modifikationen von CSMP und IgAP1

Bei der Modifikation von Proteinen hat man mit sterischen Hindernissen zu tun, die man bei der Modifizierung von Peptiden nicht in diesem Ausmaß vorfindet. Um den sterischen Einfluss beurteilen zu können, wurde die Modifikation von CSMP unter den identischen Bedingungen wie die Modifikation von IgAP1 (Kap 11.3.1) durchgeführt.

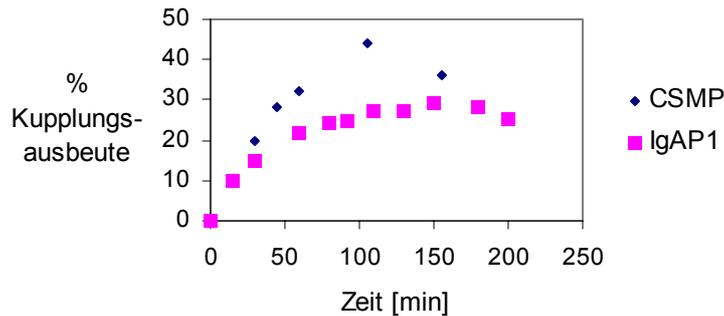


Abbildung 92: Reverse Proteolyse von Methylester **26** und CSMP-Peptid **37** unter Bedingungen der Proteinmodifikation. Bedingungen: $c_{AC}=71,5$ mM, $c_{Nu}=0,107$ mM, Bicin Puffer 100 mM, EDTA 2 mM, pH=9.0, $c_E= 3.4$ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 20% Glycerin, nach 20, 50 und 80 Minuten 20 μl gesättigter Acyldonorlösung zugegeben, Reaktion mit CSMP spez.Akt.=4.6 U/ μg Protein, Reaktion mit IgAP1 spez.Akt.=4.9 U/ μg Protein.

Die beiden Kinetiken (Modifizierung von IgAP1 **42** und CSMP **37**) kann man direkt miteinander vergleichen. Die höchsten Ausbeuten waren:

für IgAP1 30% bei der Enzymaktivität von 4,9 U/ μg Protein

für CSMP 44% bei der Enzymaktivität von 4,6 U/ μg Protein

Die Ausbeute für Peptid CSMP **37** ist 1,46 mal besser als für das Protein **42**. Die sterischen Effekte der Wechselwirkung zwischen Substratprotein und Katalysator sind merklich und reduzieren die maximale Kupplungsausbeute um 30% im Vergleich zur Reaktion mit einem Peptid, bei dem man keine solche sterischen Effekte erwartet. Im Vergleich zu der optimierten Reaktion mit CSMP (Kap 10.10.) stellt man fest, dass die 7-fache Reduktion der Nukleophilkonzentration (von 0,7 auf 0,1mM) mit einer 1,5 fachen Ausbeutereduktion (von 67 auf 44%) einhergeht.

11.3.3. Blindreaktionen

In der primären Sequenz des IgAP1 wurde keine Erkennungsstelle für die IgA-Protease außer am N-Terminus gefunden. Um dies zu bestätigen und andere nicht kovalente Interaktionen zwischen IgAP1 **42** und IgA-Protease auszuschliessen, wurde ein Experiment ohne Acyldonor durchgeführt, so dass sich in der Reaktionslösung nur das Protein **42**, das Enzym und ein interner Standard befand, auf den man die Höhe des Proteinpeaks beziehen konnte.

Über die Zeit von 3h30' beobachtete man keinen neuen Fluoreszenzpeak im HPLC-Chromatogramm. Das Verhältnis der Peakhöhen von IgAP1 und internem Standards betrug:

Zeit [min]	$h_{(\text{IgAP1})} / h_{(\text{int. St.})}$
30	1,3
90	1,3
135	1,4
180	1,3

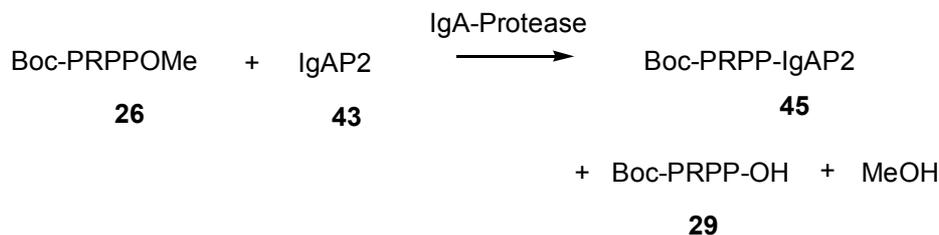
Das Verhältnis der beiden Peaks hat sich in der Zeit nicht verändert, woraus man schließen kann, dass kein proteolytischer Abbau des IgAP1 **42** und auch keine anderen irreversiblen Interaktionen zwischen **42** und dem Enzym unter diesen Bedingungen stattfanden.

11.4. Transferasereaktion mit IgAP2

Zur N-terminalen Modifikation wurde auch Protein IgAP2 **43** verwendet, welches das gleiche Proteingerüst wie IgAP1 enthält und sich nur mit einem N-Terminus unterscheidet.

11.4.1. Kinetischer Verlauf der Transferasereaktion mit IgAP2 **43**

Die Reaktion verlief wie folgt:



Bedingungen: $c_{Ac}=71\text{mM}$, $c_{Nu}=0,11\text{mM}$, $c_E=0,17\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$, $3,4\ \mu\text{g}$ Enzym im Ansatz, Bicine 100mM , EDTA 2mM , 20% Glycerin, $\text{pH}=9,0$, $T=25^\circ\text{C}$. Acyldonor wurde portionsweise zur Reaktionslösung zugegeben ($40\ \mu\text{l}$ gesättigter Lösung von **26** in 20 % Glycerinlösung, nach 20, 50, 80 und 110 Minuten zugegeben).

Die Reaktion wurde per HPLC verfolgt, detektiert wurden UV Absorption (220nm) und Fluoreszenz von Tryptophan. Die Fluoreszenz von 5 Tryptophanresten, die das Protein **43** enthielt, wurde zur Quantifizierung von Proteinen **43** und **45** verwendet. Die Kinetik der reversen Proteolyse ist in *Abbildung 93* vorgezeigt.

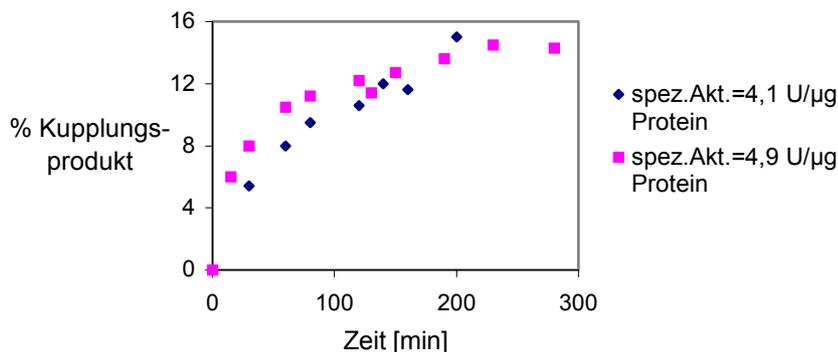
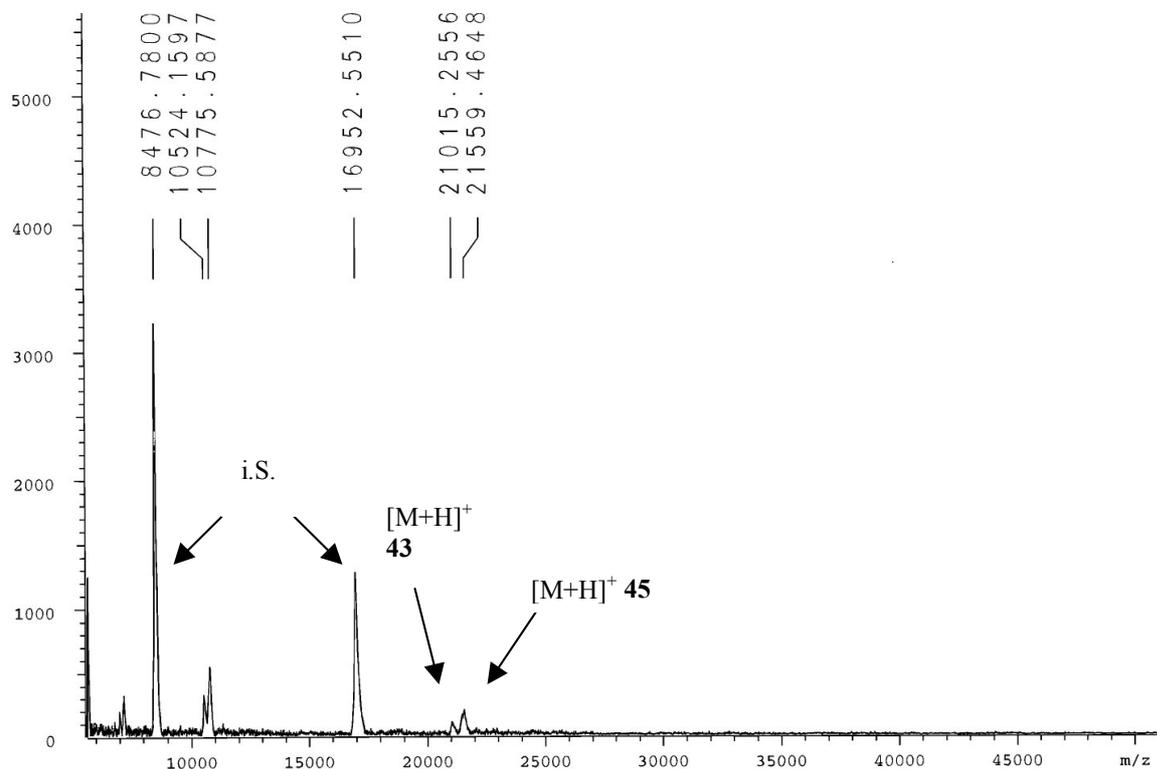


Abbildung 93: Kinetik der reversen Proteolyse zwischen Methylester 31 und IgAP2 43. Bedingungen: Bedingungen: $c_{Ac}=71\text{mM}$, $c_{Nu}=0,11\text{mM}$, $c_E=0,17\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$, $3,4\ \mu\text{g}$ Enzym im Ansatz, Bicine 100mM , EDTA 2mM , 20% Glycerin, $\text{pH}=9,0$, $T=25^\circ\text{C}$. Acyldonor wurde portionsweise zur Reaktionslösung zugegeben ($40\ \mu\text{l}$ gesättigter Lösung von **26** in 20 % Glycerinlösung, nach 20, 50, 80 und 110 Minuten zugegeben).

Nachdem das Maximum der Kupplungsausbeute erreicht war, wurde das Kupplungsprodukt von anderen Reaktionskomponenten durch präparative HPLC abgetrennt. Die Trennung der beiden Peaks der Proteine **43** und **45** war nicht bis zur Basislinie möglich, so dass die Analyse (MALDI-TOF und Edmann Abbau) mit einem Gemisch von Substrat und Produkt durchgeführt wurde. Die mit MALDI-TOF MS gefundene Masse des IgAP2 und des Kupplungsproduktes **45** sind in der *Abbildung 94* gezeigt.



*Abbildung 94: MALDI-TOF-MS des Gemisches: unmodifiziertes IgAP2 **43** und Kupplungsprodukt **45**.*

*Tabelle 31: Experimentell gefundene Massen von IgAP2 **43** und ihrem Produkt **45** nach der Modifikation in der reverse Proteolyse.*

Protein	exp. Masse
IgAP2 43	21015,3
modifiziertes Protein 45	21559,5
Massenunterschied zwischen 43 und 45	544,2
Masse der eingefügten Einheit (ohne Gegenion)	548,5

Der experimentelle Massenunterschied zwischen beiden Proteinen **43** und **45** war 544 Da. Theoretisch sollte der Unterschied 548 Da betragen, was der Masse von BocPRPPOH ohne Gegenion für Arginin entspricht.

Beim Edmann Abbau fand man Aminosäurederivate sowohl von modifiziertem als auch von unmodifiziertem Protein, da man eine Mischung von beiden untersuchen musste. Die erhaltene Sequenz des Kupplungsproduktes enthielt an Positionen 3,5,6 nicht eindeutig identifizierte Aminosäuren (*Tabelle 32*).

*Tabelle 32: Primäre Sequenz nach Edmann Abbau von unmodifizierten IgAP2 **43** und durch reverse Proteolyse modifiziertem Protein.*

Aminosäure-	unmodifiziertes	Kupplungsprodukt 45
1	A	P, A
2	P	R
3	S	n.e.b.
4	Y	P
5	H	n.e.b.
6	D	n.e.b.
7	G	S

11.4.2. Blindreaktionen

Zur Untersuchung der Abhängigkeit von Acyldonor **26** befanden sich unter Standardbedingungen das Protein IgAP2 **43**, IgA-Protease und ein interner Standard. Man kontrollierte das Peakverhältnis zwischen IgAP2 und internem Standard in der Zeit (*Tabelle unten*).

Zeit [min]	$h_{(IgAP1)} / h_{(int. St.)}$
53	1,4
100	1,4
166	1,3

In der Zeit von 2,5 Stunden beobachtet man keinen neuen Peak im HPLC-Chromatogramm, das Verhältnis von Peakhöhen veränderte sich nur wenig. Man kann davon ausgehen, dass das Protein nicht von der IgA-Protease verdaut wurde.

Interessant war die Untersuchung, ob das Peptid **26** in der Reaktionslösung ohne IgA-Protease eine Affinität zu Protein IgAP2 vorzeigt. Aus diesem Grund wurde eine Reaktion zwischen IgAP2, Acyldonor und internem Standard kinetisch verfolgt. Untersucht wurde das Höhenverhältnis der Fluoreszenzpeaks von IgAP2 und internem Standard.

Zeit [min]	$h_{(IgAP1)} / h_{(int. St.)}$
60	0,66
240	0,64

In der Zeit von 4 Stunden änderte sich das Peakhöheverhältnis nur um 5%, zusätzlich beobachtete man eine Verbreiterung des Proteinpeaks. Man kann davon ausgehen, dass die beiden Biomoleküle keine Affinität zueinander zeigten.

11.5. Andere modifizierbare Proteine

Es wurde ein Recherche durchgeführt um herauszufinden, welche Peptide und Proteine die gewünschte primäre und sekundäre Struktur enthalten und sich damit zur Modifikation durch die reverse Proteolyse mit IgA-Protease eignen. Bei der Peptidwahl wurden hauptsächlich zwei Eigenschaften in Betracht gezogen: die geeignete primäre Sequenz des N-Terminus und die kommerzielle Erhältlichkeit. Die Ergebnisse dieser Recherche sind in *Tabelle 33* zusammengefasst.

Tabelle 33: Kommerziell erhältliche Peptide mit geeignetem N-Terminus zur Modifikation durch reverse Proteolyse mit IgA-Protease.

#	Name	N-terminale Sequenz	MW [Da]	Anbieter
1.	CSMP, <i>Carbohydrate Structure Mimicking Peptide</i>	APWLYGPA	874,0 (ohne Gegenion) 1071,1 (mit Gegenionen)	Bachem H-2076
2.	Eotaxin (<i>human</i>)	GPASVPT...	8360,9 74 Aa	Bachem H-4602
3.	GRP (<i>porcine</i>)	APVSVGGGTVLAK-MYPRGDHWAVGHLM-NH ₂		Nova Biochem 05-23-2302
4.	Preprosomatostatin	APSDPRLRQF		Nova Biochem 05-23-0857
5.	Prosomatostatin	APSDPRLRQFLQKSLAA-AAGKQELAKYFLAEL		Nova Biochem 05-23-0855
6.	Pancreatic Polypeptide (<i>human</i>)	APLEPVYPGDNATPE-QMAQYAADLRRY-INMLTRPRY-NH ₂		Nova Biochem 05-23-3350
7.	Pancreatic Polypeptide (<i>bovine</i>)	APL...	36 Aa	Bachem H-6610
8.	Pancreatic Polypeptide (<i>rana temporaria</i>)	APS...	37 Aa	Bachem H-4918
9.	Pancreatic Polypeptide (<i>rat</i>)	APL...	36 Aa	Bachem H-6890
10.	pTH	APL...	45 Aa	Bachem H-4926
11.	Calcitonin human	APF...	57 Aa	Bachem H-3076
12.	Allatostatin	APS...	13 Aa	Bachem H-8065
13.	Galanin	APV...	60 Aa	Bachem H-4982
14.	GRP	APV...	16 Aa	Bachem H-5930
15.	Procollagen α 1	GPP...	31 Aa	Bachem H-4156

Bei der Auswahl der geeigneten Proteine musste man nicht nur auf die primäre Sequenz, sondern auch auf die räumliche Struktur bzw. die Zugänglichkeit des N-Terminus achten. Dafür wurden räumliche Strukturen der Proteine in Proteindatenbanken (PDB) analysiert. Die Ergebnisse dieser Recherche befinden sich in der *Tabelle 34*.

Tabelle 34: Proteine, die sich wegen ihre Primärsequenz und 3D-Struktur zur Modifikation durch reverse Proteolyse eignen.

#	Name des Proteins EC Nummer, Kode in PDB	N-terminale Sequenz	MW [Da] oder Ketten- länge	Vorbereitung des N- Terminus zur reversen Proteolyse ⁵
16.	GST III aus <i>Zea mays var. Mutin</i> .	MAPLKLYGMP	222 Aa	1, AMP M oder AMP L
17.	Anticalin FluA	IgAP1: APSWDVYH... IgAP2: APSYHDGA...	21400 21000	nicht nötig
18.	α -Amylase aus <i>Bacillus subtilis</i> EC 3.2.1.1, 1BAG	LTAPSIKSGT SSGGGS	47010	2, Cat C oder AMP L
19.	Porcine Pancreatic α -Amylase EC 3.2.1.1, 1DHKA	Kette A: XYAPQTQSGR STT Kette B: ATETSFIIDA	Kette A: 55222 Kette B: 24778	2, Cat C oder AMP L
20.	Yeast Hexokinase Pii (Hexokinase B) EC 2.7.1.1, 1IG8	MVHLGPKKPQ random coil	53931	4, Cat C oder AMP L
21.	Bovine Chymotrypsinogen C	CGAPIFQFNL random coil	2kettig	2, Cat C oder AMP L
22.	Papain EC 3.4.22.2, 1BP4	IPGYVDWRQK EEGGGG nicht eindeutig ist die dritte Aa: E in PDB	23410	nicht nötig
23.	Aminopeptidase aus <i>Streptomyces griseus</i> EC 3.4.11.-, 1CP7	APDIPLANVK HHHHH	29708	nicht nötig
24.	Fruktose-1,6-Bisphosphatase aus <i>rabbit liver</i> EC 3.1.3.11, 1BK4	ADKAPFDTDI SS	36433	3, AMP M, dann Cat C oder AMP L
25.	Peroxidase aus <i>Arthromyces ramosus</i> EC 1.11.1.7, 1ARP	QGPGGGGGSV random coil	35686	1, AMP L
26.	α -Amylase aus <i>Bacillus stearothermophilus</i> EC 3.2.1.1, 1HVX	AAPFNGTMMQ EEE	58819	1, AMP L oder AMP M
27.	Endostatin aus <i>Mus musculus</i> , 1KOE	APLA...	184 Aa	nicht nötig
28.	Collagen V homotrimer [α 1(V)] ₃ aus <i>homo sapiens</i> , 1A89	GKPGPRGQRG	2152	3, AMP M, dann Cat C
29.	Myosin aus <i>Gallus gallus</i> , 1ALM	Chain A: ASPDAEMAAF S SS	95928	1, AMP M oder AMP L
30.	Subtilisin aus <i>Bacillus lentus</i> EC 3.4.21.62, 1C9J	AQSVPWGISR HHHHH	26719	3, APM M, dann Cat C oder AMP L
31.	Proteinase K EC 3.4.21.64, 1BRJ	AAQTNAPWGL EESS HHH	28892	5, 2 mal Cat C oder AMP L
32.	Myokinase aus <i>Bos taurus</i> , 1AK2	APNVPAEPV random coil	25487	nicht nötig

⁵ Menge der Aminosäuren zu abspalten, geeignete Protease

33.	α -Amylase aus <i>Sus scrofa</i> EC 3.2.1.1, 1PIF	XYAPQTQSGR TT	55195	2, Cat C oder AMP L
34.	Murine Collagen aus <i>Mus musculus</i> , 1DY2	APLAYERPVL EE	20047	nicht nötig
35.	Aplysia ADP Ribosyl Cyclase EC 3.2.2.5, 1LBE	IVPTRELENV SSHVVH	29525	1, AMP M oder AMP L

Bezeichnungen für sekundäre Struktur: H-helix, B-Rest in isolierten β -Brücke, E-extended β -strand, G-3₁₀ Helix, I-pi Helix, T- hydrogen bonded turn, S-bend. Bezeichnungen für die Proteasen: AMP M - Aminopeptidase M (EC 3.4.11.2), Cat C - Cathepsin C (EC 3.4.14.1), AMP L - Leucine Aminopeptidase (EC 3.4.11.1).

Die aufgefundenen Proteine verfügten über einen geeigneten unstrukturierten N-Terminus mit der gewünschten Sequenz. In vielen Fällen muss der N-Terminus des Proteins zur konjugativen Modifikation vorbereitet werden, was am besten durch proteolytische Abspaltung der N-terminalen Aminosäuren erfolgt. Als Proteasen eignen sich vorwiegend Aminopeptidasen, z.B. Aminodipeptidylpeptidase: Cathepsin C, die jede zweite Peptidbindung unabhängig von der Sequenz hydrolysiert, oder Aminopeptidase M, die jede Peptidbindung des N-terminalen Endes hydrolysiert, dafür aber die Bindung Xaa-Pro viel langsamer als alle anderen, wodurch sich dieses Enzym besonders für unsere Zwecke eignet. Aminopeptidase M eignet sich nicht für die Abspaltung von L-Asparagine (N) oder L-Glutamine (Q) vom N-Terminus. Am ehesten kommt wohl Leucin Aminopeptidase unseren Absichten entgegen, weil sie alle Peptidbindungen mit der Ausnahme von Xaa-Pro hydrolysiert. Auf diese Art kann man alle Aminosäuren vom N-Terminus abspalten und die Hydrolyse wird am Xaa-Pro gestoppt. Dieses Enzym eignet sich zur Vorbereitung des N-Terminus aller Proteine, bei denen vor der gewünschten Sequenz (z.B. AP...) kein zusätzliches Prolin vorkommt.

Eine andere Art der Vorbereitung des N-Terminus des Proteins zur reversen Proteolyse ist *site-directed-mutagenesis*. Die Methode ermöglicht eine Einführung der gewünschten Sequenz praktisch bei jedem Protein, das über recombinante Techniken exprimiert werden kann.

Die Ausbeute der Modifikation durch reverse Proteolyse hängt offenbar stark von der 3D-Struktur des modifizierbaren Proteins und des proteolytischen Enzyms ab. Die räumliche Struktur der IgA-Protease ist bisher nicht bekannt, weshalb die 3D-Computersimulationen des Reaktionsverlaufes ausgeschlossen waren. Einige Raumstrukturen für modifizierbare Proteinen wurden in *Abbildung 95* gezeigt.

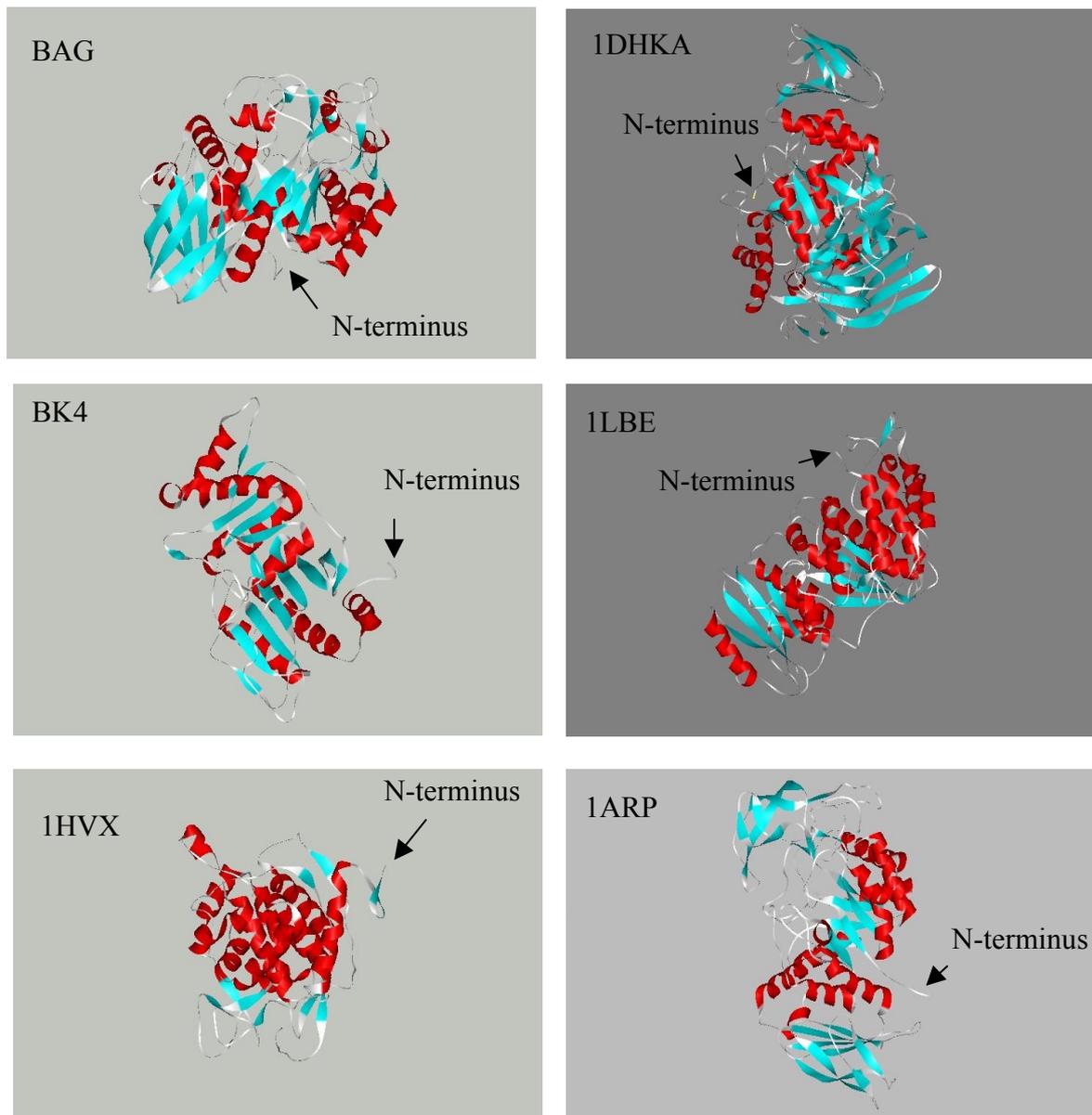


Abbildung 95: 3D-Strukturen der Proteine, die als "modifizierbar durch reverse Proteolyse" klassifiziert wurden. Abkürzungen: BAG - α -Amylase aus *Bacillus subtilis*, 1DHKA - porcine pancreatic α -Amylase, 1BK4 - Fruktose-1,6-Bisphosphatase aus rabbit liver, 1ARP - Peroxidase aus *Arthromyces ramosus*, 1HVX - α -Amylase aus *Bacillus stearothermophilus*, 1LBE - ADP Ribosyl Cyclase.

12. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Methode zur N-terminalen, regiospezifischen Modifikation von Peptiden und Proteinen mithilfe der IgA-Protease. Diese Methode ist ein Bestandteil der Zwei-Schritt-Strategie, in der theoretisch beliebige unnatürliche Gruppen in die Proteine regioselektiv eingeführt werden können. Durch kinetisch kontrollierte reverse Proteolyse (Schritt A, *Abbildung 96*) sollte in das Protein eine reaktive Gruppe selektiv an den N-Terminus gekuppelt werden. Diese Gruppe sollte in einem weiteren regioselektiven, chemischen Verknüpfungsschritt (Schritt B, *Abbildung 96*) mit unnatürlichen Strukturen vernetzt werden.

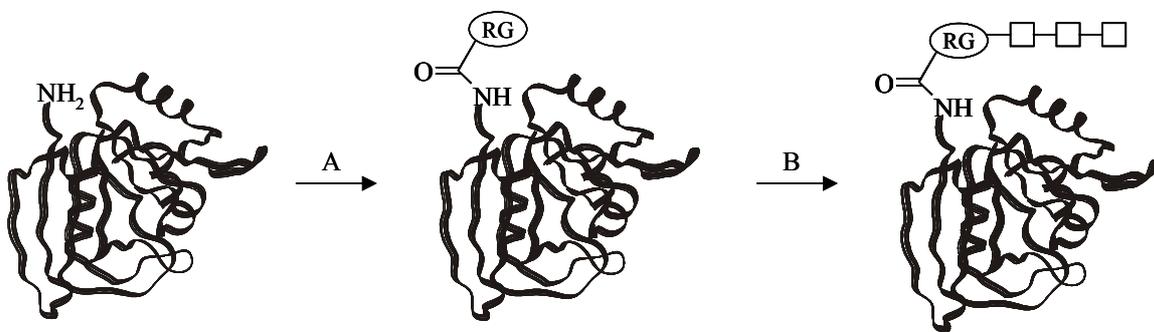


Abbildung 96: Strategie zur N-terminalen Anknüpfung nicht proteinogener Strukturen. Im ersten enzymatischen Schritt (A) soll durch IgA-Protease katalysierte reverse Proteolyse eine reaktive Gruppe (RG) regioselektiv an den N-Terminus gekuppelt werden. Durch eine anschließende Reaktion sollen Fremdstrukturen (- -) selektiv an die reaktive Gruppe (RG) und damit auch an das Protein gebunden werden.

Die bisher bekannten chemischen Modifikationsmethoden sind häufig nicht regio-, stereo- und chemospezifisch. Man beobachtet viele Nebenreaktionen an Seitenketten, Racemisierung und durch unzureichend milde Reaktionsbedingungen im Endeffekt auch den Verlust der biologischen Aktivität des modifizierten Proteins.

Die hier entwickelte neue Methode sollte möglichst universell sein und die Einführung eines breiten Spektrums von Substrukturen ermöglichen. Dabei durfte die 3D-Struktur des Proteins nicht zerstört werden, so dass die modifizierten Proteine ihre biologische Aktivität behalten. Als geeignete Kupplungsmethode wurde die reverse Proteolyse gewählt, da sie die stereo-, chemo- und regiospezifische Bildung der Pep-

tidbindung garantiert und gleichzeitig unter milden Bedingungen verläuft (Abbildung 97).

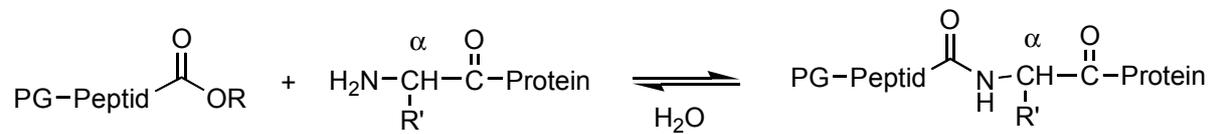


Abbildung 97: Reverse Proteolyse als Methode zur regioselektiven Proteinmodifikation.

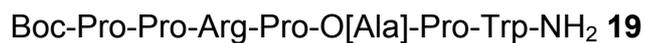
Als Enzym wurde die Endoprotease IgA1-Protease ausgewählt, weil sie die selten vorkommende Sequenz -Pro-Xaa-Pro-Pro-Ala-Pro- erkennt und dadurch die Regio-selektivität garantiert. Die Spaltstelle liegt dabei innerhalb der Erkennungssequenz.

Während der experimentiellen Arbeit hat sich herausgestellt, dass IgA-Protease ein sehr empfindliches, instabiles Enzym ist. Es verlor während der Inkubation bei Raumtemperatur, aber auch durch Verdünnung und bei Auftauen/Einfrieren-Operationen an Aktivität. Als Stabilisator bewährte sich Glycerin am besten. Die höchste Aktivität im Zeitintervall, in dem die kinetische Messung stattfand, wurde für 20% Glycerin erhalten. Diese Glycerinkonzentration wurde in den meisten kinetischen Untersuchungen eingesetzt.

Zur Charakterisierung wurde ein Aktivitätsassay erarbeitet, mit dem die Aktivität des Enzyms in wenigen Minuten quantifiziert werden konnte. Auf dieser Grundlage konnte man die verschiedenen Enzymchargen miteinander vergleichen und die zeitliche Aktivitätsabnahme verfolgen.

Zur N-terminalen Modifikation an einem Modellpeptid wurden noch zwei neue, nicht literaturbekannte Acyldonoren **12** und **19** synthetisiert und in der Hydrolysereaktion geprüft. Diese Substrate waren aufgrund bisheriger Studien als Zielverbindungen ausgesucht worden, da sie alle wichtigen Struktureigenschaften besaßen:

- eine lange und optimierte Erkennungssequenz (Heptapeptide)
- eine Esterbindung an der Spaltungsstelle (anstatt Alanin oder Glycin an der P-Position wurden entsprechende α -Hydroxysäuren eingebaut)



Die Peptide **12** und **19** wurden zuerst in der Hydrolyse- und dann in der Transferase-reaktion getestet und mit anderen Substraten verglichen.

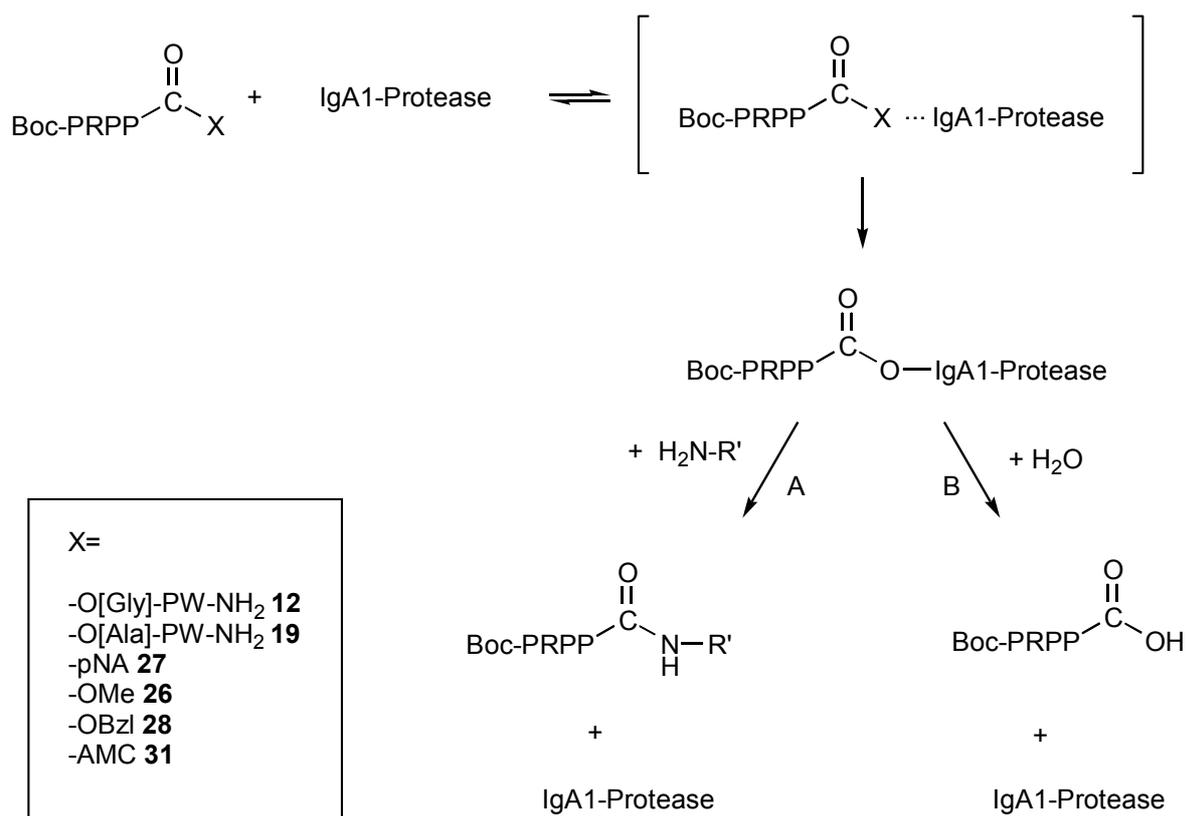


Abbildung 98: Schema der kinetischen Verteilung zwischen Amintransfer (A) und Hydrolyse (B) in der reverse Proteolyse mit IgA1-Protease.

Die neuen Peptidsubstrate **12** und **19** erwiesen sich als sehr labil und wurden deutlich schneller spontan hydrolysiert als die einfachen Esteracyldonoren. Die Bestimmung der enzymatischen Parameter k_{cat} und K_{M} gelang erst nach sorgfältiger Optimierung der Reaktionsbedingungen, um die Spontanhydrolyse zurückzudrängen. Die erhaltenen Werte sind in *Tabelle 34* aufgeführt.

Tabelle 34: Vergleich der K_M und V_{max} -Werte für unterschiedliche Substrate. Abkürzungen: OBzl - Boc-Pro-Arg-Pro-Pro-OBzl **28**, AMC - Boc-Pro-Arg-Pro-Pro-AMC **31**, OGly - Boc-Pro-Arg-Prp-Pro-O[Gly]-Pro-Trp-NH₂ **12**, pNA - Boc-Pro-Arg-Pro-Pro-pNA **27**.

	OBzl	AMC	OGly	pNA
K_M [μM]	119	120	127	56
k_{cat} [s^{-1}]	56	13	78	0.5
k_{cat}/K_M [$\mu\text{M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$]	4.3×10^5	1.1×10^5	6.2×10^5	8.3×10^4

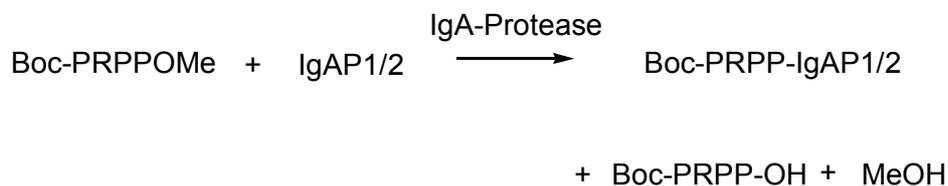
Die K_M -Werte für den Benzylester **28**, das Aminomethylcoumarin **31** und das Depsipeptid **12** sind sehr ähnlich. Die monomolekularen Geschwindigkeitskonstanten k_{cat} für diese Substrate sind in der gleichen Größenordnung, wobei die Hydrolyse von Depsipeptid am schnellsten verläuft. Die Spezifitätskonstante k_{cat}/K_M liegt für die hier untersuchten Substrate in der Größenordnung von 10^4 - 10^5 . Den höchsten k_{cat}/K_M Wert hat Depsipeptid **12** erreicht, wobei der Unterschied im Vergleich zu den restlichen Substraten nicht besonders groß ist. Entgegen den Erwartungen wurde die Affinität durch Verlängerung des Peptidrückgrates im Depsipeptidsubstrat nicht gesteigert.

Bei der mehrstufigen Hydrolyse und Aminolyse ist der erste Schritt (Bildung des Acylenzym) identisch. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist bei der reversen Proteolyse die Nukleophilattacke des Amins und der Transfer der Acyleinheit auf das Amin. Aus diesem Grund kann man die K_M und k_{cat} Daten nicht direkt auf die Aminolyse übertragen. Die Transferase des Acyls wurde an einem Modellpeptid (CSMP) untersucht. Unter den von C.Seitz beschriebenen Bedingungen wurden Ausbeuten von 37% für OMe **26** und 15% für OGly **12** erreicht. Die Kupplungsprodukte dieser beiden Umsetzungen waren identisch und wurden mit MALDI-TOF-MS identifiziert. Die erhaltene Ausbeute war unbefriedigend, weshalb die Reaktion weiter optimiert wurde. Die Optimierung wurde mit OGly **12** und OMe **26** als Substrate durchgeführt. Ausgiebige Variation von Acyldonorkonzentration, Nukleophilkonzentration, Enzymkonzentration, pH-Wert, Methanolgehalt, Glyceringehalt, Pufferart, Inkubationstemperatur, EDTA-Konzentration, Temperatur der Reaktion und Art der Reaktionsführung (in welcher Form und wie oft das Acyldonor während der Reaktion zugegeben wurde) führten schließlich zu einem Satz von Optimalbedingungen, die nachfolgend aufgelistet sind:

$c_E=50 \mu\text{g/ml}$, $c_{Ac}=75 \text{ mM}$, $c_{Nu}=0,7 \text{ mM}$, *Bicin-HCl-Puffer* 100 mM , *EDTA* 2 mM , $\text{pH}=8,9$, *Vorinkubation des Enzyms* 1 h bei 25°C , 20% *Glycerin*, *portionsweise zugegebener Acyldonor* (*jede 20 min als gesättigte Lösung*)

Die höchste auf dieser Basis bestimmte experimentielle Kupplungsausbeute betrug fast 70% . Zu den wichtigsten Parametern gehörte ein hoher Überschuss des Acyldonors gegenüber dem Nukleophil, Zusatz von Glycerin, der auf einer Seite die Enzymaktivität stabilisierte, auf der anderen Seite die Löslichkeit der Komponenten verbesserte. Die Nukleophilkonzentration war von geringerer Bedeutung und wurde so eingestellt, dass man den Reaktionsverlauf gut verfolgen konnte und nicht die Löslichkeitsgrenze der Komponenten überschritt. Infolge der unvermeidlichen Spontanhydrolyse war die Natur der Puffersubstanz von großer Bedeutung. Ein Schlüssel zur erfolgreichen Transferasereaktion war eine hohe Acyldonorkonzentration, die so bemessen sein sollte, dass das Enzym über die ganze Messzeit gesättigt war.

Die Ergebnisse der Optimierung an Peptidsubstraten wurde nun auf die Derivatisierung von Proteinen übertragen. Zur Modifikation wählte man zwei Proteine mit unterschiedlichem N-Terminus und gleichem Proteingerüst. Das Proteingerüst stammte aus Anticalin FluA, das über *site-directed-mutagenesis* am N-Terminus modifiziert wurde. Es verfügt über die kompakte Struktur eines β -barrels mit gestrecktem, unstrukturiertem N-Terminus, ist einkettig und besitzt keine zusätzliche Erkennungstelle für die IgA-Protease. Die beiden Proteine wurden als IgAP1 und IgAP2 bezeichnet. Auf die α -Aminogruppe des Proteins wurde die Acyleinheit: Boc-PRPP- regio-spezifisch übertragen.



Unter den angewandten Bedingungen wurden Kupplungsausbeuten von 30% für IgAP1 und 15% für IgAP2 erreicht. Die Kupplungsprodukte wurden isoliert und durch MALDI-TOF-MS und Edmann Abbau identifiziert. In der Reaktion entstanden keine Nebenprodukte. Wegen der begrenzten Löslichkeit des Proteins wurde die Konzentration des Nukleophils 7-fach reduziert.

Aus dem Vergleich der Modifikationsausbeuten von CSMP-Peptid (44%) und IgAP1 (33%) lässt sich folgern, dass die sterische Zugänglichkeit des Protein-N-Terminus für die IgA-Protease um etwa 30% reduziert ist.

Diese Schlussfolgerung wird auch durch den Vergleich der beiden Proteinsubstrate, die sich vornehmlich in der Länge der nicht strukturierten N-terminalen Sequenz unterscheiden, bestätigt.

Durch Blindreaktionen wurde aufgeklärt, dass es sich um ein über eine kovalente Bindung entstandenes Produkt und nicht um einen Komplex handelt.

Zur Vorbereitung weiterer Proteinmodifizierungen wurde eine Recherche über geeignete Proteine durchgeführt. Als Voraussetzungen wurde die notwendige Primärsequenz am N-Terminus und die geeignete Raumstruktur des Proteins (Zugänglichkeit des N-Terminus) in Betracht gezogen.

Es wurden einige Proteine gefunden, die über die gewünschten Eigenschaften verfügen. Viele prinzipiell geeignete Proteine besitzen ein paar zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus, die man leicht proteolytisch abspalten und auf diese Weise zur Modifikation vorbereiten kann.

Die in dieser Arbeit entwickelte Proteinmodifikationsmethode öffnet die Tür zu einer neuen, selektiven (regio-, chemo- und stereoselektiven), milden und vielseitigen (bekannte Adaptierbarkeit an verschiedenartigsten Tarnfunktionen) in vitro Derivatisierung nativer Proteine. Aus diesem Grund kann diese Methode mit *protein splicing* verglichen werden. In beiden Modifikationsmethoden ist eine bestimmte Sequenz zur Modifikation unentbehrlich, die beiden Methoden sind regio-, chemo- und stereoselektiv und beide eignen sich zu Proteinmodifikationen, ohne dass die 3D-Struktur des Proteins zerstört wird.

Durch das breite Spektrum an eingeführten Gruppen öffnen sich viele Applikationsbereiche, wie: erleichterte Proteinanalytik, klinische und diagnostische Studien, Studien über Proteininteraktionen, Radiopharmazie, neue Separationsmethoden, leichtere Isolierung und Reinigung von Proteinen, Quantifizierung, Immobilisierung, Erhöhung der Stabilität von Proteinen und ihrer Affinität zu Membranen, *enzyme engineering*, Bildung von Proteinfusionen und Enzymkomplexen, Kupplung von Peptidsegmenten und Synthese von Proteinen per Semisynthese.

13. Experimentieller Teil

13.1. Geräte

Käufliche Reagenzien und Lösungsmittel wurden von Roche, MoBiTec, Sigma, Aldrich, Bachem, NovaBiochem, Fluka und Merck bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt. Wässrige Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser hergestellt. Wasserfreie Lösungen wurden durch Filtration über aktiviertem Aluminiumoxid hergestellt.

Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) wurde an folgenden Geräten durchgeführt: Merck Hitachi L100 gradient Pump, UV-Detektor L4250, F 1000 Fluoreszenz Spectrophotometer, Lichtstredetektor EUROSEP DDL-31, Kipp&Zonen Zweikanalschreiber BD 112.

Verwendete HPLC-Säulen:

- Bischoff Nucleosil C-18 250×4, Korngröße 5 µm,
- Nucleosil C-8 250×4, Korngröße 5 µm,
- Prontosil C-18AQ 250×4, Korngröße 5 µm
- Prontosil C-4, 200×4, Korngröße 3 µm
- RPC-8 250×4, Korngröße 5 µm

Für semipreparative Trennungen:

- Nucleosil C-18 250×10, Korngröße 5 µm,
- MPLC: Merck RP-C8
- Schlauchpumpe,
- LKB-Fraktionssammler

Als Eluenten wurden entweder Gemische von Acetonitril/Wasser oder Methanol/Wasser verwendet, denen Phosphorsäure und Natriumperchlorat in einer Konzentration von je 30mM oder Trifluoroessigsäure in 0.1% (Vol) zugesetzt wurden. Die Detektion erfolgte bei 254 oder 220nm UV-spektrophotometrisch, durch Fluoreszenz von Tryptophan Ex 280nm, Em 350nm oder durch Lichtstreuung.

Zur Kationenaustauschchromatographie wurde Sephadex CM C-25 von Pharmacia verwendet.

Kernresonanzspektren wurden an folgenden Geräten aufgenommen:

- Bruker AM 360: ^1H , ^{13}C , DEPT,
- Bruker AC 250: ^1H , ^{13}C
- Bruker AC 200: ^1H , ^{13}C

Massenspektren wurden an folgenden Geräten durchgeführt:

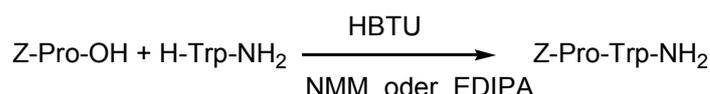
- Finnigan LQC: Electrospray-Ionisation (ESI, HPLC-MS),
- Bruker Biflex 3: Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation, Time of Flight Modus (MALDI-TOF).

IR-Spektren wurden an dem Gerät FTIR 1600 Perkin Elmer aufgenommen und sind in Wellenzahlen [cm^{-1}] angegeben. Die Banden sind als stark (s), mittel (m), und schwach (w) gekennzeichnet.

13.2. Vorschriften zur Synthese von Substraten für IgA-Protease

13.2.1. Milchsäurederivat **Boc-Pro-Arg-Pro-Pro-O[Ala]-Pro-Trp-NH₂ 19**

Z-Pro-Trp-NH₂ 7



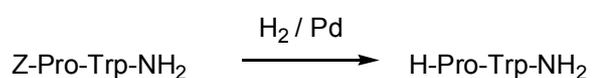
250 mg Z-Pro-OH (1.0 mMol, MW=249.5 g Mol⁻¹) und 240 mg H-Trp-NH₂ HCl (1.0 mMol, MW=239.5 g Mol⁻¹) wurden in 5 ml wasserfreiem Acetonitril suspendiert. Dann wurden 570 mg HBTU (1.5mMol, MW=379.3 g Mol⁻¹) zugeben und portionsweise 0.43 ml EDIPA (4.0 mMol, MW=101.5 g Mol⁻¹, d=0.92 g cm⁻³) oder entsprechende Menge NMM eingegossen. Die Reaktion verlief bei Raumtemperatur im Zeitraum von einer Stunde unter Stickstoff. Kurz nach dem Zugeben der Base wurde die Reaktionslösung klar, danach fiel das Produkt aus. Das ausgefallene Produkt wurde abfiltriert und mehrmals mit 1N HCl, gesättigter NaCl-Lösung und mit 5% NaHCO₃-Lösung gewaschen. Am Ende wurde noch kurz mit CH₃CN gewaschen. Der Rückstand wurde mit Essigester aufgenommen und mit wasserfreiem MgSO₄ getrocknet. Ausbeute: 85%.

HPLC: RP-C18, 5 μ m, 250 \times 4, Gradient von 5% Acetonitril auf 85% in 20 Minuten
 $R_v=16.4$ ml, flow=1 ml/min; UV (254nm), Fluoreszenz (Trp).

$^1\text{H-NMR}$ (MeOD): $\delta = 10.0-10.5$ (s, 2H, NH_2), 8.0-8.1 (s, 1H, NH Trp), 7.8 (s, 1H, Amid NH), 7.3-7.6 (m, 5H, arom.C, Trp); 5.3-5.6 (s, 2H, CH_2 Z); 5.0-5.2 (t, 1H, CH Trp), 4.5-4.7 (m, 1H, CH Pro), 3.4-3.9 (m, 4H, CH_2 δ Pro und CH_2 Trp); 1.8-2.3 (m, 4H, CH_2 β Pro und CH_2 γ Pro).

ESI MS m/z (%): 890.9 (100) $[\text{2M+Na}]^+$, 868.9 (4) $[\text{2M+H}]^+$, 457.2 (44) $[\text{M+Na}]^+$, 435.0 (3) $[\text{M+H}]^+$.

H-Pro-Trp-NH₂ 8



350 mg (0.8 mMol, $\text{MW}=434.5 \text{ g Mol}^{-1}$) Z-Pro-Trp-NH₂ wurden in 15 ml MeOH oder EtOH aufgenommen. Danach wurden 50 mg von 10% Palladium auf Aktivkohle zur Reaktionslösung zugegeben und die Reaktionslösung unter Wasserstoff über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde über Celite filtriert. Die Flüssigkeit wurde einrotiert. Ausbeute 95%.

HPLC: RP-C18, 5 μ m, 250 \times 4, Gradient von 10% Acetonitril auf 90% in 10 Minuten
 $R_v=8.5$ ml, flow=1 ml/min; UV (254nm), Fluoreszenz (Trp).

$^1\text{H NMR}$ (MeOD): $\delta = 6.9-7.65$ (m, 5H, arom.Trp), 4.5-4.65 (m, 1H, CH Trp), 3.4-3.6 (m, 1H, CH Pro), 3.0-3.3 (m, 2H, CH_2 Trp), 2.4-2.8 (m, CH_2 δ Pro), 1.75-1.95 und 1.1-1.55 (m, 4H, CH_2 β und γ Pro).

$^{13}\text{C-NMR}$ (MeOD): $\delta = 177.6, 176.7$ (CO), 137.9, 128.7, 124.4, 122.3, 119.7, 119.2, 112.1, 110.6 (arom.C Trp), 61.3 (CH Pro), 54.6 (CH Trp), 31.5 (CH_2 δ Pro), 28.9 (CH_2 β Pro), 26.7 (CH_2 γ Pro).

ESI MS m/z (%): 301.1 (100) $[\text{M+H}]^+$, 601. (15) $[\text{2M+H}]^+$, 622.9 (7) $[\text{2M+Na}]^+$.

HO[Ala]-Pro-Trp-NH₂ 16



300 mg H-Pro-Trp-NH₂ (1.0 mMol, MW=300.5 g Mol⁻¹), 120 mg Natriumlactat (1.1 mMol, MW=112 g Mol⁻¹), 490 mg BOP (1.1 mMol, MW=442.3 g Mol⁻¹) wurden in 7 ml eines Gemisches von CH₃CN/DMF (5:1 v:v) gelöst. Danach wurde 0.2 ml EDIPA (1.2 mMol, MW=129.25 g Mol⁻¹, d=0.74 g cm⁻³) zugegeben. Die Reaktion verlief bei RT, im Zeitraum von 2 Stunden unter Stickstoff. Die Reaktionslösung wurde einrotiert und der Rückstand zwischen Chloroform und Wasser verteilt. Das Produkt befand sich in Wasserphase. Die Wasserphase wurde abgetrennt und lyophilisiert. Es gab noch eine andere Aufarbeitungsmöglichkeit. Das Produkt wurde aus CH₂Cl₂ ausgefällt, der ausgefallene Rückstand wurde abgetrennt und mehrmals mit Methylenchlorid gewaschen. Ausbeute: 70%.

HPLC: RP-C18, 5µm, 250×4, Gradient von 10% Methanol auf 50% in 15 Minuten R_v=14.4 ml, flow=1 ml/min; UV (254nm), Lichtstreuung, Fluoreszenz (Trp).

¹H-NMR (D₂O): δ = 6.8-7.45 (m, 5H, arom.C, Trp), 4.3-4.4 (t, 1H, CH Trp), 4.0-4.1 (q, 1H, CH Milchsäure), 3.2-3.35 (m, 1H, CH Pro), 2.8-3.1 (d, 2H, CH₂ δ Pro), 2.2-2.4 (d, 2H, CH₂ Trp), 1.35-1.95 (m, 4H, CH₂ β, γ Pro), 0.6-0.7 (d, 3H, CH₃ Milchsäure).

¹H-NMR (MeOD): δ = 6.9-7.55 (m, 5H, arom.C Trp), 4.45-4.55 (m, 1H, CH Trp), 3.4-3.5 (q, 1H, CH Milchsäure), 3.0-3.3 (m, 4H, CH₂ Trp, CH₂ δ Pro), 1.95-2.35 (m, 1H, CH₂ β Pro), 1.55-1.85 (m, 3H, CH₂ β γ Pro), 0.8-0.9 (d, 3H, CH₃ Milchsäure).

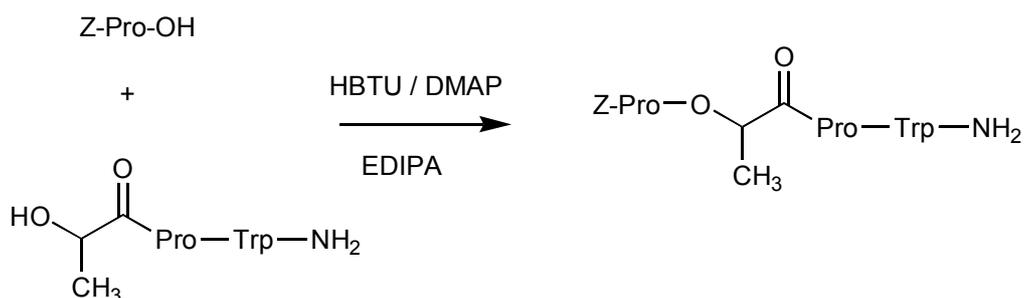
¹³C-NMR (MeOD): δ = 176.1, 161.4 (CO), 125.3, 124.6, 122.5, 119.8, 119.3, 118.7, 112.4, 110.8 (arom.C, Trp), 61.0 (CH, Trp), 55.6 (CH, Milchsäure), 42.5 (CH, Pro), 37.0 (CH₂ δ, Pro), 34.5 (CH₂, Trp), 31.0, (CH₂ β, Pro), 29.1 (CH₂ γ, Pro), 25.1 (CH₃, Milchsäure).

ESI MS m/z (%): 767.0 (100) [2M+Na]⁺, 783.1 (9.5) [2M+K]⁺, 395.3 (34) [M+Na]⁺, 411.4 (1) [M+K]⁺, 373.1 (1) [M+H]⁺.

Boc-Pro-O[Ala]-Pro-Trp-NH₂ 46

740 mg HO-[Ala]-Pro-Trp-NH₂ (2.0 mmol, MW=372.1 g Mol⁻¹), 560 mg Boc-Pro-OH (2.6mmol, MW=216 g Mol⁻¹), 1,29 g HBTU (3.4 mmol, MW=379.3 g Mol⁻¹), 1.9 ml E-DIPA (11 mmol, MW=129.3 g Mol⁻¹, d=074 g cm⁻³) und 240 mg DMAP (2mmol, MW=122.17 g Mol⁻¹) wurden in 12 ml trockenem DMF gelöst. Die Reaktion verlief in RT und nach 1.5 Stunden erreichte eine HPLC-Ausbeute von 95%. Reaktionslösung wurde einrotiert, das Öl wurde mit CH₃COOEt oder CH₂Cl₂ aufgenommen. Aus dieser Lösung fiel ein Rückstand aus. Der Rückstand wurde abgetrennt, die organische Phase wurde mit wäßrigen TEA-CH₃COOH Puffer (pH = 4,5) gewaschen, dann mit NaCl - Lösung und noch mal mit dem gleichen Puffer gewaschen. Das Produkt wurde aus MeOH/tBuOMe ausgefällt.

Z-Pro-O[Ala]-Pro-Trp-NH₂ 17



370 mg HO[Ala]-Pro-Trp-NH₂ (1.0 mmol, MW=372.1 g Mol⁻¹), 370 mg Z-Pro-OH (1.5 mmol, MW=249.5 g Mol⁻¹), 760 mg HBTU (2.0 mmol, MW=379.3 g Mol⁻¹) oder 530 mg BOP (1.2 mmol, MW=442.3 g Mol⁻¹) und 430 mg DMAP (3.5 mmol, MW=122.2 g Mol⁻¹) wurden in trockenem CH₃CN gelöst. Portionsweise wurde EDIPA zugegeben (4.0 mmol, MW=129.3 g Mol⁻¹, d=074 g cm⁻³). Reaktion verlief in RT im Zeitraum von 3 Stunden unter Stickstoff. Ausbeute: 90%. Die Reaktionslösung wurde einrotiert, in Essigester aufgenommen, die Lösung mit TEA-CH₃COOH-Puffer und gesättigter NaCl-Lösung mehrmals gewaschen. Bei schneller Arbeit ist auch Waschen mit kaltem 0.1 n HCl möglich. Anschliessend wurde die Lösung mit 5% NaHCO₃ - Lösung gewaschen und mit MgSO₄ getrocknet.

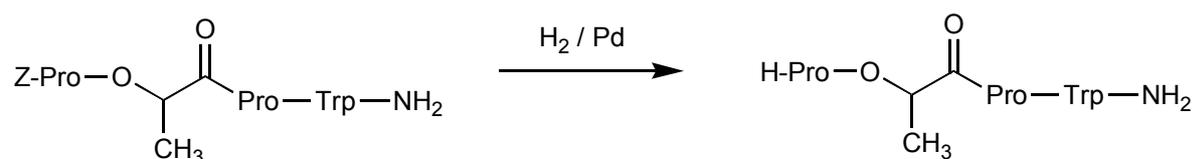
¹H-NMR (MeOD): δ = 7.0-8.2 (m, 9H, arom.C Trp und Z), 5.1-5.3 (t, 1H, CH Trp), 4.68-4.8 (q, 1H, CH Milchsäure), 4.45-4.55 (m, 4H, CH Pro1 und Pro2), 2.85-3.8 (m,

10H, CH₂ Z, CH₂ δ Pro1 und Pro2, CH₂ β Pro1 und Pro2), 1.9-2.4 (m, 4H, CH₂ γ Pro1 und 2), 1.0-1.7 (d, 3H, CH₃ Milchsäure).

¹³C-NMR (MeOD): δ = 186.2, 173.4, 172.0, 171.0 (CO); 155.7(CO, Urethan), 137.1, 136.2, 128, 128.5, 128.0, 127.7, 127.6, 1234.6, 121.0, 118.6, 118.4, 11.4, 110.2 (arom.C, Trp und Z), 68.7 (CH Pro2), 66.32 (CH Pro1), 66.2 (CH, Milchsäure), 60.0 (CH, Trp), 58.7 (CH₂, Z); 58.1 (CH₂ δ, Pro2), 53.3 (CH₂ δ, Pro1); 49.5 (CH₂ β, Pro2), 46.7 (CH₂, Trp), 28.8 (CH₂ β, Pro1), 27.4 (CH₂ γ, Pro1), 24.6 (CH₃, Milchsäure), 15.9 (CH₂ γ, Pro2).

ESI MS m/z (%): 604.0 (100) [M+H]⁺, 626.2 (68) [M+Na]⁺, 1206.8 (47) [2M+H]⁺, 1228.7 (39) [2M+Na]⁺.

H-Pro-O[Ala]-Pro-Trp-NH₂ 18



540 mg H-Pro-O[Ala]-Pro-Trp-NH₂ (0.9 mMol, MW=603.0 g Mol⁻¹) wurden in 15 ml absolutem MeOH gelöst. Danach wurde 50 mg Palladium 10% auf Aktivkohle als Katalysator zugegeben. Die Reaktion verlief unter Wasserstoff, bei RT über Nacht. Die Reaktionslösung wurde über Celite filtriert, das Lösungsmittel wurde einrotiert.

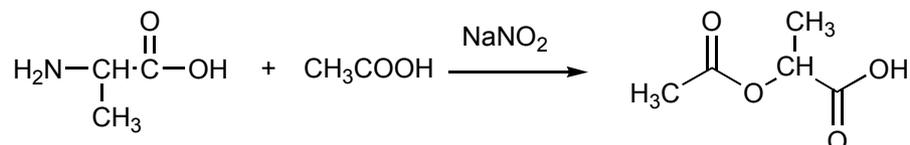
¹H-NMR (MeOD): δ = 6.7-7.6 (m, 5H, arom.C Trp), 4.45-4.55 (m, 1H, CH Trp), 4.1-4.25 (q, 1H, CH Milchsäure), 3.8-4.0 (m, 2H, CH Pro1 und CH Pro2), 3.4-3.6 (m, 4H, CH₂ δ, Pro1 und Pro2), 2.6-3.1 (m, 2H, CH₂ Trp), 1.65-2.2 (m, 4H, CH₂ β Pro1 und Pro2), 1.05-1.45 (m, 4H, CH₂ γ Pro1 und Pro2), 0.9-0.95 (d, 3H, CH₃ Milchsäure).

¹³C-NMR (MeOD): δ = 187.3, 188.3, 173.5, 175.5 (CO), 142.0, 137.0, 124.3, 122.1, 119.5, 118.7, 112.0, 107.7 (arom.C, Trp), 66.5 (CH, Pro2), 61.9 (CH, Trp), 60.1 (CH, Milchsäure), 54.6 (CH, Pro1), 52.8 (CH₂ δ, Pro2), 52.2(CH₂ β, Pro2), 39.5 (CH₂ δ, Pro1), 29.8 (CH₂ β, Pro1), 27.3 (CH₂ γ, Pro1), 25.5 (CH₃, Milchsäure), 19.2 (CH₂ γ, Pro2).

b)

Von Boc-Pro-O[Ala]-Pro-Trp-NH₂ wurde auf die übliche Weise mit TFA / CH₂Cl₂ / Et₃SiH die Boc-Gruppe abgespaltet.

AcO-[Ala]-OH^[175] 13



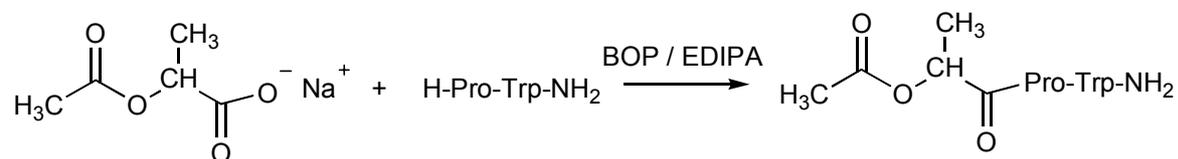
4.5 g L-Alanin (50 mMol, MW=89.1 g Mol⁻¹) wurde in einer Mischung von 200 ml Essigsäure und 15 ml bidestillierten Wasser bei 50°C gelöst. Danach wurde die Reaktionslösung in einem Methanol-Eisbad bis -5°C gekühlt. Unter Kühlung und Stickstoffleitung wurde 20 g NaNO₂ (0.3 Mol, 69.0 g Mol⁻¹) portionsweise zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 1h weiter gekühlt, dann verlief die Reaktion über 4h bei RT. Das Produkt wurde am Kugelrohr destilliert (0,2 Tor/95-105°C).

¹H-NMR (MeOD): δ = 5.1-5.2 (q, 1H, CH Milchsäure), 2.2 (s, 3H, CH₃ Acetyl), 1.55-1.52 (d, 3H, CH₃ Milchsäure).

¹³C (CDCl₃): δ = 176.5, 170.6 (CO), 68.1 (CH, Milchsäure), 20.43 (CH₃, Milchsäure), 14.4 (CH₃, Acetyl).

Drehwert [α]²⁵ = -45.1 (c 2, Benzen), Literaturdaten^[184] für O-Acetyl-D-Milchsäure: [α]²⁵ = +46.1 (c 2, Benzen).

AcO-[Ala]-Pro-Trp-NH₂ 14



600 mg H-Pro-Trp-NH₂ (2 mMol, MW=300.5 g Mol⁻¹), 340 mg acetyliertes Natriumlactat (2 mMol, MW=170.5 g Mol⁻¹), 1.33 g BOP (3 mMol, MW=442.3 g Mol⁻¹) und 0.87 ml EDIPA (5 mMol, MW=129.3 g Mol⁻¹, d=0.74 g cm⁻³) wurden in 10 ml CH₃CN/DMF

(10:1, v:v) gelöst, Die Reaktion verlief bei 50°C im Zeitraum von 1 Stunde mit 90% Ausbeute.

$^1\text{H-NMR}$ (MeOD): $\delta = 7.0-7.6$ (m, 5H, arom.C, Trp), 4.95-5.1 (q, 1H, CH Milchsäure), 4.59-4.65 (t, 1H, CH Trp), 4.32-4.37 (m, 1H, CH Pro), 3.2-3.4 (m, 2H, CH_2 δ Pro), 2.1-2.2 (d, 3H, CH_3 Acetyl), 1.8-1.95 (m, 2H, CH_2 β Pro), 1.25-1.4 (m, 2H, CH_2 γ Pro), 1.15-1.25 (m, 3H, CH_3 Milchsäure).

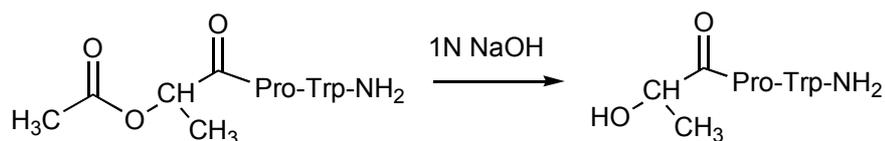
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 6.3-7.4$ (m, 5H, arom.C Trp), 4.6-4.8 (m, 1h, CH Trp), 4.2-4.35 (q, 1H, CH Milchsäure), 3.4-3.55 (m, 1H, CH Pro), 2.9-3.2 (m, 2H, CH_2 δ Pro), 1.7-2.2 (m, CH_2 β Pro, s, CH_3 Acetyl, insgesamt 5H), 1.1-1.4 (m, CH_2 γ Pro), 0.55-0.7 (d, 3H, CH_3 Milchsäure).

$^{13}\text{C-NMR}$ (MeOD): $\delta = 176.6, 173.8, 172.5$ (CO), 138.2, 129.2, 124.9, 122.7, 120.1, 119.4, 112.6, 110.7 (arom.C Trp), 67.1 (CH, Milchsäure), 62.3 (CH, Trp), 55.3 (CH, Pro), 37.2 (CH_2 δ Pro), 30.2 (CH_2 Trp), 28.3 (CH_2 β , Pro), 26.1 (CH_2 γ Pro), 20.6 (CH_3 , Acetyl), 16.3 (CH_3 , Milchsäure).

ESI MS m/z (%): 437.2 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 415.0 (7) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 850.7 (81) $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

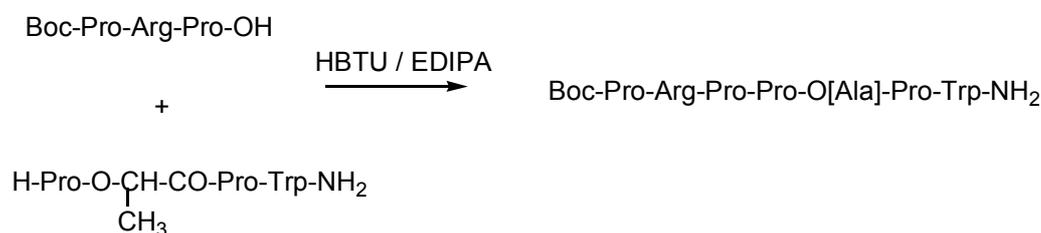
MALDI TOF MS (pos, CCA1): 436.3 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 156.0 (50) $[\text{HOBt}+\text{H}]^+$.

HO-[Ala]-Pro-Trp-NH₂ 16



In 5 ml Methanol wurden 750 mg AcO-[Ala]-Pro-Trp-NH₂ (1.8 mMol, MW=415.0 g Mol⁻¹) gelöst. Dazu wurde 3.5 ml 1N NaOH Lösung zugegeben. Die Reaktion verlief unter Eiskühlung im Zeitraum von 2-3 Stunden. Die Reaktionslösung wurde mit Diethylether gewaschen und dann wurde die Wasserphase bis zu pH = 4 gesäuert. Anschliessend wurde das Produkt mit Essigester extrahiert. Ausbeute 70%.

Boc-Pro-Arg-Pro-Pro-O[Ala]-Pro-Trp-NH₂ 19



81 mg H-Pro-O[Ala]-Pro-Trp-NH₂ (0,18 mMol, MW=451.2 g Mol⁻¹), 100 mg Boc-Pro-Arg-Pro-OH (0.22 mMol, MW=468.2 g Mol⁻¹), 270 mg HBTU (0.7 mMol, MW=379.3 g Mol⁻¹), 0.22 ml EDIPA (1.26 mMol, MW=129.3 g Mol⁻¹, d=0.74 g cm⁻³) wurden in 5 ml trockenem DMF gelöst. Zur Reaktion wurde zusätzlich ein Molekularsieb 4Å zugeben, um das sich während der Reaktion bildende Wasser aufzufangen. Ausbeute: 60-80%. Die Reaktionslösung wurde eingeeengt, der Rückstand wurde zwischen Chloroform und wässrigen Puffer (Puffer TEA-CH₃COOH pH = 7.4) verteilt (das Produkt blieb in der Wasserphase). Das Wasser wurde entfernt, das Produkt aus MeOH/tBuOMe mehrmals ausgefällt. Nach dieser Aufarbeitung musste das Produkt noch chromatographisch gereinigt werden. Nacheinander wurden zwei Trennungen gemacht:

1. Mitteldruckchromatographie: RPC8, Gradient: 50→90% MeOH
2. Präparative HPLC: RPC18, Gradient: 20→50% CH₃CN in 20 min, mit flüchtigen Puffer statt TFA.

Ausbeute: 40%.

HPLC: RP-C18, 5µm, 250×4, Gradient von 50% Methanol auf 90% in 10 Minuten R_v=9.0 ml, flow=1 ml/min; UV (220, 254nm), Fluoreszenz (Trp), Lichtstreuung.

HPLC: RP-C18, 5µm, 250×4, Gradient von 10% Methanol auf 90% in 15 Minuten R_v=11.2 ml, flow=1 ml/min; UV (220, 254nm), Fluoreszenz (Trp), Lichtstreuung.

¹H-NMR (MeOD): δ = 6.8-7.6 (m, 5H, arom.Trp), 4.9-5.1 (q, CH, Milchsäure), 4.1-4.7 (m, 6H, CH von Pro1, 2, 3, 4, CH Trp, CH Arg), 3.0-3.8 (m, 10H, CH₂ δ Pro, CH₂ δ Arg, CH₂ Trp), 1.7-2.3 (m, 14H, CH₂ β Pro, CH₂ β Arg, CH₂ γ Pro), 1.5-1.7 (m, 2H, CH₂ γ Arg), 1.3-1.5 (d, 9H, CH₃ Boc), 1.0-1.1 (d, 3H, CH₃ Milchsäure).

^{13}C -NMR (MeOD): $\delta = 176.7, 175.5, 173.9, 173.3, 173.0, 172.9, 172.2, 171.7$ (CO);
 159.0 (gua.C, Arg), 138.3, 129.3, 125.1, 122.9, 120.3, 119.6, 112.7, 110.8 (arom.C,
 Trp), 81.7 (tert.C, Boc), 70.8, 70.5, 62.4, 61.7, 61.2, 60.5, 60.0 (CH, Pro1, Arg, Pro2,
 Pro3, Milchsäure, Pro4, Trp), 56.0, 55.4, 53.2, 52.1, 42.4, 32.7, 31.6, 31.1, 30.2,
 29.7, 28.6, 26.2, 26.1, 22.8, 17.4, 16.7, 16.4 (CH_2 , δ , β , γ von Pro1, 2, 3, 4, Arg und
 Trp), 29.0 (CH_3 Boc), 24.9 (CH_3 , Milchsäure).

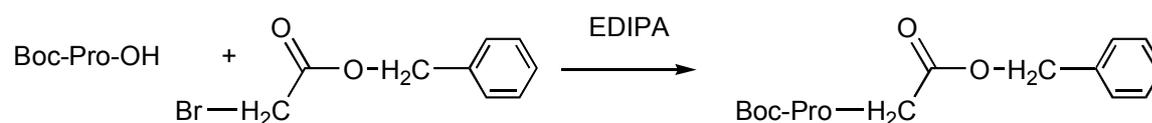
ESI MS m/z (%): 920.4 (100) $[\text{m}+\text{H}]^+$, 1017.4 (11) $[\text{M}+\text{Pro}+\text{H}]^+$.

MALDI TOF MS m/z (%), pos, refl, CCA1: 920.9 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 959.9 (19) $[\text{M}+\text{K}]^+$,
 1018.1 (14) $[\text{M}+\text{Pro}+\text{H}]^+$.

13.2.2. Glykolsäurederivat Boc-Pro-Arg-Pro-Pro-O[Gly]-ProTrp-NH₂ 12

Die Synthese von H-Pro-Trp-NH₂ ist gleich der des Milchsäurederivates.

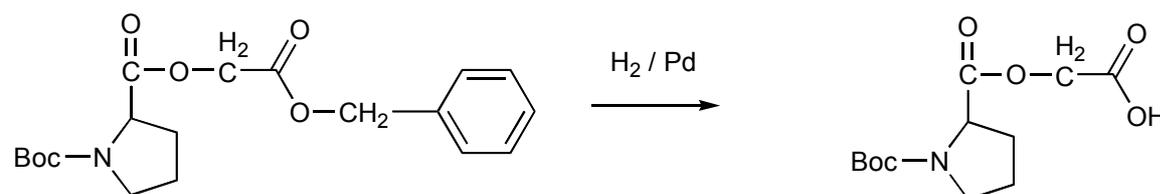
Boc-Pro-O[Gly]-OBzl 3



230 mg Benzylbromoacetat (1.0 mMol, MW=229 g Mol⁻¹) und 216 mg Boc-Pro-OH (1.0 mMol, MW=216 g Mol⁻¹) wurden in 5 ml THF gelöst. Danach wurde 0.2 ml EDI-PA (1.2 mMol, MW=129.3 g Mol⁻¹, d=0.74 g cm⁻³) zugeben und im RT unter Stickstoff im Zeitraum von 1-2 Stunden gerührt. Das Produkt fiel aus der Reaktionslösung aus, wurde abgetrennt und getrocknet (mit Hochvakuumpumpe - um Überschuß von EDI-PA zu entfernen).

ESI MS m/z (%): 386.0 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 264.1 (7) $[\text{M}-\text{Boc}+\text{H}]^+$.

Boc-Pro-O[Gly]-OH 4



220 mg Boc-Pro-O[Gly]-OBzl (0.55 mMol, MW=363 g Mol⁻¹) wurden in 15 ml Isopropanol gelöst. Anschliessend wurden 25 mg von 10% Pd auf Aktivkohle zugegeben. Die Reaktion verlief über Nacht bei RT unter Wasserstoff.

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 4.2-4.4 (m, 1H, CH Pro), 4.55-4.61 (d, 2H, CH₂, Glycolsäure), 3.25-3.55 (m, 2H, CH₂ δ Pro), 2.0-2.2 (m, 2H, CH₂ β Pro), 1.8-1.95 (m, 2H, CH₂ γ Pro).

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 4.58-4.68 (s, 1H, CH₂ Glycolsäure), 4.28-4.43 (m, 1H, CH Pro), 3.33-3.63 (m, CH₂ δ Pro), 1.73-2.33 (m, 4H, CH₂ β und γ Pro), 1.33-1.53 (d, 9H, CH₃ Boc).

¹³C-NMR (250Mz, CDCl₃): δ = 197.5 (CO, Glycolsäure), 173.0, 174.6 (CO, Säure, Pro), 157.4 (CO, Urethan), 83.2 (tert.C, Boc), 61.4, 62.9 (CH, Pro), 48.9 (CH₂, Glycolsäure), 33.2, 32.7 (CH₂ δ, Pro), 32.3 (CH₃, Boc), 30.7, 26.7 (CH₂ β, Pro), 24.2, 23.4 (CH₂ γ, Pro).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 172.1, 171.1 (CO, Säure), 153.8 (CO, Urethan), 81.0 (tert.C, Boc), 60.77 (CH, Pro), 46.8 (CH₂, Glycolsäure), 30.8 (CH₂ δ, Pro), 29.9 (CH₂ β, Pro), 28.5 (CH₃, Boc), 24.4 (CH₂ γ, Pro).

Boc-Pro-O[Gly]-Pro-Trp-NH₂ 9



230 mg Boc-Pro-O[Gly]-OH (1.0 mMol, MW=229 g Mol⁻¹) und 420 mg HBTU (1.1 mMol, MW=379.3 g Mol⁻¹) wurden in 5 ml Acetonitril gelöst, dann 300 mg H-Pro-Trp-NH₂ (1.0 mMol, MW=300.2 g Mol⁻¹) zugegeben und anschliessend 0.7 ml EDIPA (4.0 mMol, MW=129.3 g Mol⁻¹, d=0.74 g cm⁻³) portionsweise zugegeben. Statt EDIPA kann man auch NMM benutzen. Die Reaktionslösung wurde bei RT und unter Stickstoff über Nacht gerührt. In der Reaktionslösung fiel ein Rückstand aus (HOBT). Der Rückstand wurde abgetrennt, Flüssigkeit wurde einrotiert. Der Rückstand wurde mit Methylenchlorid oder CH₃COOEt aufgenommen und mehrmals mit gepufferter Wasserlösung gewaschen.

¹H-NMR (MeOD): δ = 6.6-7.8 (m, 5H, arom.C Trp), 4.1-5.0 (m, 5H, CH Pro1, CH Pro2, CH Trp, CH₂ Glycolsäure), 3.8-4.0 (-, 2H, CH₂ Trp), 3.2-3.8 (m, 4H, CH₂ δ Pro),

2.7-3.1 (m, 2H, CH₂ β Pro1), 1.8-2.5 (m, 6H, CH₂ β Pro2, CH₂ γ Pro1, CH₂ γ Pro2), 1.5-1.8 (d, 9H, CH₃ Boc).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 175.0; 173.0; 171.5 (CO, Amid), 167.2 (CO, Ester), 155.2 (CO, Urethan), 136.5; 128.0; 124.8; 122.1; 119.6; 118.2, 112.6; 108.7 (arom. C, Trp), 80.4 (tert.C, Boc), 60.9; 59.2 (CH, Pro), 52.5 (CH, Trp), 47.0, 47.2 (CH₂ δ, Pro), 38.9 (CH₂, Glykolsäure), 30.3, 30.1 (CH₂ β, Pro), 30.2 (CH₃, Boc), 24.6, 23.8, 23.4 (CH₂ Trp, CH₂ γ, Pro).

¹³C-NMR (MeOD): δ = 174.1; 172.7; 170.6 (CO, Amid), 167.4 (CO, Ester), 155.3 (CO, Urethan), 135.6; 127.7; 124.6; 121.2; 118.7; 117.3, 111.7; 107.8 (arom. C, Trp), 80.0, 79.5 (tert.C, Boc), 59.8 (CH, Pro1), 58.3 (CH, Pro2), 51.6 (CH, Trp), 46.1 (CH₂, Glykolsäure), 38.9 (CH₂ δ, Pro2), 30.2 (CH₂, δ Pro1), 27.9 (CH₃, Boc), 25.6 (CH₂ Trp), 24.1, 23.9 (CH₂ β, Pro1 und Pro2), 21.1 (CH₂ γ, Pro1).

ESI MS, m/z (%): 578.1 (100) [M+H]⁺, 456.1 (66) [M-Boc+H]⁺, 555.9 (14) [M+H]⁺, 1110.8 (34) [2M+H]⁺, 1132.8 (21) [2M+Na]⁺.

H-Pro-O[Gly]-Pro-Trp-NH₂ 10



560 mg Glykolsäurederivat (1.0 mMol, MW=557.1 g Mol⁻¹) wurden in 20 ml Methylchlorid gelöst. Dann wurde 0.5 ml Triethylsilan (3.0 mMol, MW=118.3 g Mol⁻¹, d=0.75 g cm⁻³) und 10 ml Trifluoroessigsäure nacheinander zugegeben. Reaktion verlief im Zeitraum von 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Stickstoff. Das Lösungsmittelgemisch wurde entfernt.

¹H-NMR (DMSO d₆): δ = 6.8-8.1 (m, 5H, arom.C Trp), 4.6-5.2 (dd, 2H, CH₂ Glykolsäure), 3.0-4.6 (m, 10H, CH und CH₂ δ β Pro), 2.8-3.0 (m, 1H, CH Trp), 2.0-2.4 (m, 2H, CH₂ β Pro), 1.5-2.0 (m, 4H, CH₂ γ Pro).

¹³C-NMR (DMSO d₆): δ = 165.2, 169.2, 171.2, 173.7 (CO, Amid und Ester), 110.5, 110.7, 111.6, 116.5, 118.7, 121.14, 123.7, 127.7, 136.38 (arom.C Trp), 63.2 (CH, Pro), 60.5 (CH, Pro), 58.8 (CH, Trp), 53.8 (CH₂, Glykolsäure), 45.83 (CH₂ δ, Pro), 28.46 (CH₂ β, Pro), 28.32 46 (CH₂ β, Pro), 27.36 (CH₂, Trp), 23.2 (CH₂ γ, Pro1), 24.34 (CH₂ γ, Pro2).

^{13}C -NMR (MeOD): $\delta = 173.7, 171.2, 169.2, 165.2$ (CO), 136.4, 127.7, 123.7, 121.1, 118.7, 118.5, 11.6, 110.7 (arom.C Trp), 63.2 (CH Pro1), 60.5 (CH Pro2), 58.8 (CH Trp), 53.7 (CH₂ Glycolsäure), 45.8 (CH₂ δ Pro1), 29.1 (CH₂ δ Pro2), 28.5 (CH₂ β Pro1), 28.3 (CH₂ β Pro2), 27.4 (CH₂ Trp), 24.3 (CH₂ γ Pro1), 23.2 (CH₂ γ Pro2).

ESI MS, m/z (%): 456.2 (100) [M+H]⁺, 478.2 (38) [M+Na]⁺, 911.0 (45) [2M+H]⁺, 932.9 (22) [2M+Na]⁺.

Boc-Pro-Arg-Pro-Pro-O[Gly]-Pro-Trp-NH₂ 12

H-Pro-O-CH₂-CO-Pro-Trp-NH₂

+



Boc-Pro-Arg-Pro-Pro-O-CH₂-CO-Pro-Trp-NH₂

Boc-Pro-Arg-Pro-OH

460 mg Glykolsäurederivat (1.0 mMol, MW=455.2 g Mol⁻¹), 560 mg Boc-Pro-Arg-Pro-OH (1.2 mMol, MW=468.2 g Mol⁻¹) und 570 mg HBTU (1.5 mMol, MW=379.3 g Mol⁻¹) wurden erstmal einzeln in wasserfreiem DMF gelöst (insgesamt 10 ml). Die Lösungen wurden dann zusammengemischt. Erst danach wurde 0.53 ml TEA (4.0 mMol, MW=101.2 g Mol⁻¹, d=0.76 g cm⁻³) dazugegeben. Die Reaktion verlief bei RT im Zeitraum von 2 Stunden. Die HPLC-Ausbeute betrug 80%. Das Lösungsmittel wurde entfernt, der Rückstand mit Chloroform aufgenommen und mit Triethylamin-Essigsäure Puffer (pH=4,5) gewaschen. Das Produkt wurde aus EtOH/tBuOMe oder aus kaltem CH₂Cl₂/Et₂O mehrmals ausgefällt. Ausbeute: 60%. Das erhaltene Produkt benötigte noch weitere Reinigung: Kationenaustauschchromatographie und eine von zwei möglichen MPLC auf RPC8 Säule.

1. Kationenaustauschchromatographie, Sephadex CM C-25, Säule 2 × 20 cm, Eluent: 30% MeOH in NH₄OAc-Pufferlösung, pH = 5,5, Gradient: 20mM→200mM→500mM, Flussrate: 2ml/min.
2. Mitteldrucksäule RPC8, 60% MeOH isokratisch, 20 mM CH₃COONH₄ Puffer, pH=7,0; Flussrate: 2,5 ml/min.
3. Mitteldrucksäule RPC8, Gradient 45→70% MeOH, 20mM CH₃COONH₄, Flussrate 2ml/min

Nach der Entfernung des MeOH wurde die Wasserlösung gefriergetrocknet. Das Produkt unter Stickstoff- oder Argonatmosphäre und bei -18°C oder in flüssigem Stickstoff aufbewahren.

In der Luftatmosphäre erhält man mehrere Zersetzungsprodukte, hauptsächlich aber einen Peak, der kürzere Retentionszeit (um 0,6 min) als das gewünschte Produkt hatte:

1. Depsipeptid: HPLC: RP-C18, 5µm, 250×4, Gradient von 10% Acetonitril auf 90% in 20 Minuten $R_v=14.0$ ml, flow=1 ml/min; UV (220, 254nm), Fluoreszenz (Trp), Lichtstreuung.
2. Zersetzungsprodukt: HPLC: RP-C18, 5µm, 250×4, Gradient von 10% Acetonitril auf 90% in 20 Minuten $R_v=13.4$ ml, flow=1 ml/min; UV (220, 254nm), Fluoreszenz (Trp), Lichtstreuung.

Das Zersetzungsprodukt entstand in der Luftatmosphäre, beim Aufbewahren des Depsipeptids bei 4°C. Nach zwei Wochen erhielt man etwa 20% Zersetzungsprodukt.

$^1\text{H-NMR}$ (MeOD): δ = 6.8-7.6 (m, 5H, arom.C Trp), 4.3-4.75 (m, 6H, CH Pro, CH Trp, CH Arg), 4.0-4.25 (dd, 2H, CH_2 Glycolsäure), 2.9-3.8 (m, 10H, CH_2 Pro, Arg, Trp), 1.5-2.2 (m, 15H, CH_2 Pro, CH_2 Arg), 1.25-1.4 (d, 9H, CH_3 Boc).

$^{13}\text{C-NMR}$ (MeOD): δ = 176.8 (CO, Ester), 175.8, 175.4, 174.0, 173.3, 172.8, 172.1, 168.9 (CO, Amid), 159.0 (gua.C, Arg), 156.6 (CO, Urethan), 138.3, 129.2, 124.9, 122.8, 120.2, 119.5, 112.8, 111.3 (C arom., Trp), 81.6 (tert. C, Boc), 63.4, 62.6, 61.6, 60.7, 60.6, 60.1 (CH Pro 1, CH Pro 2, CH Pro 3, CH Pro 4, CH Trp, CH Arg), 55.6 (CH_2 , Glycolsäure), 55.2, 53.1 (CH_2 δ , Pro 2, Pro 3), 52.2 (CH_2 δ , Arg), 47.5 (CH_2 δ , Pro1), 42.4 (CH_2 β , Arg), 33.4, 32.7, 31.6 (CH_2 β , Pro 2, Pro 3, CH_2 δ Pro4), 31.1 (CH_2 γ , Arg), 30.7 (CH_2 β , Pro1), 30.1 (CH_3 , Boc), 29.6 (CH_2 , Trp), 28.7, 28.3 (CH_2 γ , Pro1, Pro2), 24.9, 23.3, 22.9 (CH_2 β Pro4, CH_2 γ , Pro3, Pro4).

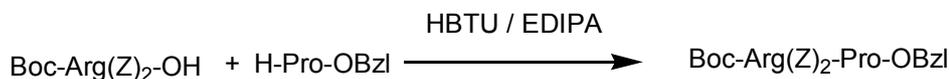
ESI MS m/z (%): 906.5 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1003.4 (5) $[\text{M}+\text{Pro}+\text{H}]^+$, 809.5 (8) $[\text{M}-\text{Pro}+\text{H}]^+$.

IR (KBr): 3423.3 (s) [ν , Amid NH], 2880 (w) [ν , -O- CH_2 -O-], 1643.9 (s) [δ , Amidbande I, ν C=O], 1562.5 (w) [δ , arom. C-H], 1403.5 (m) [δ , -C(CH_3)], 1166.0 (m) [δ , -C-O-, δ , -COOC- Ester, ν C=O].

13.2.3. Andere Acylendonoren 11, 26, 27, 28, 31

Boc-Pro-Arg-Pro-OH 11

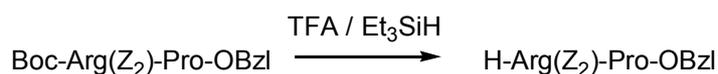
Boc-Arg(Z)₂-Pro-OBzl 22



200 mg Prolinbenzylester (1.0 mMol, MW=205 g Mol⁻¹), 600 mg Argininderivat (1.1 mMol, MW=542.2 g Mol⁻¹) und 570 mg HBTU (1.5 mMol, MW=379.3 g Mol⁻¹) wurden in 7 ml trockenem Acetonitril gelöst, danach wurde 0.7 ml EDIPA (4.0 mMol, MW=129.3 g Mol⁻¹, d=0.74 g cm⁻³) zugegeben. Die Reaktion verlief bei RT im Zeitraum von 2 Stunden. Die Reaktionlösung wurde mit Essigester aufgenommen und 2 mal mit NaCl-Lösung, 2 mal mit 1N HCl Lösung und 2 mal mit 5% NaHCO₃ Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet. Ausbeute: 87%.

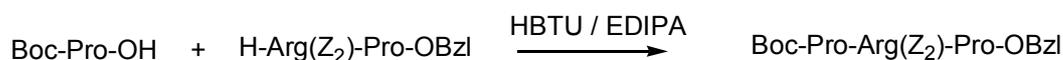
MALDI TOF MS m/z (%), pos, refl. CCA1: 730.7 (100) [M+H]⁺, 752 (9) [M+Na]⁺, 768 (3) [M+K]⁺, 630.6 (14) [M-Boc+H]⁺, 596.6 (54) [M-Z+H]⁺, 497.7 (14) [M-Z-Boc+H]⁺.

H-Arg(Z)₂-Pro-OBzl 23



Zur Lösung von 73 mg Boc-Arg(Z)₂-Pro-OBzl (0.1 mmol, MW=729.0 g Mol⁻¹) in 2 ml wasserfreien Methylenchlorid wurde 50 µl Et₃SiH (0.3 mMol, MW=118.3 g Mol⁻¹, d=0.75 g cm⁻³) zugegeben. Danach wurde noch 1 ml TFA zugegeben (das Volumenverhältniss CH₂Cl₂ zu TFA soll wie 2:1 sein). Reaktion verlief bei RT, unter Stickstoff im Zeitraum von 1 Stunde. Anschliessend wurde das Lösungsmittel entfernt. Ausbeute: 95%.

Boc-Pro-Arg(Z)₂-Pro-OBzl **24**



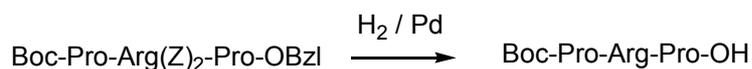
1.0 g H-Arg(Z)₂-Pro-OBzl (1.6 mMol, MW=628.0 g Mol⁻¹) wurde in 5 ml trockenem Acetonitril suspendiert. Dazu wurden 380 mg Boc-Pro-OH (1.76 mMol, MW=216 g Mol⁻¹), 570 mg HBTU (2.4 mMol, MW=379.3 g Mol⁻¹) und 1.12 ml EDIPA (6.4 mMol, MW=129.3 g Mol⁻¹, d=0.74 g cm⁻³) zugegeben. Nach 1 Stunde wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand mit Essigester aufgenommen und mit gesättigter 0,5 n HCl, NaCl-Lösung, 5% NaHCO₃ gewaschen. Anschliessend wurde die Lösung mit MgSO₄ getrocknet.

Man erhält fast immer auch ein Nebenprodukt, ein Peptid ohne Arginin (die Kupplung mit Arginin ist nicht vollständig).

¹³C-NMR (DMSO, d₆): δ = 171.0, 171.7, 164.0, 160.5 (CO), 156.0, (gua.C, Arg), 128.0-128.0 (arom.C Z und OBzl, mehrere Signale); 88.5 (tert.C, Boc), 69.0, 67.2, 66.9 (CH₂, Z und OBzl), 60.5 (CH Arg), 59.0 (CH Pro1), 55.7 (CH Pro2), 47.1, 43.7, 30.0, 29.0, 28.9, 21.1, 14.3 (CH₂ δ Pro, CH₂ β Pro, CH₂ γ Pro, CH₂ β Arg), 38.7 (CH₂ δ Arg), 28.5 (CH₃ Boc), 25.0 (CH₂ γ Arg).

MALDI-TOF MS (pos, refl, CCA als Matrix, Uis1=19kV): m/z (%): 827,5 (100) [M+H]⁺, 849,5 (88) [M+Na]⁺, 865,5 (46) [M+K]⁺.

Boc-Pro-Arg-Pro-OH **11**



1.19 g vom Peptid **24** (1.4 mMol, MW=826.5 g Mol⁻¹) wurde in 30 ml Isopropanol aufgenommen (falls in der Lösung Reste von EDIPA vorhanden waren, wurden ein paar Tropfen Essigsäure zugegeben). Dazu wurden 100 mg 10% Pd/C zugegeben. Die Reaktion verlief bei RT, über Nacht, unter Wasserstoff. Die Reaktionslösung wurde

über das Celite filtriert. Das Lösungsmittel wurde entfernt. Das Produkt wurde aus Chloroform/tBuOMe ausgefällt.

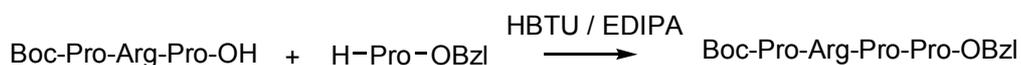
HPLC: RP-C18, 5 μ m, 250 \times 4, Gradient von 10% Acetonitril auf 90% in 10 Minuten $R_v=9.2$ ml, flow=1 ml/min; UV (220 nm), Lichtstreuung.

$^1\text{H-NMR}$ (MeOD): δ = 4.5-4.65 (m, 1H, CH Arg), 4.1-4.3 (m, 2H, CH Pro1 und Pro2), 3.5-3.7 (m, 2H, CH₂ δ Pro1), 3.3-3.5 (m, 2H, CH₂ δ Pro2), 3.0-3.15 (m, 2H, CH₂ δ Arg), 2.0-2.2 (m, 2H, CH₂ β Pro), 1.7-2.95 (m, 7H, CH₂ β Pro und CH₂ γ Pro), 1.5-1.7 (m, 3H, CH₂ β Arg, CH₂ γ Pro), 1.2-1.4 (d, 9H, CH₃ Boc), 1.0-1.1 (d, 2H, CH₂ γ Arg).

$^{13}\text{C-NMR}$ (MeOD): δ = 81.8 (tert.C, Boc), 61.4, 52.1, 47.4 (CH, Pro1 und Pro2, CH Arg), 42.4 (CH₂ δ Arg), 39.2 (CH₂ δ Pro1), 32.7 (CH₂, δ Pro2), 31.7 (CH₂, β Pro1), 30.6 (CH₂, β Pro2), 30.0 (CH₂, β Arg), 29.0 (CH₃, Boc), 26.2 (CH₂ γ Pro), 24.9 (CH₂ γ Arg), 20.9 (CH₂ γ Pro).

ESI MS m/z (%): 469.2 (100) [M+H]⁺, 369.2 (26) [M-Boc+H]⁺, 491.2 (6) [M+Na]⁺, 937.1 (11) [2M+H]⁺, 959.1 (9) [2M+Na]⁺.

Boc-Pro-Arg-Pro-Pro-OBzl 28



190 mg Boc-Pro-Arg-Pro-OH (0,4 mmol, MW=468.2 g Mol⁻¹), 90 mg H-Pro-OBzl (0.44 mMol, MW=205.2 g Mol⁻¹), 560 mg HBTU (0.6 mMol, MW=379.3 g Mol⁻¹), 0.28 ml EDIPA (1.6 mMol, MW=129.3 g Mol⁻¹, d=0.74 g cm⁻³) wurden in 7 ml DMF gelöst. Die Reaktion verlief bei RT im Zeitraum von 2 Stunden quantitativ im HPLC. Das Lösungsmittel wurde eingeeengt, der Rückstand wurde mit Essigester oder Methylenchlorid aufgenommen. Die Lösung wurde schnell mit kaltem 0,1 n HCl, gesättigten NaCl oder NaBr Lösung, 5% NaHCO₃ gewaschen und anschliessend mit Na₂SO₄ getrocknet. Das Produkt wurde aus Methylenchlorid / tBuOMe ausgefällt.

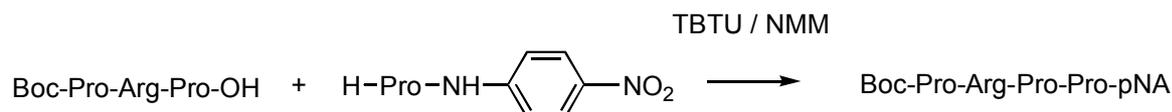
HPLC: RP-C18, 5 μ m, 250 \times 4, Gradient von 10% Acetonitril auf 90% in 10 Minuten $R_v=12.4$ ml, flow=1 ml/min; UV (220, 254nm), Lichtstreuung.

$^1\text{H-NMR}$ (MeOD): δ = 7.2-7.4 (s, 5H, arom.C, OBzl), 4.95-5.2 (q, 2H, CH₂ Z), 4.5-4.7 (m, 1H, CH Pro1), 4.25-4.5 (m, 1H, CH Pro2), 4.05-4.2 (m, 1H, CH Pro), 2.75-3.8 (m,

12H, 3 × CH₂ δ Pro1, 2, 3 und CH₂ δ Arg), 1.5-2.3 (m, 16H, 3 × CH₂ β Pro und 3 × CH₂ γ Pro und CH₂ β Arg und CH₂ γ Arg), 1.2-1.5 (d, 9H, CH₃ Boc).

ESI MS m/z (%): 656.3 (100) [M+H]⁺, 556.3 (10) [M-Boc+H]⁺, 600.2 (9) [M-tBu+H]⁺, 754.3 (10) [M+Pro+H]⁺.

Boc-Pro-Arg-Pro-Pro-pNA 27



94 mg Boc-PRP-OH (0,2 mMol, MW=468.2 g Mol⁻¹), 30 mg H-Pro-pNA (0.13 mMol, MW=234.0 g Mol⁻¹), 77 mg TBTU (0.24 mMol, MW=321.1 g Mol⁻¹), 44 µl NMM (0.4 mMol, MW=101.15 g Mol⁻¹, d=0.92 g cm⁻³) wurden in 0.5 ml Acetonitril suspendiert. Die Reaktion verlief bei RT im Zeitraum von 3 Stunden. Die Reaktionslösung wurde in dieser Zeit von einer Suspension zur Lösung. Das Lösungsmittel wurde eingeeengt, mit Methylenchlorid aufgenommen, mit gesättigten NaCl-Lösung mehrmals waschen. Das Produkt wurde aus CH₂Cl₂/tBuOMe ausgefällt. Ausbeute 83%

HPLC: RP-C18, 5µm, 250×4, Gradient von 10% Methanol auf 90% in 15 Minuten R_v=16.6 ml, flow=1 ml/min; UV (220, 254nm), Lichtstreuung.

¹³C-NMR (MeOD): δ = 172.9, 172.6, 171.8 (CO), 158.6 (gua.C, Arg), 156.3 ?, 155.9 (CO, Urethan), 146.0, 144.6, 125.8, 124.9, 120.3, 118.7 (arom.C, pNA), 81.3 (tert.C, Boc), 74.5, 62.4, 59.9, 51.8 (CH, 3 × CH Pro, CH Arg), 42.0, 31.3, 30.6, 29.4, 27.2, 26.1, 25.9, 25.4, 24.6 (CH₂, 3 × CH₂ δ Pro, 3 × CH₂ β Pro, 3 × CH₂ γ Pro, CH₂ δ Arg, CH₂ β Arg, CH₂ γ Arg, davon drei Signale nicht sichtbar, wahrscheinlich unter MeOD Signal), 28.7 (CH₃ Boc).

ESI MS m/z (%): 686.3 (100) [M+H]⁺, 630.2 (14) [M-tBu+H]⁺, 586.3 (31) [M-Boc+H]⁺, 708.2 (1) [M+Na]⁺, 783.2 (10) [M+Pro+H]⁺, 1371.0 (4) [2M+H]⁺.

IR (KBr): 3396 (m) [ν, NH₂ oder NH, Guanidingruppe Arg], 2975 (m) [ν, CH₂], 1641 (s) [ν, C=O, ν NH Amidbande I, ν NH₂], 1559 (w) [ν, C-NO₂], 1511 (m) [ν, NH Amide, ν, C-NO₂, ν arom.C], 1405 (m) [ν, COO, δ COO], 1339 (m), ν C-N Amid, ν N=O mit Aromaten], 1258 (w) [ν CO, Ester], 1167 (m) [ν, CO; tert:Alkohole], 853 (m) [δ, CH, 1,4 Disubstituierte Aromaten].

Boc-Pro-Arg-Pro-Pro-AMC 31

MALDI TOF MS m/z (%), pos, CCA1, refl: 723.6 (100) [M+H]⁺.

Boc-Pro-Arg-Pro-Pro-OMe 26

380 mg BocProArgProOH HCl (0.75 mMol, MW=504.5 g Mol⁻¹), 115 mg H-Pro-OMe HCl (0.68 mMol, MW=167.4 g Mol⁻¹), 380 mg HBTU (1 mMol, MW=379.3 g Mol⁻¹) wurden in 3 ml wasserfreien Acetonitril suspendiert. Danach wurde 0.3 ml NMM (3.2 mMol, MW=101,15 g Mol⁻¹, d=0,92 g cm⁻³) eingetropft. Die Reaktion verlief bei RT im Zeitraum von 2 Stunden, quantitativ in HPLC. Das Lösungsmittel wurde entfernt, der Rückstand mit Methylenchlorid aufgenommen, die Lösung wurde mit kaltem 0.1n HCl gewaschen. Das Lösungsmittel wurde entfernt. Das Produkt wurde aus Chloroform/tBuOMe ausgefällt. Ausbeute 72%. Falls es nötig war, wurde MPLC auf einer RPC8 Säule durchgeführt, Gradient: 50→75% Methanol, (mit 10mM Ammoniumformiatpuffer, pH=4.0), Ausbeute nach der Trennung 55%.

¹H-NMR (MeOD): δ = 4.5-4.65 (m, 2H, 2 × CH Pro1 und Arg), 4.3-4.4 (dd, 1H, CH Pro2), 4.05-4.2 (dd, 1H, CH Pro3), 3.6-3.85 (m, 2H, CH₂ δ Pro1), 3.45-3.6 (m, 2H, CH₂ δ Pro2 und s, 3H, CH₃ Methylester), 3.25-3.45 (m, 2H, CH₂ δ Pro3), 3.15-3.25 (m, 2H, CH₂ δ Arg), 2.9-3.15 (m, 2H, CH₂ β Arg), 2.05-2.3 (m, 2H, CH₂ β Pro1), 1.7-2.05 (m, 9H, CH₂ β Pro und CH₂ γ Pro), 1.5-1.7 (m, 3H, CH₂ Arg γ und CH₂ γ Pro), 1.25-1.4 (d, 9H, CH₃ Boc).

¹³C-NMR (MeOD): δ = 174.0, 172.5, 171.7 (CO), 158.7 (gua.C, Arg), 81.4 (tert.C, Boc), 61.5, 60.5, 59.8, 51.8 (CH Pro1, Pro2, Pro3, CH Arg), 52.7 (CH₃, Methylester), 42.1 (CH₂ δ, Arg), 32.0, 31.0, 30.0, 29.2, 25.5 (CH₂ δ, β, γ, Pro und CH₂ β Arg), 28.7 (CH₃, Boc), 24.6 (CH₂ γ Pro).

MALDI TOF MS m/z (%), pos, CCA1: 580.9 (100) [M+H]⁺, 602 (12) [M+Na]⁺, 619 (5) [M+K]⁺, 480 (8) [M-Boc+H]⁺.

13.3. Aktivitätsbestimmung der IgA-Protease

Zu einer 1ml Küvette 100µl einer 4.0 mM Boc-PRPP-pNA Lösung (10% EtOH) zugeben und durch Zugabe von 900µl Tris Puffer (100mM, EDTA 1mM, pH=8.0) verdünnen. Mit 1.0 µl Enzymlösung (direkt aus der Stammlösung, c=189 µg/ml) wurde die Reaktion gestartet. Der Hydrolyseverlauf wurde fotometrisch bei λ=405 nm verfolgt.

Die Extinktionsänderungen wurden anschließend auf die Enzymaktivität umgerechnet.

13.4. Modifikation von CSMP

Bei der Modifikation wurde 3.3 mM CSMP-Lösung in Standardpufferlösung verwendet. Als Standardpufferlösung wurde Bicin 100mM, EDTA 2mM, pH=8.9 benutzt. Als interner Standard verwendete man 0.17 mM Boc-Trp-OH Lösung. Zum Abbruch der Reaktion wurde 50% AcOH Lösung in Acetonitril verwendet.

Als Enzymstammlösung wurde eine Endoproteinase # EP0205 (168 µg/ml) von Mo-BiTec in 50 mM Kaliumphosphat Puffer (pH=7.0) mit 50% Glycerol verwendet.

Vorschrift zur Modifikation von CSMP-Peptid

Die Enzymlösung wurde 1h bei RT vorinkubiert.

Lösung 1: 10 mg BocProArgProProOMe wurden in 82 µl Bicin Standardpuffer, 4.2 µl interner Standardlösung und 22.8 CSMP Lösung gelöst.

Lösung 2: 16.8 mg BocProArgProProOMe wurden in 104 µl Puffer und 26 µl Glycerin gelöst.

Reaktion: 34 µl Lösung 1 wurden mit 20 µl Enzymstammlösung zusammengemischt. Eventuell wurde der pH-Wert auf pH=9.0 korrigiert. Parallel wurde ein Aktivitätstest gemacht. Nach 20, 50, 80, 110, 140, 160 Minuten wurden jeweils 20 µl Lösung 2 zugegeben. Jede 15 Minuten wurden 10 bis 15 µl Reaktionslösung entnommen und zu 20 µl 10% AcOH in MeOH zugegeben. Die Proben wurden per HPLC analysiert, Gradient: 30→40% Acetonitril in 25 Minuten, RPC18 Säule. Das Produkt wurde unter gleichen Bedingungen per HPLC isoliert und in gepufferter Lösung (pH = 7.0) aufbewahrt.

MALDI TOF MS

MALDI TOF MS wurden in positivem oder negativem reflector Modus aufgenommen. Als Matrix wurde α -Cyano-4-hydroxymethylsäure verwendet.

CSMP 37

MALDI TOF MS m/z (%), pos, refl, CCA1: 874.4 (90) [M+H]⁺, 896.4 (100) [M+Na]⁺, 912.4 (63) [M+K]⁺.

Boc-PRPP-CSMP 38

MALDI TOF MS m/z (%), pos, CCA1: 1421.6 (100) [M+H]⁺, 874.3 (12) [CSMP+H]⁺.

MALDI TOF MS m/z (%), neg, CCA1: 1420.8 (100) [M-H]⁻, 1320.7 (29) [M-Boc-H]⁻.

13.5. Modifikation von Proteinen

Zur Modifikation standen folgende Proteinlösungen zur Verfügung:

IgAP1: 4.6 mg Protein/ml in 100 mM Bicin Puffer, EDTA 2mM, pH=9.0

IgAP2: 6.7 mg Protein/ml in 100 mM Bicin Puffer, EDTA 2mM, pH=9.0

Als Standardpufferlösung benutzte man Bicin 200mM, EDTA 2mM, pH=9.0. Als interner Standard verwendete man 0.17 mM H-Trp-NH₂ Lösung. Zur Abbruch der Reaktion wurde 50% AcOH Lösung in Acetonitril verwendet.

Als Enzymstammlösung wurde die Endoproteinase # EP0205 von MoBiTec (168 µg/ml) in 50 mM Kaliumphosphat Puffer (pH=7.0) mit 50% Glycerol verwendet.

Vorschrift zur Modifikation des Proteins IgAP1:

Das Enzym wurde 1h bei RT vorinkubiert.

Lösung 1: 4.5 mg Boc-Pro-Arg-Pro-Pro-OMe (MW=579) wurden in 10.5 µl Bicin Puffer (2M, EDTA 33mM, pH=9.0) suspendiert. Dazu wurde 1µl der Lösung des internen Standards und 50µl IgAP1 Lösung zugegeben.

Lösung 2: 12.4 mg Boc-Pro-Arg-Pro-Pro-OMe wurden in 130 µl Bicin Puffer (100 mM, EDTA 2 mM, pH = 9.0) und 32 µl Glycerin gelöst.

62µl Lösung 1 und 40 µl Enzymstammlösung wurden gemischt, wodurch die Reaktion gestartet wurde. Die Reaktion verlief bei 25°C. Parallel zur Reaktion wurde ein Enzymaktivitätstest durchgeführt. Nach 20, 50 und 80 Minuten wurden jeweils 40 µl Lösung 2 zur Reaktionslösung zugegeben. Die Kinetik wurde per HPLC verfolgt. Nach 15 und 30 Minuten wurden jeweils 10 µl von der Reaktionslösung, nach 60, 80, 90, 110, 130, 150 und 170 Minuten wurden jeweils 20 µl Reaktionslösung entnommen, mit AcOH-Lösung gestoppt und analysiert. Die HPLC Analyse erfolgte auf einer RPC8 Säule (300Å, 5µm Korngröße), die in einem Ofen auf T=60°C aufgeheizt wurde. Der Gradient: 25→45% Acetonitril in 50 Minuten. Das Produkt wurde nach beendeter Reaktion per HPLC (Bedingungen wie für Analytik) isoliert. Das Protein wurde in einer Pufferlösung aufbewahrt: zur MALDI TOF MS Analyse in 10mM Ammoniumformiatpuffer pH=7.0, zur Edmann Sequenzierung in 50mM Bicin Puffer (pH=9.0).

Abspaltung der Boc-Gruppe

Aus der Proteinlösung wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand mit 0.5 ml Methylenchlorid aufgenommen. Dazu wurde 0.25 µl Triethylsilan und 0.25 ml TFA zugegeben. Die Reaktion verlief bei RT. Nach 30 Minuten wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in Pufferlösung aufgenommen.

MALDI TOF MS Spektren

MALDI TOF MS wurden in positivem, linearem Modus mit Myoglobin als internem Standard aufgenommen, weshalb man zusätzlich zu den gewünschten Massen auch Myoglobinpeaks 16952 $[M+H]^+$, 8476 $[M+2H]^{2+}$ im Spektrum erkennt. Als Matrix wurde α -Cyano-4-hydroxymizsäure verwendet.

IgAP1 unmodifiziert **42**

MALDI TOF MS m/z (%): 21410 (80) $[M+H]^+$, 10695 (100) $[M+2H]^{2+}$, 7129 (27) $[M+3H]^{3+}$.

IgAP1 modifiziert **44**

MALDI TOF MS m/z (%): 21986 (94) $[M+H]^+$, 10991 (100) $[M+2H]^{2+}$.

Vorschrift zur Modifikation des Proteins IgAP2:

Lösung 1: 4.5 mg Boc-Pro-Arg-Pro-Pro-OMe (MW=579) wurden in 10.5 µl Bicin Puffer (2M, EDTA 33mM, pH=9.0) suspendiert. Dazu wurde 1µl Lösung von internem Standard und 34.3 µl IgAP2 Lösung und 15.7 µl bidestillierten Wasser zugegeben.

Lösung 2: identisch wie für Modifikation des Proteins IgAP1.

Reaktion: 60µl Lösung 1 und 40 µl Enzymstammlösung wurden zusammengemischt, womit die Reaktion gestartet wurde. Die Reaktion verlief bei 25°C. Parallel zur Reaktion wurde ein Enzymaktivitätstest durchgeführt. Nach 20, 60, 80 und 110 Minuten wurden jeweils 40 µl Lösung 2 zur Reaktionslösung zugegeben. Die Kinetik wurde per HPLC verfolgt. Nach 15 und 30 Minuten wurden jeweils 10 µl von der Reaktionslösung, nach 60, 80, 90, 110, Minuten jeweils 20 µl und nach 130 und 190 jeweils 30 µl Reaktionslösung entnommen, mit AcOH-Lösung gestoppt und analysiert. Die HPLC Analyse, Aufarbeitung und Abspaltung der Boc Gruppe erfolgte identisch wie für IgAP1.

MALDI TOF MS wurden in positivem, linearem Modus mit Myoglobin als internem Standard aufgenommen, weshalb man zusätzlich zu den gewünschten Massen auch Myoglobinpeaks 16952 $[M+H]^+$, 8476 $[M+2H]^{2+}$ im Spektrum erkennt:

IgAP2 unmodifiziert 43

MALDI TOF MS m/z (%): 21028 (100) $[M+H]^+$.

IgAP2 modifiziert 45

Das modifizierte Protein IgAP2 konnte nicht von dem unmodifizierten Protein sauber abgetrennt werden, weshalb man Massen von beiden Proteinen in den MS-Spektren erkennt:

M₁ - unmodifiziertes IgAP2 **43**

M₂ - modifiziertes IgAP2 **45**

MALDI TOF MS m/z (%): 21559.5 (40) $[M_2+H]^+$, 21015.3 (20) $[M_1+H]^+$, 10775.6 (100) $[M_2+2H]^{2+}$, 10524.2 (60) $[M_1+2H]^{2+}$.

14. Literaturverzeichnis

- [1] J.R. Desjarlais, T.M. Handel, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **1995**, 6, 460-466.
- [2] C.J.A. Wallace, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **1995**, 6, 403-410.
- [3] L. Baltzer, H. Nilsson, J. Nilsson, *Chem. Rev.*, **2001**, 101, 3153-3163.
- [4] I.Gill, R.Lopez-Fandino, X.Jorba, E.N.Vulfson, *Enzyme Microb. Technol.*, **1996**, 18, 162-183.
- [5] R.B. Merifield, *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **1962**, 21, 412.
- [6] R.B. Merifield, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 2149.
- [7] R.B. Merifield, *Biochemistry*, **1964**, 3, 1385.
- [8] G.J. Cotton, T.W. Muir, *Chem.Biol.*, **1999**, 6, R247-R256.
- [9] J.M. Humphrey, A.R. Chamberlin, *Chem. Rev.*, **1997**, 97, 2243-2266.
- [10] L.A. Carpino, A. El-Faham, *J. Org. Chem.*, **1994**, 59, 695.
- [11] A. Ehrlich, S. Rothmund, M.Brudel, M.Beyermann, L.A.Carpino, M.Bienert, *Tetrahedron Lett.*, **1993**, 34, 4781.
- [12] P.A.Grieco, Y.S.Hon, A.Perez-Medrano, *J.Am.Chem.Soc.*, **1988**, 110, 1630.
- [13] L.E.Canne, P.Botti, R.J.Simon, Y.Chen, E.A.Dennis, *J.Am.Chem.Soc.*, **1999**, 121, 8720-8727.
- [14] L.Z.Yan, P.E.Dawson, *J.Am.Chem.Soc.*, **2001**, 123, 526-533.
- [15] C.J.Noren, J.Wang, F.B.Perler, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, 39, 450-466.
- [16] T.J.Tolbert, C.-H.Wong, *J.Am.Chem.Soc.*, **2000**, 122, 5421-5428.
- [17] J.A.Camarero, T.W.Muir, *J.Am.Chem.Soc.*, **1999**, 121, 5597-5598.
- [18] J.A. Camarero, J.Pavel, T.W.Muir, *Angew. Chem.*, **1998**, 110, 361-346.
- [19] S.Chong, F.B.Mersha, D.G.Comb, M.E.Scott, D.Landry, L.V.Vence, F.B.Perler, J.Benner, R.B.Kucera, C.A.Hirvonen, J.J.Pelletier, H.Paulus, M.-Q.Xu, *Gene*, **1997**, 192, 271-281.
- [20] R.Quaderer, A.Sewing, D.Hilvert, *Helvet. Chim. Acta*, **2001**, 84, 1197-1206.
- [21] R.J.Hondal, B.L.Nilsson, R.T.Raines, *J.Am.Chem.Soc.*, **2001**, 123, 5140-5141.

- [22] J.Hamachi, Y.Yamada, T.Matsugi, S.Shinkai, *Chem. Eur. J.*, **1999**, 5, 1503-1511.
- [23] L.Wang, T.J.Magliery, D.R.Liv, P.G.Schultz, *J.Am.Chem.Soc.*, **2000**, 122, 5010-5011.
- [24] K.L.Kiick, J.C.M.van Hest, D.A.Tirrell, *Angew. Chem.*, **2000**, 112, 2232-2236.
- [25] V.A.Karginov, S.V.Mamaev, H.An, M.D.van Cleve, S.M.Hecht, G.A.Komatsoulis, J.N.Abelson, *J.Am.Chem.Soc.*, **1997**, 119, 8166-8176.
- [26] J.C.M.Hest, K.L.Kiick, D.A.Tirrell, *J.Am.Chem.Soc.*, **2000**, 122, 1282-1288.
- [27] Z.Miao, J.P.Tam, *J.Am.Chem.Soc.*, **2000**, 122, 4253-4260.
- [28] J.P.Tam, Y.-A.Lu, Q.Yu, *J.Am.Chem.Soc.*, **1999**, 121, 4316-4324.
- [29] A.Nefzi, X.Sun, M.Mutter, *Tetrahedron Lett*, **1995**, 36, 2, 229-230.
- [30] S.Futaki, T.Ishikawa, M.Niwa, K.Kitagawa, T.Yagami, *Tetrahedron Lett*, **1995**, 36, 29, 5203-5206.
- [31] G.Tuschscherer, *Tetrahedron Lett*, **1993**, 34, 52, 8419-8422.
- [32] P.E.Dawson, S.B.H.Kent, *J.Am.Chem.Soc.*, **1993**, 115, 7263-7266.
- [33] G.Tuschscherer, C.Lehmann, M.Mathiew, *Angew. Chem.*, **1998**, 110, 21, 3160-3164.
- [34] M.Mutter, P.Dumy, P.Garrouse, C.Lehmann, M.Mathiew. C.Peggion, S.Peluso, A.Razaname, G.Tuschscherer, *Angew. Chem.*, **1996**, 108, 13/14, 1588-1591.
- [35] A.J.Kennan, V.Haridas, K.Severin, D.H.Lee, M.R.Ghadiri, *J.Am.Chem.Soc.*, **2001**, 123, 1797-1803.
- [36] C.Seitz, *Dissertation*, TUM, **1995**.
- [37] I.Schechter, A.Berger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1967**, 27, 157-162.
- [38] E.A.Bayer, M.Wilchek, *Methods Enzymolog.*, **1990**, 184, 130-160.
- [39] C.T.Pool, T.E.Thompson, *Biochemistry*, **1998**, 37, 10246-10255.
- [40] A.Stocker, H.-J.Hecht, A.F.Bueckmann, *Eur. J. Biochem.*, **1996**, 238, 519.
- [41] A. Nakamura, I.Urabe, H.Okada, *J. Biol. Chem.*, **1986**, 261, 16792.

- [42] T.Eguchi, T.Izuka, T.Kagotani, J.H.Lee, I.Urabe, *Eur. J. Biochem.*, **1986**, 155, 415.
- [43] N.Katayama, I.Urabe, H.Okada, *Eur.J.Biochem.*, **1983**, 132, 403.
- [44] R.N.Zuckermann, D.R.Corey, P.G.Schultz, *J.Am.Chem.Soc.*, **1988**, 110, 1614.
- [45] D.A.Erlanson, M.Chytil, G.L.Verdine, *Chem. Biol.*, **1996**, 3, 981.
- [46] T.E.Creighton: *Proteins. Structures and molecular properties.*, New York: W.H.Freeman and Company, **1983**.
- [47] F.Franks, u.a., In: *Charakterisation of proteins.*, Clifton:Humana Press, **1988**.
- [48] A.W.Yem, H.A.Zurcher-Neely, N.D.Staite, R.L.Heinrikson, M.R.Deibel, *J. Biol. Chem.*, **1989**, 264, 17691-7.
- [49] O.B.Kinstler, N.E.Gabriel, C.E.Farrar, R.B.Randolph, *PCT Int. Appl.*, **1996**, WO 9611953.
- [50] J.Carlsson, H.Drevin, R.Axen, *Biochem. J.*, **1978**, 173, 723-737.
- [51] C.T.Pool, T.E.Thompson, *Biocojugate Chem.*, **1999**, 10, 221-230.
- [52] W.Hughes, H.Sarott, A.Garney, *J.Am.Chem.Soc.*, **1949**, 71, 2476-2480.
- [53] F.Chirat, D.Belaiche, N.Malki, K.K.Han, *Biomed. Chromat.*, **1989**, 3, 173-176.
- [54] G.B.Postnikova, *Biokhimiya (Moscow)*, **1994**, 59, 1445-1457.
- [55] A.P.Heuck, R.A.Wolosiuk, *Anal.Biochem.*, **1997**, 248, 94-101.
- [56] K.F.Geoghegan, J.G.Stroh, *Biokonjugate Chem.*, **1992**, 3, 138-146.
- [57] D.A.Erlanson, M.Chytil, G.Verdine, *Chem. Biol.*, **1996**, 3, 981.
- [58] J.C.Spetzler, J.P.Tam, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1995**, 45, 78-85.
- [59] B.Linow, *Disertation*, TUM, **1995**.
- [60] C.Gittel, *Disertation*, TUM, **1995**.
- [61] C.Gittel, F.P.Schmidtchen, *Bioconjugate Chem.*, **1995**, 6, 70-76.
- [62] P.Clapes, E.Pera, J.L.Tores, *Biotechnol. Letters*, **1997**, 19, 1023-1026.
- [63] S.-T.Chen, S.-Y.Chen, C.-L.Kao, K.-T.Wang, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters.*, **1994**, 4, 443-448.

- [64] M.Hänsler, H.D.Jakubke, *J. Pep. Sci.*, **1996**, 2, 279-289.
- [65] T.K.Chang, D.Y.Jackson, J.P.Burnier, J.A.Wells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, 91, 12544-12548.
- [66] M.Taki, S.Y.Sawata, K.Taira, *J. Biosci. Bioeng.*, **2001**, 92, 149-153.
- [67] H.Sato, M.Ikeda, K.Suzuki, K.Hirayama, *Biochemistry*, **1996**, 35, 13072-13080.
- [68] M.Tajima, T.Iida, S.Yoshida, K.Komatsu, R.Namba, M.Yanagi, M.Noguchi, H.Okamoto, *J.Biol.Chem.*, **1990**, 265, 9602.
- [69] H.Togame, T.Inaoka, T.Kokubo, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1994**, 1107.
- [70] V.Cerovsky, M.R.Kula, *Angew. Chem.*, **1998**, 110, 1986-1989.
- [71] M.J.J. Litjens, A.J.J.Straathof, J.A.Jongejan, J.J.Heijnen, *Chem. Comm.*, **1999**, 1255-1256.
- [72] D.B.Henriksen, K.Breddam, O.Buchardt, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1993**, 41, 160-180.
- [73] T.J.Tolbert, C.-H. Wong, *J.Am.Chem.Soc.*, **2000**, 122, 5421-5428.
- [74] V.Schellenberger, H.-D.Jakubke, *Angew. Chem.*, **1991**, 103, 1440-1452.
- [75] B.Asboth, L.Polgar, *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, **1977**, 12, 329-333.
- [76] A.Könnecke, V.Schellenberger, H.-J.Hoffman, H.-D.Jakubke, *Pharmazie*, **1984**, 39, 785-786.
- [77] M.Yu.Golobov, U.Schellenberger, V.Schellenberger, H.-D.Jakubke, V.K.Svedas, *Biokhimija (Moscow)*, **1990**, 55, 338-345.
- [78] M.Hänsler, H.-D.Jakubke, *J. Pept. Sci.*, **1996**, 2, 279-289.
- [79] M.Hänsler, N.Wehofsky, S.Gerisch, J.-D.Wissman, H.-D.Jakubke, *Biol.Chem.*, **1998**, 379, 71-74.
- [80] M.Hänsler, K.Arnold, *Biol. Chem.*, **2000**, 381, 79-83.
- [81] M.Hänsler, G.Ullman, H.D.Jakubke, , *J. Pept. Sci.*, **1995**, 283-287.
- [82] M.Schuster, G.Ullmann, U.Ullmann, H.-D.Jakubke, *Tetrahedron Lett.*, **1993**, 34, 36, 5701-5702.

- [83] H.Lineweaver, *J.Am.Chem.Soc.*, **1939**, 61, 403-407.
- [84] M.Eigen, L.de Mayer, *Proc. R. Soc.*, **1958**, A247, 505-533.
- [85] T.C.Bruice, A.R. Buttler, *J.Am.Chem.Soc.*, **1964**, 86, 4104-4108.
- [86] P.Kuhl, P.J.Halling, H.-D.Jakubke, *Tetrahedron Letters*, **1990**, 31,36, 5213-5216.
- [87] J.-E.So, J.-S.Shon, B.-G.Kim, *Enzyme Microb. Technol.*, **2000**, 26, 108-114.
- [88] V.Schellenberger, A.Goerner, A.Koennecke, H.-D.Jakubke, *Peptide Res.*, **1991**, 4, 265-269.
- [89] H.-D.Jakubke, U.Eichhorn, S.Gerisch, M.Haensler, K. Salchert, G.Ullman, D.Ullman, In : *Molecular Design and Bioorganic Catalysis*, C.S.Wilcox, A.D.Hamilton, Eds., 53-70, Kluwer Academic Publishers, **1996**.
- [90] J.H.van't Hoff, *Z. Anorg. Chem.*,**1898**, 18, 1-13.
- [91] M.Bergmann, L.Zervas, J.S.Fruton, *J. Biol. Chem.*, **1935**, 111, 225-244.
- [92] M.Bergmann, J.S.Fruton, *J. Biol. Chem.*, **1937**, 118, 405-415.
- [93] W.Kullman, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **1982**, 79, 2840-2844.
- [94] W.Kullman, *J. Org. Chem.*, **1983**, 47, 5300-5303.
- [95] H.Takai, K.Sakato, K.Nakamizo, Y. Isowa, in: *Peptide Chemistry 1980*, Protein Research Fundation, Osaka, **1981**, 213-214.
- [96] K.Oyama, S.Niiimura, Y.Nonaka, K.Kihara, T.Hashimoto, *J. Org. Chem.*,**1981**, 46, 5241-5242.
- [97] M.Lobell, M.P.Schneider, *J.Chem.Soc., Perkin Trans. 1*, **1998**, (2), 319-326.
- [98] S.Rival, J.Saulnier, J.Wallach, *Biocatalysis and Biotransformation*, **2000**, 17, 6, 417-429.
- [99] S.Kumaran, D.Datta, R.P.Roy, *Protein Sci.*, **2000**, 9, 4, 734-741.
- [100] V.Schellenberger, M.Pompejus, H.-J.Fritz, *Int. J. Peptide Protein Res.* 41, 1993, 326-332.]
- [101] F.Widmer, S.Bayne, G.Houen, R.D.Rigby, R.G.Wittaker, J.T.Johansen, In: *Peptides 1984* (Ragnurrrson, U., Ed.). Almquist, Stockholm, **1985**, 193-196.

- [102] V.Bille, C.Ripak, I. Van Aasche, L.Forni, L.Degelaen, A.Scarso, In: *Proceedings of 21st European Peptide Symposium* (Giralt, E. and Andreu, D., Eds.) ESCOM, Leiden, the Netherlands **1991**, 253-254.
- [103] S.Kumaran, D.Datta, R.P.Roy, *Protein Sci.*, **1997**, 6, 10, 2233-2241.
- [104] G.Sahni, S.A.Khan, A.S.Acharya, *J. Protein Chem.*, **1998**, 17, 7, 669-678.
- [105] J.Bongers, W.Liu, T.Lambros, R.M.Campbell, A.M.Felix, E.P.Heimer, *Int.J. Peptide*, **1994**, 44, 123-129.
- [106] D.Y.Jackson, J.Burner, C.Quan, MC.Stanley, J.Tom, J.A.Wells, *Science*, **1994**, 266, 243-247.
- [107] I.Gill, R.Lopez-Fandino, X.Jorba, E.N.Vulfson, *Enzyme Microb. Technol.*, **1996**, 18, 162-183.
- [108] G.A.Homanberg, M.Laskowski, *Biochemistry*, **1979**, 18, 586.
- [109] A.Komoriya, G.A.Homandberg, I.M.Chaiken, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1980**, 16, 433-440.
- [110] M.Juillerat, G.A.Homandberg, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1981**, 78, 6135-6138.
- [111] L.Graf, C.H.Li, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **1981**, 78, 6135-6138.
- [112] S.T.Chen, S.-Y.Wu, S.-Y.Chen, K.-T.Wang, *Biotechnol. Lett.*, **1993**, 15, 4, 373-376.
- [113] A.Zaks, A.M.Klibanov, *Science*, **1984**, 224, 1249-1251.
- [114] S.Tawaki, A.M.Klibanov, *J.Am.Chem.Soc.*, **1992**, 114, 1882-1884.
- [115] F.Terradas, M.Teston-Henry, P.A. Fitzpatrick, A.M. Klibanov, *J.Am.Chem.Soc.*, **1993**, 115, 390-396.
- [116] G.B.Dunha, V.Satyanarayan, P.M.Nair, *Enzyme Microb. Technol.* , **1996**, 16, 318-322.
- [117] M.Erbeldinger, X.Ni, P.J.Halling, *Enzyme Microb. Technol.*, **1998**, 23, 141-148.
- [118] P.Clapes, E.Pera, J.L.Tores, *Biotechnol. Lett.*, **1997**, 19, 10, 1023-1026.
- [119] J.Mectecky, M.Killian, *Methods Enzymol.*, **1994**, 224, 137-151
- [120] S.K.Poulsen, J.Reinhodt, C.Jespersgaard, K.Boye, T.A. Brown, M. Hange,

- M.Killian, *Infect. Immun.*, **1998**, 66(1), 181-190.
- [121] *Enzyme Handbook*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **1998**.
- [122] G.Morelli, J.del Valle, C.J.Lammel, J.Pohlner, K.Müller, M.Blake, G.F.Brooks, T.F.Meyer, B.Koumare, N.Brieske, M.Achtman, *Molec. Microb.*, **1994**, 11(1), 175-187.
- [123] D.B.Johannsen, D.M.Johnson, H.O.Koymen, M.S.Cohen, J.G.Cannon, *Infect. Immun.*, **1999**, 67(6), 3009-3013.
- [124] J.V.Gilbert, A.G.Plaut, A.Wright, *Infec. Immun.*, **1991**, 59(1), 7-17.
- [125] S.B.Mortensen, M.Kilian, *Infect. Immun.*, **1984**, 45(3), 550-557.
- [126] Product Information, Firma MoBiTech, #EPO205, 11/12/1999.
- [127] D.A.Simpson, R.P.Hausinger, M.H.Mulks, *J.Bacteriol.*, **1988**, 170(4), 1866-1873.
- [128] R.Halter, J.Pohlner, T.F.Meyer, *EMBO J.*, **1990**, 9(6), 1991-1999.
- [129] Produkt Information, Firma Roche, Best.Nr.1 461 265, Version 3, Oktober 1999.
- [130] J.Qiu, G.P.Brackee, A.G.Plaut, *Infect. Immun.*, **1996**, 64(3), 933-7.
- [131] S.G.Wood, J.Burton, *Infect. Immun.*, **1991**, 59(5), 1818-1822.
- [132] J.Pohlner, R.Halter, K.Beyreuther, T.H.Meyer, *Nature*, **1987**, 325, 458-462.
- [133] T.F.Meyer, R.Halter, J.Pohlner, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1987**, 216B (Recent Adv. Mucosal Immunol., Pt.B), 1271-81.
- [134] J.Pohlner, U.Langenberg, U.Wölk, S.C.Beck, T.F.Meyer, *Molec.Microb.*, **1995**, 17, 1073-1083.
- [135] E.Veiga, V. De Lorenzo, L.A.Fernandez, *Mol. Microb.*, **1999**, 33(6), 1232-1243.
- [136] J.Burton, S.G.Wood, M.Lynch, A.G.Plaut, *J.Med.Chem.*, **1988**, 31, 1647-1651.
- [137] S.G.Wood, M.Lynch, A.G.Plaut, J.Burton, *J.Med. Chem.*, **1989**, 32(10), 2407-2411.
- [138] W.W.Bachovchin, A.G.Plaut, G.R.Flentke, M.Lynch, C.A.Kettner, *J.Biol.Chem.*, **1990**, 265(7), 3738-3743.

- [139] A.G., Plaut, W.W. Bachovchin, *Methods Enzymol.*, **1994**, 244, 137-151.
- [140] A.G.Plaut, *Annu. Rev. Microb.*, **1983**, 37, 603-622.
- [141] H.S.Bleeg, J.Reinholdt, M.Kilian, *FEBS Lett.*, **1985**, 188, 357-362.
- [142] L.E.Lindler, F.J.Stutzenberger, *Arch. Oral Biol.*, 1982, 27, 853-859.
- [143] C.R.Hauck, T.F.Meyer, *FEBS Lett.*, **1997**, 405, 86-90.
- [144] J.M.Van der Vaart, R te Biesebeke, J.W.Chapman, F.M.Klis, C.T.Verrips, *FEMS Microb. Lett.* , **1996**, 145, 401-407.
- [145] S.C.Beck, T.F.Meyer, *FEBS Lett.*, **2000**, 472, 287-292.
- [146] R.Halter, J.Pohlner, T.F.Meyer, *EMBO J.*, **1984**, 3(7), 1595-601.
- [147] D.Ambrosius, C.Dony, R.Rudolph, U.S. **1999**, 9pp. Cont.-in-part of U.S.Ser. No.820,70A, CODEN: USXXAM US5965424 A 19991012.
- [148] A.Perrin, X.Nassif, C.Tinsley, *Infect. Immun.*, **1999**, 67(11), 6119-6129.
- [149] H.Lomholt, K.Poulsen, M.Kilian, *Mol. Microb.* **1995**, 15(3), 495-506.
- [150] J.Jose, F.Jähning, T.F.Meyer, *Mol. Microb.*, **1995**, 18, 377-382.
- [151] T.Klauser, J.Pohlner, T.F.Meyer, *EMBO J.*, **1990**, 9(6), 1991-9.
- [152] J.Maurerer, J.Jose, T.F.Meyer, *J. Bacteriol.*, **1997**, 179(3), 794-804.
- [153] A.Strauss, J.Pohlner, T.Klauser, T.F.Meyer, *FEMS Microb. Lett.*, **1995**, 127(3), 249-54.
- [154] D.Schnappinger, W.Geissdörfer, C.Sizemore, W.Hillen, *FEMS Microb. Lett.* **1995**, 129, 121-128.
- [155] T.F.Meyer, R.Halter, J.Pohlner, *Ger. Offen* **1998**, 9pp, DE 3622221, A1 1998 01 14.
- [156] A.Plaut, J.Qiu, *PCT Int. Appl.*, **1997**, 49pp, WO 9705884.
- [157] U.Woelk, S.Goedert, J.Jose, T.F.Meyer, *Ger. Offen.*, **1999**, 16pp, DE 19823097.
- [158] D.Lorenzen, F.Duex, T.Meyer, G.Haas, *PCT Int. Appl.*, **1999**, 18pp. CODEN: PIXXD2, WO 9915198, A2 19990401.
- [159] M.J.Powell, *PCT Int. Appl.*, **1999**, 44pp. CODEN: PIXXD2, WO 9811237, A1

19980319.

- [160] P.Steinrücke, U.Aldinger, O.Hill, A.Hillisch, R.Basch, S.Diekman, *Anal. Biochem.*, **2000**, 286(1), 26-34.
- [161] M.Valls, V. de Lorenzo, R.Gonzales-Duarte, S.Atrian, *J. Inorg. Biochem.*, **2000**, 79(1-4), 219-223.
- [162] M.Valls, V. De Lorenzo, L.A.Fernandez, *Nat. Biotechnol.*, **2000**, 18(6),661-665.
- [163] M.S.Blake, J.Swanson, *Infect. Immun.*, 1978, 22, 350.
- [164] G.Morelli, M.Achtman, *Molec. Microb.*, 1994, 11(1), 175.
- [165] M.Kilian, B.Thomsen, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1983, 409, 612.
- [166] S.Mortensen, M.Kilian, *J. Chromatogr.*, **1984**, 296, 257.
- [167] D.J.Suich, M.D.Ballinger, J.A.Wells, W.F.DeGrado, *Tetrahedron Letters*, **1996**, 37, 6653-6656.
- [168] M.M.Shemyakin, *Russian Chemical Reviews*, 1962, 31 (3), 133-140.
- [169] S.-C.Chu, C.C.Wang, D.Brandenburg, *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.*, **1981**, 362, 647-654.
- [170] K.Morihara, T.Oka, H.Tsuzuki, Y.Tochino, T.Kanaya, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1980, 92, 396-402.
- [171] Spezifikation für IgA-Protease von Firma Roche
- [172] H.Döpp, D.Döpp, U.Langer, B.Gerding, *Houben-Weyl*, Bd.E6b, Teil2, 1217-1237.
- [173] M.Nakagawa, S.Kato, H.Fukazawa, Y.Hasegawa, J.Mijazawa, T.Hino, *Tetrahedron Letters*, **1985**, 26 (48), 5871-5874.
- [174] M.R.Demuth, P.E.Garrett, J.D.White, *J.Am.Chem.Soc.*, **1976**, 98, 635-636.
- [175] A.Kolodziejczyk, *Int. J. Pept. Prot. Res.* 1992, 39, 382-387.
- [176] L.Abrahmsen, J.Tom, J.Burnier, K.A.Butcher, A.Kossiakoff, J.A.Wells, *Biochemistry*, **1991**, 30 (17), 4151.
- [177] K.Paal, *Report of research Oct 1, 1996-March 31, 1997*. (Nicht publizierte Daten).

- [178] D.Ranganathan, V.Haridas, K.P.Madhusudanan, R.Roy, R.Nagaraj, G.B.John, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 11578-11584.
- [179] K.L.Rinehart, V.Kishore, S.Nagarajan, R.J.Lake, J.B.Gloer, F.A.Bozich, K.-M. Li, R.E.Maleczka, W.L.Todsén, M.H.G.Munro, D.W.Sullins, R.Sakai, *J.Am.Chem.Soc.*, **1987**, 109, 6846-6848.
- [180] E.Bianchi, C.Steinkühler, M.Taliani, A.Urbani, R. de Francesco, A.Pessi, *Anal. Biochem.*, **1996**, 237, 239-244.
- [181] M.Taliani, E.Bianchi, F.Narjes, M.Fossatelli, A.Urbani, C.Steinkühler, R. de Francesco, A.Pessi, *Anal. Biochem.*, **1996**, 240, 60-67.
- [182] A.Skerra, *Anticalins WO 9916873 A1, DE 197 42 706 A1*, 15 April **1999**, Micro-Patent ® , World Patent Search Chemical.
- [183] G.Beste, F.S. Schmidt, T. Stibora, A. Skerra, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, 96, 1898-1903.
- [184] G.Losse, H.Raue, *Chem. Ber.*, **1968**, 101, 1532-1539.