

Diss. Nr. 5001

Synthese und α -chymotrypsin- katalysierte Hydrolyse von Peptidsubstraten

ABHANDLUNG

zur Erlangung
des Titels eines Doktors der technischen Wissenschaften
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH

vorgelegt von

WERNER BAUMANN
dipl. Chem. ETH
geboren am 4. Mai 1942
von Leutwyl (Kt. Aargau)

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. V. Prelog, Referent
PD Dr. H. Dutler, Korreferent

Juris Druck + Verlag Zürich
1973

4. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Synthesen von 17 ausgewählten Di-, Tri- und Tetrapeptiden des allgemeinen Typs $E_x - \dots - L_{x1} - L_{y1} - \dots - E_y$ als Substrate für α -Chymotrypsin wurden nach bekannten racemisierungssicheren Methoden durchgeführt, wobei hauptsächlich die Kopplung mit N-Hydroxy-succinimidylestern, die Kondensation durch Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von N-Hydroxy-succinimid und die Aktivierung mit 1-Aethoxycarbonyl-2-aethoxy-1,2-dihydrochinolin Verwendung fanden.
2. Die optische Reinheit der synthetisierten Peptidsubstrate wurde durch stöchiometrische Kontrolle ihrer α -chymotrypsin-katalysierten Hydrolyse überprüft. Es wurde festgestellt, dass in allen untersuchten Fällen optisch reine Verbindungen vorlagen.
3. Die Ergebnisse der stöchiometrischen Kontrolle bestätigten, dass α -Chymotrypsin bei allen untersuchten Peptidsubstraten nur die durch einen aromatischen Aminosäurerest L_{x1} gekennzeichnete Peptidbindung zwischen L_{x1} und L_{y1} spaltet.
4. Aus den steady-state-kinetischen Konstanten k_{cat} und K_m der untersuchten Peptide ging hervor, dass sich strukturelle Änderungen auf der y-Seite des Substrates hauptsächlich auf die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante des Acylierungsschrittes, k_{cat} , auswirken, ohne dass die Dissoziationskonstante des Enzym-Substrat-Komplexes, K_m , wesentlich beeinflusst würde. Die beobachteten Effekte werden mit zunehmendem Abstand von der zu spaltenden Bindung kleiner und sind bei Einführung eines Glycylrestes in y_3 nicht mehr

feststellbar.

5. Strukturelle Aenderungen in den Stellungen x_2 und x_3 des Substrates wirken sich sowohl auf k_{cat} als auch auf K_m aus. Die beobachteten Effekte wurden mit Hilfe eines kürzlich von Segal et al. ^{108, 109)} vorgeschlagenen Modelles interpretiert, das die zwischen Acylteil des Substrates und Enzymprotein auftretenden Wechselwirkungen beschreibt.
6. Es wurde festgestellt, dass die von den Aminosäureresten der x - und der y -Seite des Substrates verursachten Effekte auf k_{cat} voneinander weitgehend unabhängig sind; darauf gründete man eine Regel die es erlaubt, die Größenordnung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante von neuen Substraten abzuschätzen.