

Diss. ETH 6341

PHOTOAFFINITÄTS - MARKIERUNGSSTUDIEN
AM MODELLSYSTEM
Z·ALA-ALA-PAP·OH / ALPHA-CHYMOTRYPSIN

ABHANDLUNG
zur Erlangung
des Titels eines Doktors der Naturwissenschaften
der
EIDGENOESSISCHEN TECHNISCHEN
HOCHSCHULE ZUERICH

vorgelegt von
WALTER JOSEF FISCHLI
Dipl.Naturwissenschaftler ETH
geboren am 4. Mai 1949
von Näfels

Angenommen auf Antrag von
Prof.Dr.R.Schwyzer, Referent
Prof.Dr.G.Semenza, Korreferent

1979

IV. ZUSAMMENFASSUNG

- Es wird eine Synthese von tritiiertem L-p-Azido-phenylalanin (L-Pap) und dessen Derivat Z·Ala-Ala-Pap·OH (L,L,L) beschrieben. Die Tritiumatome wurden in die m,m'-Positionen des Phenylkerns eingeführt. Ausgangsprodukte waren L-p-Amino-phenylalanin und L-p-Amino-m,m'-diiodo-phenylalanin. Die Vor- und Nachteile dieser markierten und photolysierbaren Aminosäure werden diskutiert.
- Mit Photolyse-Experimenten konnte gezeigt werden, dass bei Bestrahlung von Z·Ala-Ala-Pap·OH in Gegenwart von H·Phe(p-NH₂)·OH ohne Filter andere Photoprodukte entstehen als bei Bestrahlung mit 365 nm. Ein Produkt, das nur bei harter Bestrahlung entsteht, konnte als reaktives Addukt mit einer Lebensdauer von 30 Min. identifiziert werden.
- Die Funktion des Scavangers bei der Photoaffinitäts-Markierung wurde untersucht. Es zeigte sich, dass der Scavanger nicht nur durch Abfangen von Photoprodukten die Spezifität der Reaktion gewährleisten kann, sondern auch durch Besetzen von unspezifischen Bindungsstellen am Protein. Dadurch werden nicht-biospezifische Bindungen des Markers unterdrückt.

- Die Untersuchung der Reaktionskinetik der Photoaffinitäts-Markierung von α -Chymotrypsin mit dem Marker Z-Ala-Ala-Pap-OH ergab eine biphasische Reaktion. Die schnellere der beiden Reaktionen ($k_2' = 2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) wird der eigentlichen Photoaffinitäts-Markierung zugeschrieben, die Herkunft der langsamern ($k_2' = 1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) diskutiert.
- Die Spezifität der Photoaffinitäts-Markierung wurde beim vorliegenden Modellsystem anhand von Spezifitätskriterien überprüft. Dazu wurden die Kriterien mathematisch formuliert. Die Erfüllung dieser Postulate sowie die radiochemischen Untersuchungen mit dem tritiierten Marker zeigen eine hohe Spezifität der Markierungsreaktion. Einbaumessungen ergaben 80% Inkorporation der Photoaffinitäts-Probe in der C-Kette von α -Chymotrypsin. Peptid-mapping von Pepsin-verdauter C-Kette zeigte nur 4 radioaktive von insgesamt 37 Flecken. Indizien weisen auf eine Markierung der Bindungsstellen-Sequenz von α -Chymotrypsin hin.
- In Inhibitionsstudien am Photoaffinitäts-Markierungs Modellsystem wurde L-O-Carboranylalanin (L-Car) als Phenylalanin-Analoges ausgetestet. Z-Ala-Ala-Car-OH und Ac-Car-OEt erwiesen sich als Inhibitoren, die stärker als die natürlichen Analogen gebunden wurden. Ac-Car-OEt wurde im Gegensatz zur Phenylalanin-Verbindung nicht enzymatisch hydrolysiert. Die Resultate und Auswirkungen werden diskutiert.

SUMMARY

- The synthesis of L-para-azidophenylalanine (L-Pap) and peptides thereof containing tritium atoms in the m,m' -positions of the phenyl ring is described. Starting materials are L-para-aminophenylalanine and L-para-amino- m,m' -diiodo-phenylalanine. The advantage and disadvantages of the tritium labelled, photolysable aminoacid Pap is discussed.
- Photolysis of the photoaffinity-label benzyloxycarbonyl-alanyl-alanyl-para-azidophenylalanin (Z·Ala-Ala-Pap·OH, L,L,L) in the presence of the scavenger para-aminophenylalanin (H·Phe(pNH₂)·OH) *without* any filter results in other photoproducts than upon irradiation *with* filtered light of 365 nm. One product of the hard irradiation seems to be a reactive adduct between the two components with a lifetime of 30 minutes.
- The function of the scavenger during photoaffinity-labelling is explored. To the common effect of catching all the reactive intermediates in the outside of the receptor, another reaction was identified: the scavenger occupies non-specific binding-sites of the receptorprotein and thereby prevents the protein being labelled there nonspecifically.
- The kinetics of photoaffinity-labelling was shown to be biphasic. The faster reaction ($k_2' = 2.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) is believed to be the real photoaffinity-labelling, the slower one ($k_2' = 1.05 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) cannot definitely be interpreted.
- The saturation behaviour of photoaffinity-labelling and the influence of competitive inhibitors are mathematically formulated. The experiments showed excellent agreement with the mathematical model.

- The photoaffinity-labelling exhibited good specificity: 80% of the incorporated label was attached to the C-chain of α -chymotrypsin which contains the ligand binding-site. There is evidence that this binding-site was labelled.

- In order to test the effects of the replacement of phenylalanin by carboranylalanin (Car) in biological ligand-acceptor interactions, Z·Ala-Ala-Car·OH (1) and Ac·Car·OEt (2) were synthesized and their reactions with chymotrypsin studied by photoaffinity-labelling inhibition measurements. The two compounds proved to be good inhibitors with $K_i = 3 \times 10^{-4}$ M (1) and 8.6×10^{-4} M (2); the K_i of Z·Ala-Ala-Phe·OH is 1.0×10^{-3} M. Ac·Car·OEt is not hydrolysed in contrast to Ac·Phe·OEt. The results and implications of this effects are discussed.