

Diss. ETH Nr. 9974

**Aspekte enzymatischer
Katalyse in entworfenen Polypeptiden**

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels
Doktor der Naturwissenschaften
der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH

vorgelegt von
Kai Johnsson
Dipl. Chem. ETH
geboren am 15. Oktober 1963
aus Bad Hersfeld

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. S. A. Benner, Referent
Prof. Dr. F. Diederich, Korreferent

Zürich 1992

IV. ZUSAMMENFASSUNG

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit dem Entwurf, der Synthese und Charakterisierung von katalytisch aktiven Polypeptiden. Als zu katalysierende Reaktion wurde die Decarboxylierung von Oxalacetat (OAA) gewählt. Ein möglicher Mechanismus für die Decarboxylierung von β -Ketosäuren wie OAA oder Acetoacetat ist die Bildung eines Imins aus der β -Ketosäure und einem Amin mit nachfolgender Decarboxylierung. Es ist bekannt, daß ein wesentlicher Faktor der enzymkatalysierten Decarboxylierung von Acetoacetat der relativ tiefe pK_S -Wert der reaktiven Aminogruppe im Enzym Acetoacetat-Decarboxylase ist, da das reaktive Amin für die Iminbildung bei physiologischem pH in seiner deprotonierten Form vorliegen muß.

Um zu überprüfen, ob es sinnvoll ist, sich bei dem Entwurf von katalytisch aktiven Peptiden auf die Iminbildung zu konzentrieren, wurde zuerst die durch einfache Amine katalysierte Decarboxylierung von OAA näher untersucht. Geschwindigkeitskonstanten für die Iminbildung und das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten für die Hydrolyse und Decarboxylierung der Imine konnten für eine Reihe von Aminen mit unterschiedlichen pK_S -Werten bestimmt werden. Es zeigte sich, daß die Iminbildung, unabhängig vom pK_S des entsprechendenamins, zumindest partiell geschwindigkeitsbestimmend ist. Ausgehend von diesen Ergebnissen erschien es vernünftig, sich im ersten Schritt zum Entwurf katalytisch aktiver Polypeptide auf die Iminbildung zu konzentrieren.

Als Ausgangspunkt für die peptidkatalysierte Decarboxylierung von OAA diente das 14 Aminosäuren lange Peptid ART-OAD (artificial-oxaloacetate-decarboxylase)^{20,21}. ART-OAD bildet in wäßriger Lösung partiell eine α -Helix aus. Durch die Bildung der α -Helix sollte es zu elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den auf einer Seite der amphiphilen Helix liegenden fünf Lysinen kommen und dies zu einer Senkung der pK_S -Werte der Aminogruppen führen. Zudem sollte der pK_S der Aminogruppe des Aminoterminus des Peptids durch den Helix-Dipol beeinflußt werden. Durch Titration konnte ein pK_S von 7.2 für eine der 6 Aminogruppen bestimmt werden²⁰. Das als reaktive Zwischenstufe gebildete Imin sollte weiterhin durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Carboxylgruppen des Substrats und den Aminogruppen, bzw. dem Helix-Dipol stabilisiert werden können.

Es konnte gezeigt werden, daß ART-OAD tatsächlich eine beträchtliche katalytische Aktivität für die Decarboxylierung von OAA besitzt und daß ein Zusammenhang zwischen katalytischer Aktivität und Sekundärstruktur besteht. Durch Reduktion mit NaBH_3CN konnten sowohl das von der Aminogruppe des Aminoterminus von ART-OAD und OAA gebildete Imin als auch das Produkt der Decarboxylierung, das von der Aminogruppe des Aminoterminus und Pyruvat gebildete Imin, nachgewiesen und charakterisiert werden. Dies zeigte, daß das reaktivste Amin von ART-OAD die Aminogruppe des Aminoterminus ist und die Katalyse nach dem vorgesehen Mechanismus ablief. Durch die Analyse der Reaktion von ART-OAD mit Essigsäureanhydrid wurde nachgewiesen, daß auch tatsächlich der Aminoterminus den niedrigsten pK_S -Wert der sechs Aminogruppen besitzt. OAA und ART-OAD bilden bei pH 7 einen im Vergleich zu einfachen Aminen sehr stabiles kovalentes Addukt aus ($K_M \sim 6\text{mM}$). Es konnte gezeigt werden, daß die Wechselwirkung des negativ geladenen Substrats OAA mit dem Helix-Dipol eine mögliche Erklärung für die Stabilität des Adukts ist. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, daß auch das zum Imin tautomere Enamin zu erheblichen Anteilen im gebildeten Komplex vorliegt.

Der Aminoterminus von ART-OAD besitzt im Vergleich zu einfachen Aminen mit ähnlichem pK_S und strukturellen Voraussetzungen eine um einen Faktor von ca. 70 erhöhte katalytische Aktivität. Die Geschwindigkeitskonstante für die Iminbildung von OAA und dem Aminoterminus von ART-OAD konnte bestimmt werden und liegt um einen Faktor von ca. 100 über den von vergleichbaren einfachen Aminen.

Um zu überprüfen, ob auch die ϵ -Aminogruppen der 5 Lysine durch die Bildung einer α -Helix eine erhöhte katalytische Aktivität besitzen, wurde ART-OAD mit acetyliertem Aminoterminus synthetisiert (AcART-OAD). Zudem wurde als Vergleich ein Peptid synthetisiert, daß die gleiche Anzahl von Aminogruppen wie AcART-OAD besitzt, in Lösung jedoch als random coil vorliegt (random coil peptide, RCP).

Die Struktur von AcART-OAD in Lösung wurde durch CD- und NMR-Spektroskopie untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, daß AcART-OAD eine sich vom Amino- bis zum Carboxyterminus erstreckende α -Helix bildet. Durch die Bildung der α -Helix sind die pK_S -Werte der einzelnen Aminogruppen bei AcART-OAD im Vergleich zu RCP um bis zu einer vollen

Einheit gesenkt. RCP besitzt zudem lediglich 13 % der katalytischen Aktivität von AcART-OAD. Wie bei ART-OAD besteht bei AcART-OAD ein Zusammenhang zwischen der katalytischen Aktivität und der Bildung der α -Helix.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der sequenzspezifischen Erkennung von GC-Basenpaaren in Tripelhelices. 8-Oxo-2'-deoxyadenosin (dB) als Analogon von protoniertem Deoxycytosin (dC^+) wurde in ein Oligodeoxyribonukleotid eingebaut und dessen Eigenschaften hinsichtlich der Bildung von BGC-Triplets mit doppelsträngiger DNA untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß die Stabilität der mit einer doppelsträngigen DNA gebildeten Tripelhelix unabhängig vom pH der Lösung ist. Ab pH-Werten über 7.4 besitzt die Tripelhelix mit BGC-Triplets im Vergleich zu einer Tripelhelix mit C^+GC -Triplets eine erhöhte Stabilität.

V. SUMMARY

The first part of this thesis deals with the design, synthesis and characterization of catalytically active polypeptides. The reaction chosen was the decarboxylation of oxaloacetate (OAA). A possible mechanism for the decarboxylation of β -ketoacids is the formation of an imine between the β -ketoacid and an amine with subsequent loss of CO_2 . It is known that in the enzyme catalyzed decarboxylation of acetoacetate the unusually low pK_A of the reactive amino group contributes significantly to the observed catalytic power of the enzyme. This is because the reactive amine has to be deprotonated at physiological pH before it can participate as a nucleophile in the reaction.

To verify whether it makes sense to focus on the imine-formation for the design of catalytically active polypeptides, the amine catalyzed decarboxylation of OAA was studied in greater detail. Rate constants for imine formation and the ratio of the rate constants for hydrolysis and decarboxylation of the imine for a number of simple amines with different pK_A 's were obtained. It could be shown that imine formation is at least partially rate limiting for all of the amines studied. The ratio of the rate constants for hydrolysis and decarboxylation of the imine were independent of the pK_A of the corresponding amines. Based on these results it seemed

reasonable to focus on the imine formation in the first step towards the design of catalytically active polypeptides .

The first peptide characterized was ART-OAD (artificial-oxaloacetate-decarboxylase, 14 amino acids)^{20,21}. The peptide forms an amphiphilic α -helix in solution. On the one side of the α -helix, five lysine's should come close together in three dimensional space. The interaction of the positive charges should lower the pK_A of one or several of the lysines. Furthermore the amino terminus should interact with the helix-dipole, also lowering its pK_A . By direct titration of the peptide, it could be shown that one of the amines of ART-OAD has a pK_A of 7.2²⁰. The imine from OAA and the peptide should be stabilized by electrostatic interactions between the carboxyl groups of the substrate and either the amino groups or the helix dipole of the peptide or both.

It could be shown that ART-OAD has indeed a significant catalytic activity. Furthermore a relationship between secondary structure and catalytic activity could be demonstrated.

After treatment of a mixture of ART-OAD and OAA with $NaBH_3CN$ two major products could be isolated and identified. One corresponded to the reduced imine from OAA and the amino terminal amine group. The other corresponded to the reduced imine formed after decarboxylation, that is the imine from pyruvate and the amino terminus. This shows that the amino terminus is the predominant catalytic active amino group and that the peptides operates by the proposed imine mechanism.

By the analysis of the reaction of the peptide with acetic acid anhydride, it could be shown independently that the amino terminus has the lowest pK_A of the six amino groups of ART-OAD.

Compared to simple amines ART-OAD and OAA form a rather stable covalent complex at pH 7 ($K_D \sim 6$ mM). There is some evidence that this stability comes from the interaction of the substrate with the helix dipole. Additional it could be shown that the tautomer of the imine, the enamine, contributes significantly to the total bound species.

The amino terminal amino group of ART-OAD is about 70 times more active than simple amines with similar pK_A and steric hindrance. The rate constant for imine formation is about 100 times higher than for simple amines with similar pK_A .

To check whether the catalytic activity of the ϵ -amino groups of the lysine residues in ART-OAD are also dependent of the formation of an α -helix, ART-OAD was synthesized with an acetylated amino terminus (AcART-OAD). Furthermore a peptide was synthesized that has the same number of amino groups as AcART-OAD but can not form an α -helix and rather forms a random coil in solution (random coil peptide, RCP).

The α -helical structure of AcART-OAD was established by CD- and NMR-spectroscopy. It could be shown that the helix is more stable with AcART-OAD compared to ART-OAD and that it is formed from the amino terminus up to the carboxy terminus.

Because of the formation of the α -helix, the pK_A values of AcART-OAD were lowered compared to RCP by one unit. The catalytic activity of RCP is only 13 % that of AcART-OAD. A relationship between secondary structure and catalytic power could be demonstrated for AcART-OAD.

The second part of this thesis deals with the sequence specific recognition of GC-base pairs in triple helices. 8-oxo-2'-deoxyadenosine (dB) as an analog of protonated 2'-deoxycytosine (dC⁺) was incorporated in an oligodeoxyribonucleotide and the formation of a triple helix between this oligodeoxyribonucleotide and a DNA duplex target was studied. The stability of the triple helix is independent of pH. Above pH 7.4 the triple helix with dB was more stable than the complex with an analogous oligonucleotide containing dC instead of dB.