



Technische Universität München  
Max-Planck-Institut für Biochemie



---

**Synthese und kinetische Charakterisierung  
von Inhibitoren für papainähnliche Cysteinproteasen**

**José Maria Pfizer**

München 2006



Technische Universität München

Max-Planck-Institut für Biochemie

**Synthese und kinetische Charakterisierung von Inhibitoren für  
papainähnliche Cysteinproteasen**

**José Maria Pfizer**

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. Dr. A. Bacher

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. L. Moroder

2. Univ.-Prof. Dr. Th. Bach

Die Dissertation wurde am 19.05.2006 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 29.06.2006 angenommen.

*Für Alex und David.*

**Deine Zukunft ist, wozu du sie machen willst. Zukunft heißt wollen.**

*- Patrick Victor Martindale*

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 2001 bis April 2006 am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried, unter Anleitung von Prof. Dr. Luis Moroder angefertigt.

Mein besonders herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Professor Dr. Luis Moroder, der mir den Zugang zu diesem interessanten Arbeitsgebiet ermöglicht und somit die Welt der Peptid- und Proteinchemie näher gebracht hat. Durch sein Vertrauen und auch seine Geduld gab er mir ausreichende Freiräume, jedoch auch Lenkung und Zielorientierung für die erfolgreiche Fertigstellung dieser Arbeit. Die angenehme kollegiale Atmosphäre seiner Arbeitsgruppe, die nicht zuletzt auf seine unkomplizierte und väterliche Art zurückzuführen ist, haben am Gelingen dieser Arbeit unschätzbaren Anteil gehabt.

Dem Betreuer dieser Arbeit, Dr. Norbert Schaschke, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und der mich auch durch schwierige Zeiten begleitet hat, gilt ebenfalls mein ganz besonderer Dank. Sein fundiertes Fachwissen und sein reicher Erfahrungsschatz waren mir immer eine große Hilfe. Ich wünsche ihm auf dem steinigen Weg zur Professur das Allerbeste und hoffe, dass sich Bielefeld als gutes Karriere-Sprungbrett erweisen wird.

Rita Zauner, Dr. Irmgard Assfalg-Machleidt und Prof. Dr. Werner Machleidt gilt mein besonderer Dank für die viele Arbeit, die sie in die kinetischen Daten in Bezug auf Calpain und Cathepsin B und L investiert haben, Dr. Dorit Nägler für Daten zu Cathepsin X. Dr. Dusica Gabrijelcic-Geiger und Professor Dr. Christian Sommerhoff danke ich für Experimente zu den Photoaffinitäts-Peptiden.

Meiner Mutter möchte ich für Ihre bedingungslose Liebe und Unterstützung danken. Ohne sie wäre ich niemals zu dem geworden, der ich heute bin.

Meiner wundervollen Alex, die mich besonders in den kritischen letzten Wochen mit Ihrer unendlichen Liebe und ihrem Verständnis gestützt und immer wieder auf den Boden zurück geholt hat, danke ich aus tiefstem Herzen. Ich freue mich auf das große Abenteuer, das uns beiden noch bevorsteht. Meinem Sohn David sei besonders dafür

gedankt, dass er die Welt für mich jeden Tag in ein neues Licht rückt und dass immer die Sonne aufgeht wenn er lacht.

Meinem Laborspezl Markus „Schütti“ Löweneck sei für die kurzweilige Zeit und für die skurrilen Einfälle gedankt, und dafür dass mein Fundus an lustigen, albernen und teilweise sinnlosen Sprüchen unendlich erweitert wurde. Alles Gute Dir und Vroni und viel Erfolg in der Schweiz mit Eurer kleinen Familie. Die Fahrt nach „Patatine Terme“ mit Verzehr einer „Pizza Pippistrello“ steht noch aus!

Alina Ariosa Alvarez danke ich für eine besonders innige Freundschaft und ihre immerwährende Geduld mit meinen Bemühungen „muy español“ zu werden. Siempre te va a pertenecer parte de mi alma!

Für die vielen Stunden die sie für mich vor dem ESI-MS verbracht und mir die Wunderwelt der Massenspektrometrie gezeigt hat, danke ich Elisabeth „Lissy“ Weyher-Stingl ebenso wie für ihre stetige Hilfsbereitschaft und Herzlichkeit. Silva Andric bekommt von mir den goldenen Michelin-Stern für besondere Verdienste um das leibliche Wohl unserer Gruppe verliehen, außerdem den eisernen Zerberus für die Verteidigung der vermeintlich zur Core Facility gehörenden Utensilien, wie beispielsweise HPLC-Gläschen. Jürgen Musiol danke ich dafür, immer hilfsbereit und zusätzlich ein wandelndes Lexikon der Extraklasse zu sein. Und überhaupt einfach dafür, dass er so ist wie er ist.

Alexander Georg Hermann Wilhelm Milbradt sei dafür gedankt, dass er immer einen dummen Spruch auf Lager hatte, besonders für den „Dienstschluss“. Die gemeinsame Erkundung Prags und das unsicher Machen der größten Disco Mitteleuropas werden mir lange im Gedächtnis bleiben. Dirk Barth und Markus Kaiser werden mir als meine hessische Basis in der bayrischen Diaspora für immer unvergessen bleiben, Letztgenannter auch zusammen mit seiner wundervollen Frau, Barbara Saccá, als ein wichtiger Grund mehr, Italien und -wenn es sein muss- Dortmund zu besuchen. Leslie Barth, geborene Hötzer hat nicht nur als liebe Freundin, sondern auch als geduldige Schwimmtrainerin und Helferin beim Vernichten der Unmengen von Schokolade, die zum Anfertigen dieser Arbeit unabdingbar waren, einen besonderen Platz in meinem Herzen verdient. Ich drücke Dir die Daumen mit Deinem neuen Tamagochi, meins bereitet mir schon viel Freude. Ursula Sauer, die auch in schwierigen Zeiten immer

eine ganz besondere Freundin war und mir bei meinen ersten Versuchen in der Biochemie helfend zur Seite stand, danke ich für ihre Liebe und ihre einfach unnachahmliche Art. Ulrike Kusebauch muss erwähnt sein für den Versuch, mit mir Salsa zu tanzen. Emina Savarese ebenfalls für Versuche, Salsa mit mir und nicht gegen mich zu tanzen und für ihre liebevolle Freundschaft. Meinen italienischen Amici Barbara Mulinacci, Alessandra Barazza, Carlo Siciliano, Sergio Cadamuro und der „Italienerin ehrenhalber“ Marion Götz danke ich dafür, dass sie mir den Unterschied zwischen Nudeln und Pasta erklärt haben und mir auch ansonsten Einblicke in die Lebens- und Denkweise Italiens gewährten. Cyril Boulegue sei für Einblicke in die Welt der „fronßösischen“ Lebensart und für den tollen Akzent gedankt. Als Vorzeigebayer wird Markus Michael Müller mit seinen Erläuterungen zur bayrischen Lebensart und zum Leben im Allgemeinen meine Erinnerungen an die Zeit in München prägen. Dem großen schwäbischen Proteinchemiker und Leiter der Core Facility des Max Planck Institutes, Stefan Übel, danke ich, neben anderen Dingen, besonders dafür, dass er mit der vollständigen Übernahme unserer Abteilung gewartet hat, bis alle Doktoranden fertig mit ihrer Laborarbeit waren. Tabby Prajna Paramita Pal wird mir in ihrer ungewöhnlichen Art als Botschafterin ihrer indischen Heimat in freundlicher Erinnerung bleiben. Your Ghanesha statue will get an honorary place so it can always bring me luck when times get rough. Vidya Prasad danke ich für die Hilfe mit meinen Stipendiums-Anträgen und die Freizeitgestaltung im Kletterzentrum Thalkirchen.

Meinen Freunden und Studienkollegen aus Frankfurt, besonders Kathrin Gunkel, Hans-Jürgen Walther, Christoph Timm, Marcus Hey und Louis Sebastian Sonntag danke ich für die gute Zeit, die wir im Studium hatten. Sie werden immer ein Grund mehr sein Frankfurt zu besuchen, oder Ort an dem sie sich sonst aufhalten mögen.

Robert Knall muss an dieser Stelle ebenfalls dankend erwähnt werden, da ohne ihn etliche Rechtschreibfehler unentdeckt geblieben wären. Zu guter Letzt möchte ich auch Melinda Kurin, der Patin meines Sohnes, danken, die immer für mich da war und ohnehin von allen die Beste ist.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bereits teilweise veröffentlicht in:

**José Maria Pfizer**, Irmgard Assfalg-Machleidt, Werner Machleidt, Luis Moroder und Norbert Schaschke, (2005). Primed site probing of Papain-like cysteinproteases. In: Peptides 2004: Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International and 28<sup>th</sup> European Peptide Society Symposium, M. Flegel, M. Fridkin, C. Gilon and J. Slaninova, eds. (Kenes int., Geneva, Switzerland), pp. 668-669

Posterpräsentationen:

2004: 3<sup>rd</sup> International and 28<sup>th</sup> European Peptide Society Symposium -  
*Bridges Between Disciplines*, 5.-10. September 2004, Prag,  
Tschechische Republik

Vorträge:

2003: 20<sup>th</sup> Winter School on Proteinases and Their Inhibitors, Tiers, Italien  
2005: 22<sup>nd</sup> Winter School on Proteinases and Their Inhibitors, Tiers, Italien

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	PROTEASEN .....	1
1.1.1	Allgemeines .....	1
1.1.2	Cysteinproteasen.....	3
1.2	CATHEPSINE .....	5
1.2.1	Struktur .....	5
1.2.2	Physiologie.....	8
1.2.3	Pathophysiologische Folgen von Fehlfunktionen der Cathepsine .....	10
1.3	CALPAIN .....	12
1.3.1	Allgemeines .....	12
1.3.2	Struktur .....	13
1.3.3	Aktivierung und Regulation, Autolyse .....	17
1.3.4	Kalziumbindung.....	18
1.3.5	Weitere regulatorische Faktoren.....	20
1.3.6	Physiologie und Pathologie .....	22
1.4	CALPASTATIN.....	24
1.4.1	Struktur .....	24
1.4.2	Regulation.....	27
1.5	INHIBITOREN DER PAPAINÄHNLICHEN CYSTEINPROTEASEN .....	28
1.5.1	Allgemeines .....	30
1.5.2	Aldehyde .....	31
1.5.3	$\alpha$ -Methylketone und Vinylsulfone .....	32
1.5.4	Epoxybernsteinsäure-Derivate.....	33
1.5.5	Abschließende Bemerkungen .....	41
1.6	SUBSTRATBIBLIOTHEKEN.....	42
1.6.1	Vergleich natürlicher Substrate .....	42
1.6.2	Positional scanning combinatorial libraries (PS-SCL).....	43
1.6.3	Phage-display .....	44
1.6.4	Randomisierte harzgebundene Peptide.....	45
1.6.5	Oriented Peptide Libraries - zielgerichtete Peptidbibliotheken.....	46

<b>2</b>	<b>AUFGABENSTELLUNG .....</b>	<b>48</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....</b>	<b>50</b>
3.1	KONZEPT DER P'-BIBLIOTHEKEN FÜR CALPAINE UND CATHEPSINE.....	50
3.1.1	Synthese der P'-Sonden .....	54
3.1.1.1	Synthese des Ankerbausteins Ep-460.....	54
3.1.1.2	Synthesekonzept der P'-Bibliotheken.....	55
3.1.1.3	Synthese der P1'-Bibliotheken .....	56
3.1.1.4	Synthese der P2'-Bibliotheken .....	57
3.1.1.5	Synthese der Cathepsin X P1'-Bibliotheken .....	58
3.1.1.6	Vergleich der S1'-Präferenzen von $\mu$ -Calpain, Cathepsin B und L .	59
3.1.1.7	$\mu$ -Calpain S2'-Präferenzen – Dekonvolution der P1' Alanin-Bibliothek.....	64
3.1.1.8	Cathepsin B S2'-Präferenzen – Dekonvolution der P1' Alanin-Bibliothek.....	66
3.1.1.9	Cathepsin B S2'-Präferenzen – Dekonvolution der P1' Leucin-Bibliothek .....	67
3.1.1.10	Cathepsin L S2'-Präferenzen – Dekonvolution der P1' Leucin-Bibliothek .....	71
3.1.1.11	S1'-Präferenzen von Cathepsin X.....	74
3.1.2	Resümee.....	75
3.1.3	S1'-Präferenzen der Staphopaine A und B .....	76
3.2	CP1B-PEPTIDE .....	78
3.2.1	Synthesen der CP1B-Peptide .....	78
3.2.1.1	Synthese terminal verkürzter CP1B Peptide.....	78
3.2.1.2	Synthese zyklischer homodetischer CP1B-Derivate .....	80
3.2.2	Kinetik der Interaktion verschiedener CP1B-Peptide mit $\mu$ -Calpain .....	82
3.2.2.1	Terminal verkürzte CP1B-Peptide.....	82
3.2.2.2	Zyklische homodetische CP1B-Peptide .....	89
3.3	CP1B PHOTOAFFINITÄTS-PEPTIDE .....	99
3.3.1	Synthese von CP1B Photoaffinitäts-Sonden .....	99
3.3.2	Ausgangsmaterial.....	101

3.3.3	Kinetische Messungen der CP1B Photoaffinitäts-Sonden .....	101
3.3.4	CP1B-Photoaffinitäts-Experimente .....	102
3.3.4.1	Verlauf der Photoreaktion von JMP120 und 121 mit $\mu$ -Calpain....	102
3.3.4.2	Kompetition von JMP120, 121, 122 mit CP1B.....	103
3.3.4.3	Kompetition von JMP120 und 122 mit Ep-460.....	104
3.3.4.4	Untersuchung zur Autolyse von $\mu$ -Calpain mit JMP120.....	105
3.3.4.5	Untersuchung zum Chymotrypsin-Verdau von $\mu$ -Calpain.....	106
3.3.4.6	Vergleich mit anderen Studien .....	108
<b>4</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK .....</b>	<b>110</b>
4.1	P'-BIBLIOTHEKEN .....	110
4.2	CP1B-PEPTIDE .....	112
<b>5</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL .....</b>	<b>114</b>
5.1	MATERIAL UND METHODEN.....	114
5.2	ALLGEMEINE ARBEITSVORSCHRIFTEN.....	122
5.2.1	Vorschriften zur Peptidsynthese .....	122
5.2.2	Proteinchemische Arbeiten mit Photoaffinitätspeptiden .....	125
5.3	SYNTHESEVORSCHRIFTEN .....	127
5.3.1	Synthese des Ankerbausteins Ep-460.....	127
5.3.2	Synthesen der P'-Bibliotheken .....	136
5.3.3	Synthesen der CP1B-Peptide:.....	145
<b>6</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>152</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>156</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Proteasen

### 1.1.1 Allgemeines

Geschichte und Entwicklung der Enzymologie sind eng mit der Entdeckung der ersten Proteasen verknüpft. 1833 wurde der aus Malzlösung isolierte Amylase-Enzymkomplex von Jean-François Persoz und Anselm Payen mit dem Begriff „Diastase“ (vom griechischen *diástasis*: Sonderung) belegt<sup>[1]</sup>. Wilhelm Friedrich Kühne ersetzte diesen Ausdruck 1877 durch das Wort „Enzym“ (vom griechischen *en zyme*: in Sauerteig)<sup>[2, 3]</sup>. Außerdem wurde eine in Verdauungssäften gefundene Substanz mit der Fähigkeit Proteine zu abzubauen beschrieben, die als „Trypsin“ bezeichnet wurde. Mit diesem Ereignis wurde eine neue Ära der Forschung eingeläutet, die sich der Isolierung, Reinigung und strukturellen Charakterisierung dieser neuartigen biologischen Katalysatoren widmete. Eine Vielzahl proteolytischer Enzyme wurde nicht nur in Verdauungssäften, sondern auch in anderen menschlichen Seren und Geweben, sowie in Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen entdeckt. Einen Überblick über die Geschichte der Proteasen bietet ein Übersichtsartikel von Barrett<sup>[4]</sup>. Mittlerweile existiert eine imposante Ansammlung exakter Daten über Strukturen, katalytische Mechanismen und Inhibition einer nahezu unüberschaubaren Menge von Proteasen. Etwa 500 bis 600 Proteasen wurden im humanen Genom gefunden<sup>[5]</sup>. Tatsächlich wird in Lehrbüchern der Biologie die Funktion von Enzymen der Anschaulichkeit halber meist am Beispiel von Proteasen erklärt.

Proteasen (auch als Peptidasen oder Peptidhydrolasen bezeichnet) bewerkstelligen die Spaltung von Peptidbindungen durch Hydrolyse. Teilt man sie in verschiedene Klassen ein, so kann dies nach ihrem Spaltungsmuster oder dem Spaltmechanismus geschehen. Aus der ersten Darstellungsweise ergeben sich die Klassen der Endopeptidasen, welche inmitten eines Substrats spalten, und Exopeptidasen, die einzelne Aminosäuren oder kurze Peptide von den Termini der Substrate entfernen. Letztere können in Carboxy- und Aminopeptidasen eingeteilt werden, je nachdem an welchem Ende der Aminosäuresequenz die Spaltung eintritt. Die zweite Einteilung

unterscheidet Proteasen nach ihren katalytischen Zentren in Serin-, Cystein-, Aspartat-, Threonin- und Metalloproteasen<sup>[5]</sup>. Erst kürzlich wurde in *Aspergillus niger* var. *macrosporus* eine Protease entdeckt, welche einen katalytisch aktiven Glutaminsäurerest besitzt<sup>[6]</sup>. Barrett führte 1979 eine formelle Unterteilung ein, in der evolutionär weitläufig verwandte Proteasen in Klans eingruppiert werden, die wiederum in Familien näher verwandter Enzyme unterteilt sind. Diese Unterteilung wurde bis heute beibehalten und wird fortlaufend um neue Mitglieder erweitert<sup>[7-10]</sup>.

Da Proteasen ursprünglich in Verdauungssekreten und Gewebshomogenaten entdeckt wurden, waren sie lange Zeit gängiger Lehrmeinung zufolge ausschließlich an der „Entsorgung“ von Proteinen beteiligt. Mit der Entdeckung von Zymogenen und der Aufklärung der Blutgerinnungskaskade anfangs der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurde jedoch offensichtlich, dass spezifische und limitierte Proteolyse zu den meisten fundamentalen biologischen Mechanismen beiträgt und eine wichtige Rolle in deren Regulation spielt. Mittlerweile ist bekannt, dass Proteasen entscheidende Bedeutung in vielen biologischen Prozessen wie zellulärer Entwicklung, Morphogenese, intrazellulärer Signaltransduktion, Befruchtung, Blutgerinnung, Zellteilung, -migration und -wachstum, Transkriptionskontrolle, Apoptose und der Aktivierung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren zukommt.

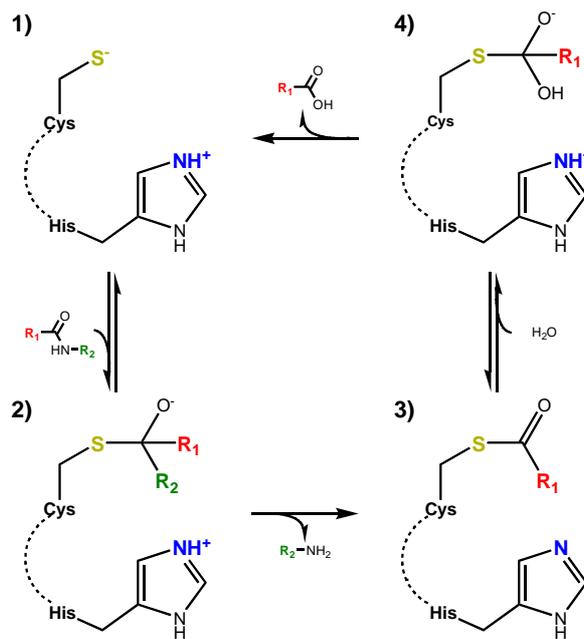
Da die proteolytische Prozessierung von Proteinsubstraten im Gegensatz zu anderen posttranslationalen Modifikationen irreversibel ist, unterliegen Proteasen unter physiologischen Bedingungen strikten Regulationsmechanismen. Tatsächlich werden die meisten Proteasen zunächst in Form inaktiver Zymogene synthetisiert, die wiederum auf spezifische Signale hin aktiviert werden. Dies kann durch limitierte Proteolyse und/oder konformationelle Umwandlungen nach Bindung von Cofaktoren oder dem Entfernen von Inhibitoren geschehen. Die Existenz solcher endogener Inhibitoren, welche teilweise spezifisch für ihre jeweilige Zielprotease sind, stellt einen wichtigen Schutzmechanismus vor unerwünschter proteolytischer Aktivität dar. Zusätzlich wird die Aktivität der meisten Proteasen durch ihre starke Abhängigkeit von den Bedingungen in ihrer Umgebung begrenzt. Hierbei spielen Faktoren wie der umgebende pH-Wert oder die Konzentration bestimmter Ionen, sowie die Lokalisierung innerhalb eng abgegrenzter Zellkompartimente wie zum Beispiel

Lysosomen oder Umgebungen wie der extrazellulären Matrix die entscheidende Rolle. Viele Proteasen werden nur in bestimmten Geweben oder Körperflüssigkeiten exprimiert, eng gekoppelt an ihre physiologische Funktion.

Mangelnde Regulation der Proteolyse bringt meist verheerende Konsequenzen mit sich. So kann unphysiologische Proteaseaktivität abnorme Entwicklung bereits im Embryonalstadium verursachen und zudem eine große Zahl schwerwiegender Krankheitsbilder hervorrufen. Die Mechanismen der Infektion sowie der Vermehrung vieler pathogener Organismen, wie mehr- und einzelliger Parasiten, Pilze, Bakterien und Viren, basieren ebenfalls auf der Wirkung von Proteasen oder aber auf der Inhibition wirtseigener Proteasen. Daher stellen sowohl humane als auch parasitäre Proteasen interessante Ziele für therapeutische Behandlungen dar. Die Erfolgsgeschichte von Captopril und verwandten ACE-Inhibitoren zur Behandlung von Bluthochdruck und die Verwendung von HIV-Proteasehemmstoffen zur Unterstützung der Therapie HIV-infizierter Patienten seien hier als Beispiele angeführt. Im Licht solcher Errungenschaften wird die Bedeutung fortgesetzter Forschungstätigkeit auf dem Gebiet der Proteasen und ihrer Inhibitoren deutlich. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Entwicklung spezifischer Inhibitoren für papainähnliche Cysteinproteasen, einer wichtigen Klasse regulatorischer Enzyme.

### **1.1.2 Cysteinproteasen**

Peptidasen, deren katalytische Wirkung auf der Aminosäure Cystein basiert, werden in die Familie der Cysteinproteasen (auch als Sulfhydryl- oder Thiolproteasen bezeichnet) eingruppiert. In allen Cysteinproteasen sind die drei Aminosäuren der katalytischen Triade, Cystein, Histidin und Asparagin konserviert. Cys<sup>25</sup> und His<sup>159</sup> bilden ein von Asn<sup>175</sup> (Papain-Nummerierung) über eine Wasserstoffbrücke stabilisiertes Ionenpaar. Während der Peptidspaltung wird aus dem Cystein-Thiol und dem Carbonyl der zu spaltenden Peptidbindung ein tetrahedrales Zwischenprodukt gebildet, welches durch das sogenannte Oxyanionen-Loch auf der Oberfläche der Protease stabilisiert wird. Nach Abspaltung des C-terminalen Teils des Substrats wird das nun als Thioester vorliegende Enzym durch Hydrolyse regeneriert, wobei erneut eine tetrahedrale Zwischenstufe durchschritten wird (siehe Abbildung 1).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des katalytischen Mechanismus der Cysteinproteasen**

Im Hinblick auf ihre evolutionäre Entwicklung werden Cysteinproteasen in sieben Klans unterteilt, welche insgesamt über 40 Familien enthalten<sup>[7, 11]</sup>. Klan CA, die größte Untergruppe der Cysteinproteasen, umfasst alle Proteasen, die strukturelle Homologie mit Papain aufweisen. Sieht man von den weitreichenden Unterschieden innerhalb des Klans ab, ist allen Mitgliedern die Struktur der katalytischen Einheit gemein. Diese ist in einer Einbuchtung zwischen zwei Domänen gelagert, die jeweils einen Teil der katalytischen Domäne enthalten<sup>[12]</sup>. Die papainähnlichen Cysteinproteasen sind weiter in Familie C01 (Cathepsine) und C02 (Calpaine) unterteilt. Im folgenden Abschnitt werden die Cathepsine näher betrachtet, den Calpainen ist ein eigener Abschnitt gewidmet (siehe 1.3)

**Tabelle 1: Klans der Cysteinproteasen<sup>[11]</sup>**

Klan	Stammenzym
CA	Papain
CD	Caspase-1
CE	Adenain
CF	Pyroglutamylpeptidase I
CH	Hedgehog Protein
CL	Sortase B
C-	nicht zugeordnet

## 1.2 Cathepsine

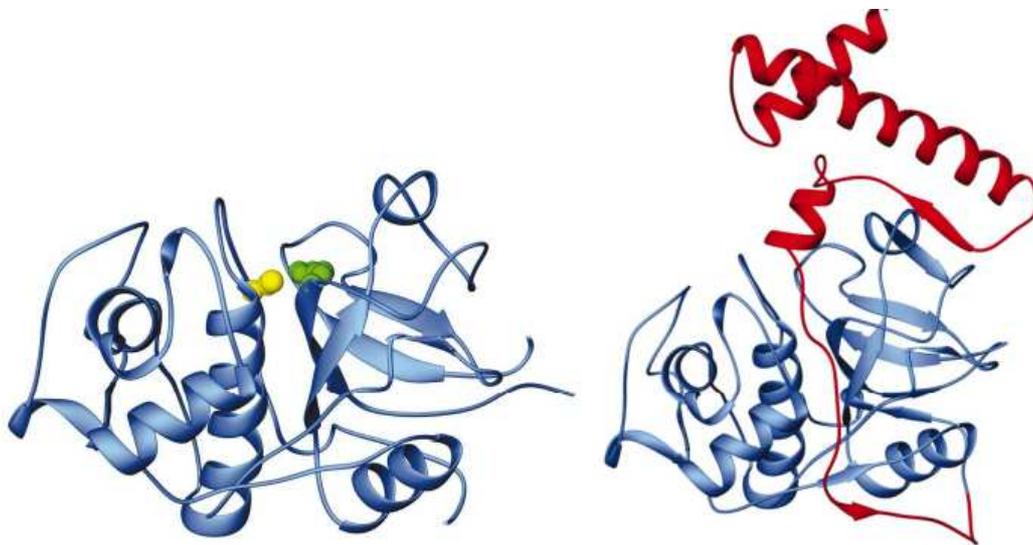
Die nach dem griechischen Wort *kathepsô* für „verdauen“ benannten Cathepsine sind eine Familie ubiquitär verbreiteter Proteasen. Ihre Mitglieder konnten in allen Tieren und Pflanzen identifiziert werden, homologe Enzyme existieren sogar in Einzellern, Bakterien und Viren<sup>[13]</sup>. Bisher wurden elf humane Cystein-Cathepsine (B, C, F, H, L, K, O, S, V, X und W) auf DNA-Ebene identifiziert, und bis auf Cathepsin O und W mittels Röntgenstrukturanalyse charakterisiert<sup>[14, 15]</sup>. Bei den humanen Cathepsinen D, E, A und G handelt es sich um Aspartyl-, beziehungsweise Serinproteasen, die hier nicht weiter behandelt werden sollen.

### 1.2.1 Struktur

Allen Cystein-Cathepsinen (im Weiteren als „Cathepsine“ bezeichnet) ist gemeinsam, dass sie aus einem aus 10 bis 20 Aminosäuren bestehenden Signalpeptid, einem Propeptid und einer katalytischen Domäne bestehen. Sie besitzen ein Molekulargewicht von 22-28 kDa, mit Ausnahme des tetrameren Cathepsin C mit einem Molekulargewicht von 200 kDa<sup>[16]</sup>. Die Propeptide variieren in Ihrer Länge zwischen 36 Aminosäuren in humanem Cathepsin X und 315 in Falcipain-1, aus *Plasmodium falciparum*. Das Propeptid verläuft hierbei in umgekehrter Orientierung der Substrat-Bindung in gestreckter Konformation durch den katalytischen Spalt und blockiert die katalytische Aktivität der Protease, wobei der katalytische Spalt bereits korrekt formiert ist. Auch nach ihrer Abspaltung können die Propeptide als hochaffine reversible Inhibitoren eine vorzeitige Aktivierung der Protease verhindern<sup>[17-21]</sup>, wobei ihre Spezifität in manchen Fällen auf die gesamte Familie der Cathepsine ausgedehnt ist, so dass auch verwandte Enzyme inhibiert werden<sup>[17, 18, 22]</sup>. Zusätzlich zu ihrer inhibitorischen Funktion können die Propeptide als eine Art Gerüst die Faltung der katalytischen Domäne unterstützen<sup>[23-25]</sup> oder als Chaperone den Transport des Proenzym in das endosomal-lysosomale Kompartiment unterstützen<sup>[26, 27]</sup>.

Die katalytischen Domänen dieser papainähnlichen Cysteinproteasen bestehen aus etwa 220 bis 260 Aminosäuren, mit der Ausnahme einiger parasitärer Proteasen, deren zusätzliches C-terminales Fragment vermutlich an der Erkennung der Wirtsproteine beteiligt ist<sup>[28]</sup>. Generell ist die dreidimensionale Struktur aller humanen

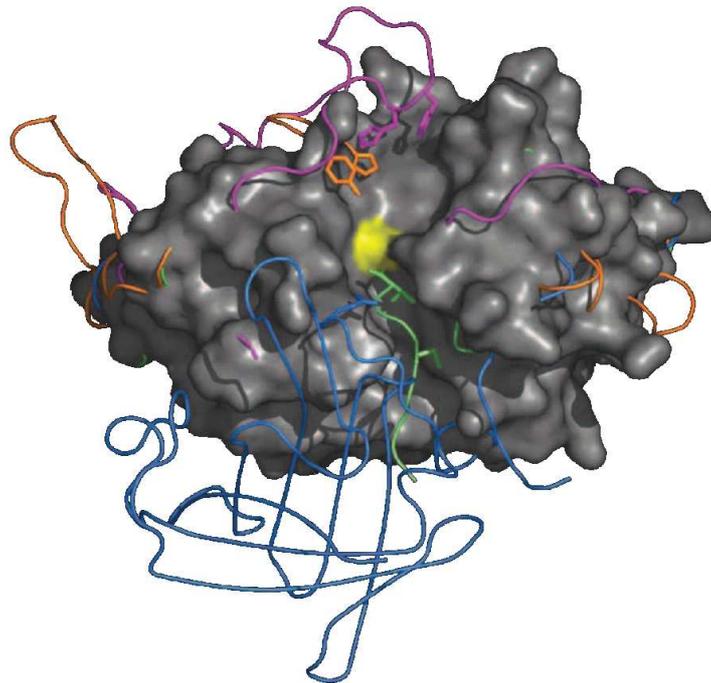
Cathepsine, bestehend aus einer L- (für *left*) und R-Domäne (für *right*) sehr ähnlich<sup>[29]</sup>. Cys<sup>25</sup> (Papain-Nummerierung) des aktiven Zentrums befindet sich in der L-Domäne, während His<sup>159</sup> der katalytischen Triade in der R-Domäne lokalisiert ist. Das katalytisch aktive Cys<sup>25</sup> ist in eine stark konservierte Sequenz, CGSCWAFS, eingebettet, ähnlich wie die beiden anderen Aminosäuren der katalytischen Triade. Der  $pK_s$  der katalytischen Thiolgruppe beträgt etwa 2,5-3,5<sup>[30]</sup>. Auch in anderen Regionen weisen die Mitglieder der Familie einen hohen Grad an Homologie auf. Insgesamt sind die Bindungsstellen der Cathepsine nicht besonders ausgeprägt strukturiert. Nur S2, S1 und S1' bilden definierte Taschen aus, während S4, S3, S2' und S3' eher Bindungsareale darstellen<sup>[31]</sup>.



**Abbildung 2:** Bänder-Darstellung der Strukturen von Cathepsin L (links) und Procathepsin L (rechts). Die Proteasedomänen sind jeweils blau, das Propeptid rot eingefärbt. Das katalytische Cystein (gelb) und Histidin (grün) sind in Kalotten-Darstellung eingefügt. Entnommen aus<sup>[32]</sup>.

Die Cathepsine können aufgrund von Sequenz-Homologien weiter in Cathepsin B-, Cathepsin L- und Cathepsin F-ähnliche Proteasen unterteilt werden. Cathepsin L-<sup>[33]</sup> und F-ähnliche<sup>[34]</sup> Proteasen zeichnen sich durch konservierte Regionen innerhalb ihrer Propeptide aus, erstere tragen einen „ERFNIN“-Einschub in ihrem Propeptid. Cathepsin B-ähnliche Enzyme besitzen einen sogenannten *occluding loop* (etwa „Verschlusschleife“), eine Insertionssequenz von etwa 20 Aminosäuren<sup>[35]</sup> zwischen dem katalytischen Cystein und dem konservierten Pro-Tyr-Motiv, der zwei benachbarte Histidinreste, His<sup>110</sup> und His<sup>111</sup> (humanes Cathepsin B), enthält. Diese treten mit der C-terminalen Carboxylgruppe der Substrate in Wechselwirkung,

verankern sie in der S2'-Tasche, und bestimmen somit die Carboxydipeptidase-Aktivität von Cathepsin B<sup>[35]</sup>. Die Protease ist jedoch nicht strikt auf Exopeptidase-Aktivität beschränkt. Die Präferenz an den Termini oder in der Mitte eines Substrats zu spalten wechselt durch konformationelle Änderungen des *occluding loop* in Abhängigkeit des pH<sup>[36, 37]</sup>. Bei niedrigem pH wird dieser zur Oberfläche der Protease gezogen und blockiert somit einen Teil des katalytischen Spalts, während bei höherem pH seine konformationelle Freiheit größer ist und weitere Bindungsstellen zugänglich werden<sup>[38]</sup>. Eine Studie mit Mutationen an verschiedenen Stellen der Protease zeigte, dass die Salzbrücke zwischen His<sup>110</sup> und Asp<sup>22</sup> den entscheidenden Beitrag zur Fixierung des *occluding loop* in der geschlossenen Konformation liefert<sup>[39]</sup>. Hieraus ergibt sich auch die beobachtete pH-Abhängigkeit synthetischer Inhibitoren für Cathepsin B<sup>[40]</sup>. Messungen neueren Datums bestimmten einen  $pK_s$  von 4.4 für die Konformationsänderung<sup>[40]</sup>, so dass beim lysosomalen pH von etwa 4,5-5,0 gemischte Exo- und Endopeptidase-Aktivität von Cathepsin B anzunehmen ist.



**Abbildung 3: Strukturelemente der Familie C01 Exopeptidasen. Zusätzliche Ketten und Stäbchenmodelle essentieller Seitenketten der Cathepsine H (grün), C (blau), B (pink) und X (orange) sind über die Struktur von Cathepsin L gelegt. Das katalytische Zentrum ist gelb gefärbt. Entnommen aus<sup>[41]</sup>.**

Die Carboxymonopeptidase-Aktivität von Cathepsin X wird durch den aus nur drei Aminosäuren bestehenden sogenannten *mini loop* bestimmt<sup>[42, 43]</sup>, der über His<sup>234</sup> den

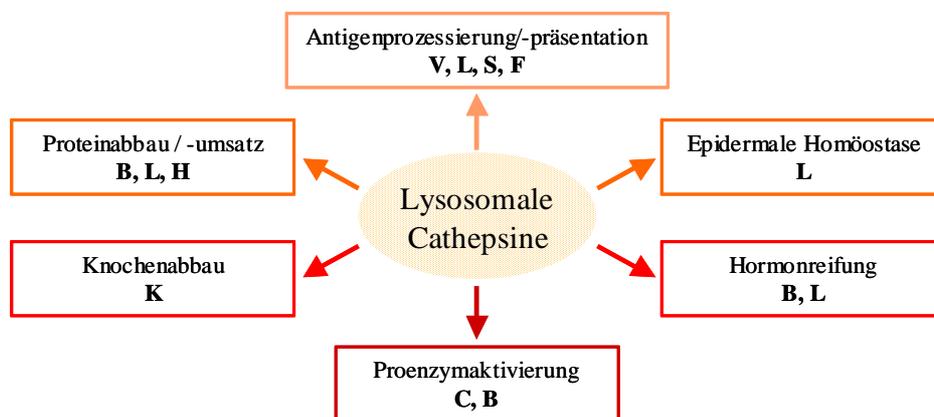
Carboxy-Terminus des Substrats fixiert. Die Aminomono-peptidase-Aktivität von Cathepsin H ist auf der sogenannten *Mini-Kette* begründet. Dieses aus dem Propeptid stammende Oktapeptid ist über eine Disulfidbrücke am Enzym befestigt und blockiert die S2-Bindungstasche. Die Carboxylfunktion des C-terminalen Threonin tritt mit dem Aminoterminus des Substrats in Wechselwirkung und fixiert diesen<sup>[31]</sup>. Bei Cathepsin C liegen vier voneinander katalytisch unabhängige aktive Zentren auf der Oberfläche des Komplexes; der Zusammenhalt der Untereinheiten wird von der sogenannten Ausschlussdomäne gewährleistet. Diese zusätzliche Domäne blockiert zudem das katalytische Zentrum nach der S2-Tasche, in welcher der Aminoterminus des Substrats über ein essentielles Cl<sup>-</sup>-Ion gebunden wird, weshalb Cathepsin C als Aminodipeptidase wirkt. Die Cathepsine F, L, K, O, S und V sind Endopeptidasen.

### 1.2.2 Physiologie

Im Allgemeinen sind Cathepsine nicht besonders selektiv in bezug auf die Auswahl ihrer Substrate. Die Prozessierung eines bestimmten Substrats wird vornehmlich durch seine co-Lokalisation mit der Protease bestimmt. Es zeigte sich, dass der Modus der Substratbindung nicht strikt konserviert ist. Aufgrund der räumlichen Freiheiten im Bereich der Bindungsareale außerhalb von S2, S1 und S1' bindet jedes Substrat auf individuelle Weise<sup>[31]</sup>. Lange Zeit wurde daher den humanen Cathepsinen eher geringe Aufmerksamkeit geschenkt, da man annahm, sie seien ausschließlich am unspezifischen lysosomalen Abbau von Proteinen beteiligt. Studien mit Protease-negativen Mäusen zeigten jedoch, dass die Enzyme dieser Familie wichtige und spezifische Aufgaben in verschiedenen Bereichen<sup>[44]</sup>, wie Antigenpräsentation, Abbau und Umstrukturierung von Knochen und die Aktivierung von Zymogenen erfüllen, und führten so in den 1980er Jahren zu einem Paradigmenwechsel.

Cathepsine werden als pre-Proenzyme exprimiert und mit Hilfe des Signalpeptids über den Mannose-6-Phosphat-Weg durch die ER-Membran zu den Lysosomen transportiert<sup>[45, 46]</sup>, wo sie durch Abspaltung des Propeptids aktiviert werden<sup>[47, 48]</sup>. Sie sind jedoch nicht strikt lysosomal, sondern besitzen teilweise wechselnde Aufenthaltsorte zwischen Phagosomen, Endosomen und Lysosomen. Cathepsin B, L und H sind ubiquitär in Säugetiergeweben<sup>[49]</sup>, andere Cathepsine hingegen werden

gewebsspezifisch exprimiert. So wird Cathepsin S in aus dem Knochenmark stammenden Immunzellen gefunden, in denen es seine Aufgabe bei der Prozessierung der invarianten Kette des MHC Klasse II verrichtet<sup>[50, 51]</sup>. In anderen Zellen übernehmen Cathepsin L und F diese Funktion<sup>[52, 53]</sup>. Weitere Funktionen von Cathepsin L sind mit der epidermalen Homöostase und der Morphogenese der Haarfollikel verknüpft<sup>[54]</sup>. Cathepsin K ist in Osteoklasten lokalisiert, wo es an Knochenabbau und -umstrukturierung beteiligt ist<sup>[26, 55]</sup>. Cathepsin V wird vorrangig in Thymus, Hoden und der Cornea exprimiert<sup>[34]</sup>. Cathepsin W (Lymphopain) kommt ausschließlich in CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten vor, seine Funktion ist jedoch weiterhin unklar<sup>[56]</sup>. Studien mit Cathepsin C-negativen Mäusen ergaben, dass diese Protease die Prozessierung einer Reihe von Proenzymen bewerkstelligt<sup>[57, 58]</sup>.



**Abbildung 4: Physiologische Aufgaben der Cathepsine**

Da das pH-Optimum der Cathepsine im sauren Milieu liegt, erreichen sie im lysosomalen Kompartiment ihre maximale Aktivität<sup>[49]</sup>, mit Ausnahme von Cathepsin S, welches bei neutralem pH maximal aktiv ist<sup>[59]</sup>. Tatsächlich büßen die Säugetier-Cathepsine mit Ausnahme von Cathepsin S bei neutralem pH rasch an Aktivität ein<sup>[60]</sup>, was einen möglichen Schutzmechanismus vor ungewollt in das Zytosol ausgetretenen Proteasen darstellt. Im Gegensatz dazu zeigen viele parasitäre Cysteinproteasen maximale Aktivität bei neutralem oder leicht alkalischem pH<sup>[61]</sup>, wie er im extrazellulären Raum auftritt. So können Cathepsine parasitären Ursprungs ihre Wirkung bei der Invasion von Gewebe und Zellen, der Nahrungsaufnahme, Protein- und Matrixdegradation, beim Schlüpfen und der Umgehung des wirtseigenen Immunsystems entfalten<sup>[62]</sup>. Die Aktivität der Cathepsine wird *in vivo* zusätzlich durch

die Proteine der Cystatin-Superfamilie kontrolliert. Diese werden unterteilt in Stefine (Familie 1), Cystatine (Familie 2) und Kininogene (Familie 3)<sup>[35]</sup>. Ihre Hauptaufgabe ist der Schutz des Organismus vor durch unregelmäßige Aktivität der Cathepsine verursachten Schäden, sowie vor pathogenen Cathepsinen von Parasiten<sup>[63, 64]</sup>.

Eine interessante Auswirkung nichtlysosomaler Aktivität von Cathepsinen ist, dass die Cathepsine B, L und D Apoptose auch dann auslösen können, wenn der durch Caspasen vermittelte programmierte Zelltod aufgrund von Mutationen unterbunden ist, wie beispielsweise in Tumorzellen<sup>[65]</sup>. Tatsächlich werden viele Tumoren durch ihre Transformation und Immortalisierung hypersensitiv für die durch Tumornekrosefaktor ausgelöste Cathepsin B-vermittelte Apoptose<sup>[66]</sup>. Hier besteht prinzipiell die Möglichkeit, Cathepsine durch Stimulation ihrer Expression oder Ausschalten der Inhibitoren nutzbar zu machen. Die Beteiligung der Cathepsine an alternativen Wegen der Apoptose beruht auf ihrer Freisetzung nach Permeabilisierung der Lysosomen-Membran durch Stimuli wie lysosomotrope Agenzien<sup>[67, 68]</sup>, UV-Licht<sup>[69, 70]</sup>, Sphingosin<sup>[71]</sup>, D-Galactosamin<sup>[72]</sup>, reaktive Sauerstoffspezies<sup>[73]</sup> und Substanzen die p53-unabhängige Apoptose auslösen<sup>[74]</sup>, sowie indirekt durch Caspase 8, welche nach Rezeptorbindung von TNF $\alpha$  aktiviert wird<sup>[75-78]</sup>. Die Apoptose wird über Prozessierung des Proteins Bid eingeleitet, welches die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien stimuliert. Dieses wiederum aktiviert Caspase 9, die über Caspase 3 die apoptotische Kette in Gang setzt<sup>[79]</sup>.

### **1.2.3 Pathophysiologische Folgen von Fehlfunktionen der Cathepsine**

In Verbindung mit einem Cathepsin-Defizit werden bisher nur äußerst seltene Krankheitsbilder gebracht. Es handelt sich zum einen um die Pycnodysostose, eine Knochendysplasie, die durch Mangel an Cathepsin K hervorgerufen wird<sup>[80]</sup>, zum anderen um das Papillon-Lefevre-Syndrom, einer durch Cathepsin C-Mangel hervorgerufenen Peridonthopathie<sup>[81]</sup>. Die Mehrzahl der mit einer Veränderung der Cathepsinaktivität einhergehenden Erkrankungen zeichnen sich jedoch durch eine Überexpression einer oder mehrerer dieser Proteasen aus. Eine Reihe von Erkrankungen wie Osteoporose<sup>[82, 83]</sup>, Arthritis<sup>[84-87]</sup>, Morbus Alzheimer<sup>[88]</sup> sowie die Invasivität und Metastasierung von Tumoren<sup>[89-91]</sup> werden hiermit in Verbindung

gebracht. Zusätzlich spielen Cathepsine eine wichtige Rolle beim Befall von Wirtsorganismen durch Parasiten. Daher ruhen auf der gezielten Inhibierung dieser Proteasen Hoffnungen zur Behandlung einer Vielzahl von Krankheitsbildern.

Das Krankheitsbild der Osteoporose beispielsweise zeichnet sich durch ein Ungleichgewicht zwischen Knochenaufbau und -abbau aus, was erhöhte Brüchigkeit der Knochensubstanz zur Folge hat. Zusammen mit Matrix-Metalloproteasen spielt Cathepsin K hierbei eine Rolle beim Abbau von Typ-I Kollagen<sup>[83]</sup>, welches die Knochensubstanz stabilisiert und über 20% der Knochenmasse ausmacht. Eine ähnliche Rolle kommt den Cathepsinen B, L und S vermutlich im Bereich arthritischer Erkrankungen wie Osteoarthrose<sup>[84, 85]</sup> und rheumatoider Arthritis<sup>[86]</sup> zu. Hier wird Typ-I Kollagen<sup>[92, 93]</sup> und das Proteoglycan Aggrecan<sup>[94, 95]</sup> durch Chondrozyten abgebaut, was die Schädigung des Bindegewebes in Gelenken zur Folge hat. Die schadhafte Funktion der Cathepsine beruht hierbei entweder direkt auf dem Abbau der extrazellulären Matrix<sup>[96]</sup>, oder indirekt auf der Aktivierung von pro-uPA und der mit diesem verknüpften proteolytischen Kaskade<sup>[97]</sup>. Nicht-lysosomale Aktivität von Cathepsinen spielt vermutlich eine wichtige Rolle bei Tumorerkrankungen. In dergestalt entarteten Zellen, besonders an der Invasionsfront der Tumoren, sind die Lysosomen oftmals zum Zellrand hin verschoben, so dass deren Inhalt in den extrazellulären Raum freigesetzt wird<sup>[90]</sup>. Im Mausmodell zeigte sich Verringerung des Wachstums, der Invasivität und Angiogenese von Tumoren in denen Cathepsine chemisch<sup>[98]</sup> oder auf Expressionsebene<sup>[99]</sup> unterdrückt wurden. In verschiedenen Tumorgeweben, wie Gehirn-, Colorectal- und Prostatatumoren<sup>[89, 90]</sup> konnte eine Überexpression von Cathepsin B beobachtet werden, die meist mit dem Übergang in stärker maligne Phasen<sup>[100]</sup>, verstärkter Invasivität<sup>[101-103]</sup> und allgemein einer Verschlechterung der Prognose einhergeht<sup>[104]</sup>.

Die in diesem Abschnitt beispielhaft beschriebenen Funktionen und Auswirkungen von Fehlfunktionen der Cathepsine verleihen der eingehenden Untersuchung ihrer Wirkmechanismen ebenso wie der Entwicklung neuer Konzepte zur Findung selektiver Wirkstoffe für diese Proteasen große Tragweite. Ihre gezielte Inhibierung und Modulation bietet neue Chancen zur Behandlung einer großen Zahl von Krankheitsbildern, die mit ihrer abnormen Aktivität verbunden werden.

## 1.3 Calpain

### 1.3.1 Allgemeines

Calpain<sup>[105]</sup> wurde 1964 zum ersten Mal identifiziert und als Protein mit caseinolytischer Aktivität in Rattengehirnen<sup>[106]</sup>, sowie als Phosphorylase B-Kinaseaktivator in Skelettmuskulatur von Hasen<sup>[107]</sup> beschrieben. Dayton et al. isolierten 1975 Calpain in Reinform aus der Skelettmuskulatur von Schweinen<sup>[108]</sup>. Sie beschrieben das Enzym als  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Protease, die eine Reihe von Substraten, wie Troponin, Tropomyosin und C-Protein abbaut und zudem die Fähigkeit besitzt, Z-Scheiben von intakten Myofibrillen zu entfernen. Weitere wichtige der über 100 bisher identifizierten Calpain-Substrate sind unter anderem p53, Proteinkinase C, Spectrin/Fordrin,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, Talin und Fibronectin<sup>[109-112]</sup>. Calpaine werden eingruppiert in Klan CA (Cysteinproteasen), Familie C02. Sie beziehen ihren Namen von der Bezeichnung **Calcium**-abhängige **papain**ähnliche Cysteinproteasen<sup>[113]</sup>, ein Hinweis auf ihre einzigartige Eigenschaft. Sie sind die einzigen Cysteinproteasen, deren Aktivität durch die intrazelluläre Kalziumkonzentration reguliert wird. Eine andere Bezeichnung für diese Proteasefamilie ist CANP, abgeleitet von Calcium-aktivierte neutrale Cysteinprotease. Im Gegensatz zu den Cathepsinen, die im sauren Milieu des Lysosoms aktiv sind, entfalten Calpaine ihre maximale Aktivität bei physiologischem pH von 7 bis 8,5, wie er im Zytosol zu finden ist<sup>[114]</sup>.

Die ubiquitär verbreiteten Calpaine treten in allen höheren Lebewesen auf, Homologe wurden in Hefen und Bakterien gefunden<sup>[115]</sup>. In Säugetieren konnte bisher eine Reihe Calpain-Spezies identifiziert werden, die teilweise gewebsspezifisch exprimiert werden, wie zum Beispiel Calpain 3a in Skelettmuskulatur, Calpain 8 im Magen und Calpain 9 im Verdauungsapparat (vergleiche Tabelle 2). Die bei Säugetieren in allen Geweben anzutreffenden Isoformen  $\mu$ - und m-Calpain sind die am besten untersuchten Vertreter der Familie C02. Sie unterscheiden sich durch die zur Aktivierung notwendige  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Während  $\mu$ -Calpain seine halbmaximale Aktivität *in vitro* bereits bei einer Kalziumkonzentration von 5-50  $\mu\text{M}$  entfaltet, benötigt m-Calpain eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 400-800  $\mu\text{M}$ <sup>[116]</sup>. Im weiteren Verlauf werden die ubiquitären Isoformen  $\mu$ - und m-Calpain der Einfachheit halber als „Calpain“

bezeichnet. Bei Aussagen, die sich auf eine bestimmte Form von Calpain beziehen, ist diese explizit angegeben.

**Tabelle 2: Systematische Benennung der Mitglieder der Calpain-Familie nach Goll et al.<sup>[105]</sup>. Es sind nur die in Säugetieren vorkommenden Proteasen aufgeführt. Als „typisch“ werden solche Vertreter der Familie bezeichnet, welche eine Calmodulin-ähnliche Domäne besitzen, diejenigen ohne eine solche Domäne als „atypisch“. Entnommen aus<sup>[105]</sup>.**

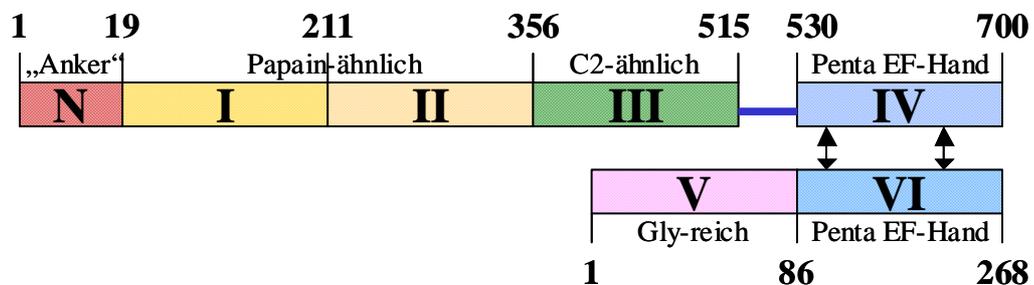
Gen	Polypeptid	Alternativ	(a)typisch	Kommentar
<i>Capn1</i>	Calpain 1	μCL, Calpain I <sup>1</sup>	typisch	μ-Calpain = Calpain 1 + 28 kDa
<i>Capn2</i>	Calpain 2	mCL, Calpain II <sup>1</sup>	typisch	m-Calpain = Calpain 2 + 28 kDa
<i>Capn3</i>	Calpain 3a Calpain 3b	nCL-1, p94 Lp82	typisch	muskelspezifisch, keine 28 kDa-Untereinheit
<i>Capn4</i>	28kDa-Untereinheit		typisch	regulatorische Untereinheit
<i>Capn5</i>	Calpain 5	nCL-3, htra3	atypisch	
<i>Capn6</i>	Calpain 6	Calpamodulin	atypisch	nicht katalytisch aktiv katalytisches Cys⇒Lys, His⇒Tyr
<i>Capn7</i>	Calpain 7	PalBH	atypisch	
<i>Capn8</i>	Calpain 8	nCL-2, 2'	typisch	
<i>Capn9</i>	Calpain 9	nCL-4	typisch	Magenkrebs
<i>Capn10</i>	Calpain 10, 10a-g		atypisch	Typ2 Diabetes mellitus
<i>Capn11</i>	Calpain 11		typisch	nur auf mRNA-Ebene
<i>Capn12</i>	Calpain 12		typisch	nur auf mRNA-Ebene
<i>Capn13</i>	Calpain 13		atypisch	nur auf mRNA-Ebene
<i>Capn14</i>	Calpain 14		typisch	nur auf mRNA-Ebene
<i>Capn15</i>	Calpain 15	SOLH	atypisch	nur auf mRNA-Ebene

<sup>1</sup> veraltete Bezeichnung

### 1.3.2 Struktur

Calpaine unterscheiden sich in ihrer Sequenz und strukturell stark von anderen papainähnlichen Cysteinproteasen, außer im unmittelbaren Bereich des aktiven Zentrums. Dieses weist die allen Mitgliedern der papainähnlichen Cysteinproteasen gemeinsame flache und wenig strukturierte Oberfläche auf. Im Vergleich zu den Cathepsinen besitzen humane Calpaine eine wesentlich größere und komplexere Struktur, die sich durch zusätzliche regulatorische Untereinheiten auszeichnet. Die meisten Calpaine sind Heterodimere, im Gegensatz zu den monomeren Cathepsinen, und bestehen aus einer katalytischen Untereinheit (L für *large*) mit einem Molekulargewicht von circa 80 kDa und einer regulatorischen (auch S für *small*) Untereinheit von 28 kDa<sup>[117, 118]</sup>. Die katalytische Untereinheit beinhaltet die Domänen I bis IV, die Regulatorische die Domänen V und VI. Im Fall von μ- und m-Calpain

sind diese folgendermaßen strukturiert: a) Domäne I und II bilden das aktive Zentrum und beherbergen die Aminosäuren der katalytischen Triade. Domäne I ähnelt Papain oder den Cathepsinen nur im Bereich der  $\alpha$ -Helix, welche das katalytische Cystein enthält. Die Faltung von Domäne II ähnelt der von Papain, wenngleich einige zusätzliche Helices vorhanden sind. b) Die  $C_2$ -ähnliche Domäne III hat Kontakte zu allen anderen Domänen. Als eine Art Signalumwandler überträgt sie strukturelle Änderungen der anderen Domänen bei Kalziumbindung auf die katalytischen Domänen. c) Die Calmodulin-ähnlichen Domänen IV und VI stellen die primären Bindungsstellen für Kalzium dar. Beide besitzen fünf kalziumbindende EF-Hand-Strukturen und sind somit Vertreter der Penta-EF-Hand Familie. d) Die glycin- und prolinreiche Domäne V, die bei der autolytischen Aktivierung abgespalten wird, sowie ein N-terminaler Anker von 19 Aminosäuren, welcher in Abwesenheit von Kalzium das aktive Zentrum mit Domäne IV verbindet und somit blockiert. In Gegenwart von  $Ca^{2+}$  gibt dieses Ankerpeptid das katalytische Zentrum frei und wird ebenfalls bei der autolytischen Aktivierung abgespalten<sup>[118]</sup>. Nach einer alternativen Nummerierung der Domänen anhand der Aminosäure-Sequenz wird das N-terminale Peptid als D-I und die katalytischen Domänen mit D-IIa und D-IIb bezeichnet<sup>[117]</sup>.



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der Domänenstruktur von  $\mu$ -Calpain. Die fortlaufende Länge der Aminosäuresequenz ist jeweils ober-, beziehungsweise unterhalb der Domänen angegeben, ebenso wie die jeweilige Bezeichnung der Domänen. Zwischen D III und D IV ist das aus fünfzehn Aminosäuren bestehende Linkerpeptid skizziert. (vergleiche Abbildung 6)

Sowohl m- als auch  $\mu$ -Calpain enthalten mindestens drei unterschiedliche Typen von Bindungsstellen für Kalzium: Vier EF-Hände in den Calmodulin-ähnlichen Domänen IV und VI<sup>[56, 119, 120]</sup> (eine weitere ist nicht an der Bindung von  $Ca^{2+}$  beteiligt), eine Bindungsstelle in der  $C_2$ -ähnlichen Domäne III<sup>[121]</sup>, und zwei bisher nur in Calpainen gefundene, kooperative Bindungsstellen in D-I und D-II<sup>[122]</sup>. Der unterschiedliche Kalziumbedarf der m- und  $\mu$ -Isoformen von Calpain ist auf die verschiedenen

strukturierten katalytischen Untereinheiten zurückzuführen, da beide die selbe regulatorische Untereinheit besitzen. Die Sequenzen der katalytischen 80 kDa-Untereinheiten der beiden Isoformen  $\mu$ - und m-Calpain sind zu über 60% identisch, weniger als 10% beinhalten nicht-konservative Unterschiede<sup>[118, 123]</sup>. Die Domänen I und II des aktiven Zentrums sind in allen Calpain-Homologen enthalten, während die flankierenden Regionen stark variieren. So besitzt zum Beispiel das Muskel-spezifische Calpain 3a keine regulatorische 28 kDa-Untereinheit<sup>[120, 124]</sup>. Alle Aminosäuren aus D-I und D-II, die sich an der Kalziumbindung und den hierbei stattfindenden Konformationsänderungen beteiligen, sind in den verschiedenen Calpain-Isoformen hoch konserviert<sup>[122]</sup>. In den Calpain-Varianten, die keine EF-Hand-Strukturen enthalten, wird die Aktivierung durch Kalzium vermutlich ausschließlich über die Bindungsstellen der katalytischen Domänen ausgelöst.

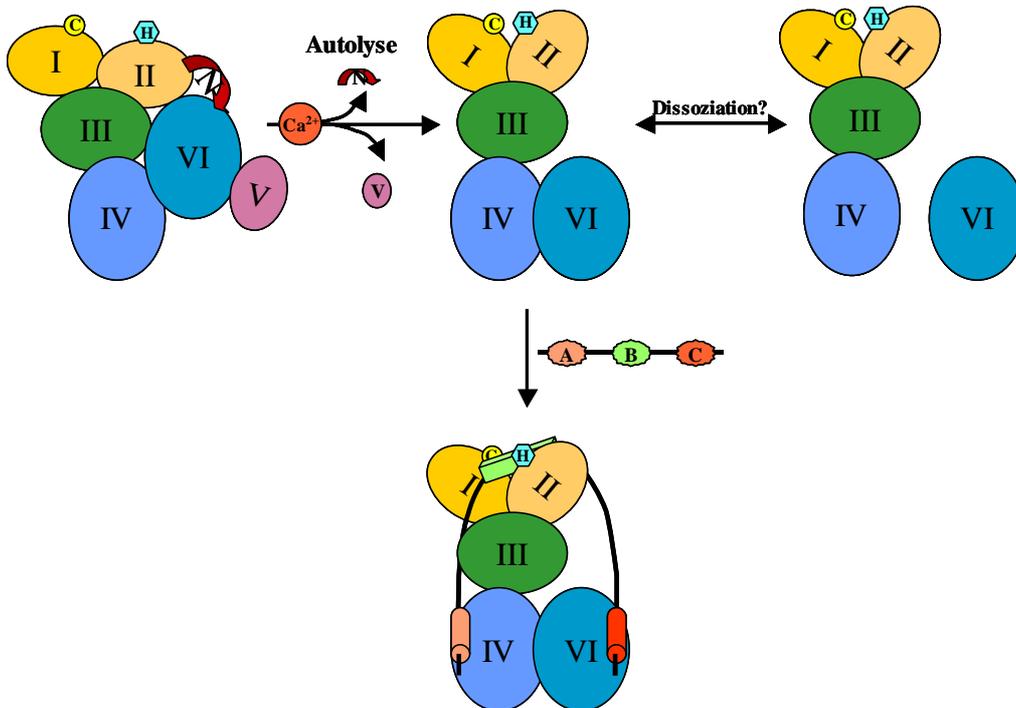
Davies und Mitarbeiter untersuchten rekombinante Konstrukte aus Domäne I und II von m-, beziehungsweise  $\mu$ -Calpain (Minicalpain oder m- bzw.  $\mu$ I-II)<sup>[122, 125]</sup>, die auch bei der Autolyse von Calpain entstehen<sup>[126]</sup> und wie das komplette Protein keine Aktivität in Abwesenheit von Kalzium zeigen. In Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bleiben bei  $\mu$ I-II etwa 2-3% der Aktivität in Bezug auf Proteinsubstrate erhalten, mI-II ist etwa 100.000 mal weniger aktiv als m-Calpain und prozessiert kleine Substrate nicht. Minicalpain ist Autolyse-resistent, was als Hinweis auf eine *in vivo* verbleibende Restaktivität zumindest von  $\mu$ -Calpain auch nach Selbstverdau anzusehen ist<sup>[122]</sup>. In Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  zeigen sich strukturelle Ähnlichkeiten zwischen Papain und Minicalpain, im Bereich von Ser<sup>115</sup>, His<sup>272</sup> und Asn<sup>296</sup> der katalytischen Triade, Gln<sup>109</sup> des Oxyanionen-Lochs und Trp<sup>298</sup> ( $\mu$ -Calpain-Nummerierung). Der wesentliche strukturelle Unterschied zwischen m- und  $\mu$ -Minicalpain ist die Lage von Trp<sup>106</sup>, das in die Substratbindungsstelle von m-, nicht jedoch  $\mu$ -Calpain hineinragt und diese teilweise blockiert. Der selbe Inaktivierungsmechanismus lässt sich auch bei der kompletten 80 kDa Domäne von m-Calpain wiederfinden und ist hier auf fehlende Interaktionen mit der 28 kDa Untereinheit zurückzuführen. Die unterschiedliche Lage von Trp<sup>106</sup> wird durch Ala<sup>105</sup> in  $\mu$ -Calpain, beziehungsweise Gly<sup>105</sup> in m-Calpain bestimmt. Durch den Austausch dieser Aminosäure konnten mI-II-Mutanten mit ähnlicher Aktivität wie  $\mu$ I-II hergestellt werden und umgekehrt<sup>[125]</sup>.

Domäne III ist strukturell Tumornekrosefaktor ähnlicher<sup>[117, 127]</sup> als den funktionell verwandten C<sub>2</sub>-Domänen, die zuerst in Proteinkinasen entdeckt wurden<sup>[128]</sup>. D-III besitzt eine saure Schleife, die über Wasserstoffbrücken mit positiv geladenen Aminosäuren aus DII die Formung des katalytischen Zentrums blockiert. D-III kann, abhängig von der Anwesenheit von Liposomen, zwei bis drei Ca<sup>2+</sup>-Ionen binden, wie eine Studie mit Deletionsmutanten belegt<sup>[129]</sup>. Die Gegenwart von Liposomen oder Phospholipiden steigert hierbei die Affinität für Ca<sup>2+</sup> signifikant<sup>[121]</sup>.

In kalziumfreier Form liegen sowohl m- als auch  $\mu$ -Calpain als ovale Scheiben mit einer Ausdehnung von etwa 100·60·50 Å vor<sup>[117]</sup>. Die Neigung der Calpaine zu Aggregation und Präzipitation aufgrund hydrophober Wechselwirkungen der Domäne III<sup>[130]</sup>, sowie das schnelle Fortschreiten der Autolyse in Gegenwart von Kalzium verhinderten bisher die Generierung von Strukturdaten der aktivierten Formen dieser Proteasen. In der inaktiven Form von m-Calpain<sup>[117, 118]</sup> beträgt der Abstand zwischen Cys<sup>115</sup> S <sub>$\gamma$</sub>  und His<sup>262</sup> N <sub>$\delta$</sub>  etwa 10,5 Å, im Gegensatz zu den sonst bei Cysteinproteasen üblichen ~3,7 Å. Daher ist sofort ersichtlich, weshalb Calpain in Abwesenheit von Kalzium keine proteolytische Aktivität aufweist. Zudem stabilisiert eine Salzbrücke zwischen Lys<sup>10</sup> und Asp<sup>148</sup> (m-Calpain Nummerierung) aus D-I die Bindung des N-terminalen Peptids an das aktive Zentrum und trägt zur Selbstinhibierung bei<sup>[131]</sup>.

### 1.3.3 Aktivierung und Regulation, Autolyse

Obwohl Calpain in der Literatur bisweilen als Proenzym bezeichnet wird, ist dies nicht korrekt, da einige Unterschiede zu klassischen Zymogenen bestehen. 1) Zwar liegt Calpain zunächst in blockierter Form vor, zeigt jedoch vor der Autolyse - wenn auch geringere - Aktivität<sup>[132-135]</sup>. Die Autolyse führt zur vollständigen Aktivierung, wobei der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bedarf um etwa eine Zehnerpotenz gesenkt wird<sup>[136]</sup>. 2) Kein Propeptid blockiert das aktive Zentrum, wengleich das N-terminale Peptid eine ähnliche Funktion besitzt. 3) Im Gegensatz zu Zymogenen ist die katalytische Triade zunächst nicht ausgebildet und wird erst nach der Autolyse formiert. 4) Calpaine besitzen keine Signalsequenz, die ihre Lokalisation in der Zelle bestimmt.



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der Autolyse und Inhibierung von m- und  $\mu$ -Calpain. Die Proteasedomänen I bis VI sind jeweils als Ovale dargestellt, N bezeichnet die N-terminale Domäne. C (gelber Kreis) und H (türkisches Hexagon) deuten die Lage der katalytischen Aminosäuren Cystein und Histidin an. Im Unteren Teil ist die Inhibierung der Protease durch Calpastatin mit der Bindung von Unterdomäne A und C von Calpastatin an Domäne IV und VI der Protease dargestellt. Die Lage der Unterdomäne B ist weiterhin spekulativ. Zur weiteren Erläuterung der Autolyse vergleiche Abschnitt 1.3.3 und 1.3.4, zur Inhibierung durch Calpastatin (unterer Teil) vergleiche Abschnitt 1.3.3 und 1.4

Bei der autolytischen Aktivierung wird in Gegenwart von  $2 \mu\text{M Ca}^{2+}$  in circa 1 min<sup>[134]</sup> zunächst die regulatorische Domäne von 28 kDa auf 20,5 kDa<sup>[137]</sup> unter Verlust von Domäne V abgebaut. Die Abwesenheit von D-V verändert die  $K_d$ -Werte der Kalziumbindung nicht<sup>[123]</sup>. Die genaue Funktion dieser Domäne ist weiterhin nicht geklärt. In der Literatur wird immer noch verbreitet ein 18 kDa Fragment erwähnt, tatsächlich handelt es sich jedoch um das 20,5 kDa Fragment<sup>[137]</sup>. Im darauf folgenden, langsameren Prozess werden die Bindungen Ala<sup>9</sup>-Lys<sup>10</sup> und Gly<sup>19</sup>-Ser<sup>20</sup> des N-terminalen Ankerpeptids gespalten, wodurch die 80 kDa-Untereinheit zunächst in eine 78 kDa-, dann in eine 76 kDa-Form überführt wird<sup>[138, 139]</sup>. Durch die autolytische Aktivierung wird die zum Erreichen der halbmaximalen Aktivität benötigte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration für  $\mu$ -Calpain auf circa 0,6  $\mu\text{M}$ , für m-Calpain auf etwa 180  $\mu\text{M}$  gesenkt<sup>[140, 141]</sup>. Die Verbindung zwischen Domäne VI und I wird gekappt und das katalytische Zentrum freigegeben. Die regulatorische Untereinheit wird nach kurzer Zeit zu einem 17 kDa-Fragment abgebaut, wogegen der Abbau der katalytischen Einheit langsamer vonstatten geht und Fragmente von 55 und 37 kDa, sowie weitere kleinere Abbauprodukte erzeugt<sup>[138, 142, 143]</sup>. Dies führt schließlich zur Inaktivierung von Calpain. Die Autolyse erfolgt intermolekular, da die Schnittstellen etwa 40 Å vom katalytischen Zentrum entfernt sind<sup>[118]</sup>. Zudem sinkt die Geschwindigkeit der Autolyse in Anwesenheit von Substraten deutlich<sup>[132, 133]</sup>. Da im Elutionsprofil von Zellextrakten keine autolysierten Formen der Calpaine gefunden werden, kann *in vivo* nur ein sehr geringer Anteil autolysiert sein<sup>[144]</sup>.

### 1.3.4 Kalziumbindung

Die Bindung von Kalzium erfolgt an mehreren Stellen des Enzyms. Die genauen Beiträge der einzelnen Bindungsstellen zur Aktivierung können jedoch aufgrund des ausgeprägt kooperativen Mechanismus im nativen Enzym nicht bestimmt werden<sup>[123]</sup>. Zunächst erfolgt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung an die EF-Hände, wodurch konformationelle Änderungen in Domäne IV und VI ausgelöst werden. Über ein  $\beta$ -Faltblatt von 15 Aminosäuren Länge zwischen Domäne III und VI werden strukturelle Änderungen an D-I und D-II weitergegeben<sup>[118, 129, 131]</sup>, wodurch eine Lockerung der Restriktion dieser Domänen hervorgerufen wird. Mutationen der EF-Hände mit verminderter

Kalziumbindung führen zu drastischer Verminderung der Kalzium-Sensitivität der Protease<sup>[120]</sup>. Eine Studie mit  $\mu/m$ -Calpain Hybridmutanten zeigte, dass der Unterschied des Kalziumbedarfs zu etwa 25% vom N-terminalen Peptid und zu 65% von Domäne IV herrührt<sup>[123]</sup>, der größte Teil des Letzteren wiederum durch die Verbindung zwischen Domäne III und IV. Der für Domäne I bis III bestimmte Anteil von nur 20% belegt, dass diese Domänen bei den frühen Schritten der Aktivierung eine untergeordnete Rolle spielen. Durch Inaktivierung der EF-Hände ließ sich die Rangfolge ihrer Affinität zu  $3 \gg 2 > 1$  ( $K_d$  je etwa 1 mM)  $\gg \gg 4$  mit einem  $K_d$ -Wert von 20 mM bestimmen<sup>[56, 119]</sup>. Solche Mutationen unterbinden die proteolytische Aktivität von Calpain nicht, erhöhen jedoch den Kalziumbedarf jeweils auf das etwa 100-fache. Die fünfte EF-Hand ist zusammen mit ihrem Gegenstück aus Domäne VI für die Wechselwirkung der Untereinheiten untereinander verantwortlich, wobei beide zusammen ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion binden<sup>[117, 118]</sup>. Durch Bindung weiterer  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an eine saure Schleife in Domäne III wird die mechanische Steifigkeit der Verbindung zu Domäne II gelockert, wodurch die Bildung des katalytischen Zentrums ermöglicht wird. Punktmutationen in D-II<sup>[145]</sup> und D-III<sup>[129]</sup>, in denen die Interaktionen zwischen D-III und D-II unterbrochen wurden, resultierten in einer deutlichen Verminderung der zur Aktivierung nötigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Calpain 3 besitzt keine solche saure Schleife und ist sogar in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelatbildnern aktiv<sup>[146]</sup>.

Die zweite Phase, in der durch Kalziumbindung an Domäne I und II das aktive Zentrum formiert wird, beginnt mit der Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an Glu<sup>185</sup> und der Schleife der Aminosäuren 328-332 aus D-I. Die Rotation von Glu<sup>333</sup> exponiert das Carbonyl des Peptidrückgrats und formt eine zweite Bindungsstelle in D-II. Durch die zweite Kalziumbindung an Glu<sup>302</sup> wird dieses verschoben und damit die Bildung eines kurzen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatts ermöglicht. In diesem bilden Val<sup>269</sup>, Val<sup>301</sup> und Ile<sup>263</sup> eine hydrophobe Tasche, die den Keil Trp<sup>298</sup> zwischen D-I und D-II heraus bewegt, und somit die Formung einer funktionellen katalytischen Domäne erlaubt.

Möglicherweise ist die Aktivität von Calpain mit einer Dissoziation der Untereinheiten verknüpft, wie von Suzuki und Mitarbeitern vorgeschlagen<sup>[147]</sup> und von Elce und Mitarbeitern *in vitro* zusammen mit der irreversiblen Bildung von Dimeren der kleinen Untereinheit beobachtet<sup>[148]</sup>. In Anwesenheit der 28 kDa-

Untereinheit wird die zur Aktivierung der 80 kDa- Untereinheit benötigte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration gesenkt und gleichzeitig die Rückfaltung denaturierter katalytischer Untereinheiten beschleunigt, sowie deren Stabilität erhöht. Somit stellt die 28 kDa-Untereinheit vermutlich ein für Calpain spezifisches Chaperon dar<sup>[149]</sup>.

### 1.3.5 Weitere regulatorische Faktoren

Zusätzlich zur Regulation durch den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel wird die Aktivität von Calpain durch Calpastatin, die Cystatin-Domäne der schweren Ketten von L- und H-Kininogen,  $\alpha 2$ -Makroglobulin<sup>[150-152]</sup> und das Selbstmordsubstrat Gas2<sup>[153]</sup> moduliert. Auf Calpastatin und seine Interaktion mit Calpain wird in Abschnitt 1.4 eingegangen. Kininogen ist vorzugsweise in der extrazellulären Matrix lokalisiert und somit unter physiologischen Bedingungen von Calpain räumlich getrennt.

Die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration *in vivo* liegt bei 40-500 nM<sup>[154]</sup> bis maximal 800 nM in sogenannten *sparks*<sup>[155]</sup>. Der *in vitro* beobachtete Kalziumbedarf der Calpaine liegt jedoch sowohl für  $\mu$ -Calpain (5-50  $\mu\text{M}$ ), als auch für m-Calpain (400-800  $\mu\text{M}$ ) deutlich höher. Phosphatidylinositol-Polyphosphate ( $\text{PIP}_n$ ) senken die zur Autolyse nötige  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration für  $\mu$ -Calpain in den Bereich physiologischer Werte bei gleichzeitiger Steigerung von  $v_{\text{max}}$  der Substrathydrolyse<sup>[156]</sup>. Ein Zusammenhang mit einer Assoziation zu Phospholipiden der Plasmamembran konnte jedoch bisher nicht nachgewiesen werden, da beispielsweise *inside-out*-Vesikel aus Erythrocyten-Membran nicht den selben Effekt wie  $\text{PIP}_n$  hervorrufen<sup>[157]</sup>. Vielmehr ist *in vivo* eine Assoziation zu in der Plasmamembran gebundenen Proteinen zu beobachten<sup>[158-160]</sup>. Kifor und Mitarbeiter fanden inaktives m-Calpain mit Caveolin-1 co-lokalisiert, welches die Protease mit ihrem Substrat Parathyroid-Hormon in Membran-Caveolen zusammenbringt<sup>[161]</sup>. Ein erhöhter Kalziumspiegel führt zur Translokation des *calcium sensing receptor* (CaR) in die Caveolen, wo das Signal zur Aktivierung von Calpain weiterleitet wird, das daraufhin freigesetzt wird. CaR selbst wird dabei in einer negativen Feedback-Schleife durch Calpain fragmentiert. Da Calpain bei der Autolyse eine Steigerung der Hydrophobizität erfährt ist auch eine *nachgelagerte* Assoziation an membrangebundene Proteine denkbar<sup>[162]</sup>. Inomata schlug sogar vor, dass die Membranbindung von Calpain zur Inaktivierung führt<sup>[163]</sup>.

Mellgren et al. fanden, dass m-Calpain Proteine der Kernmatrix, nicht jedoch andere Proteine, bei einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von  $3 \mu\text{M}$  in Gegenwart von DNA spaltet<sup>[164]</sup>.

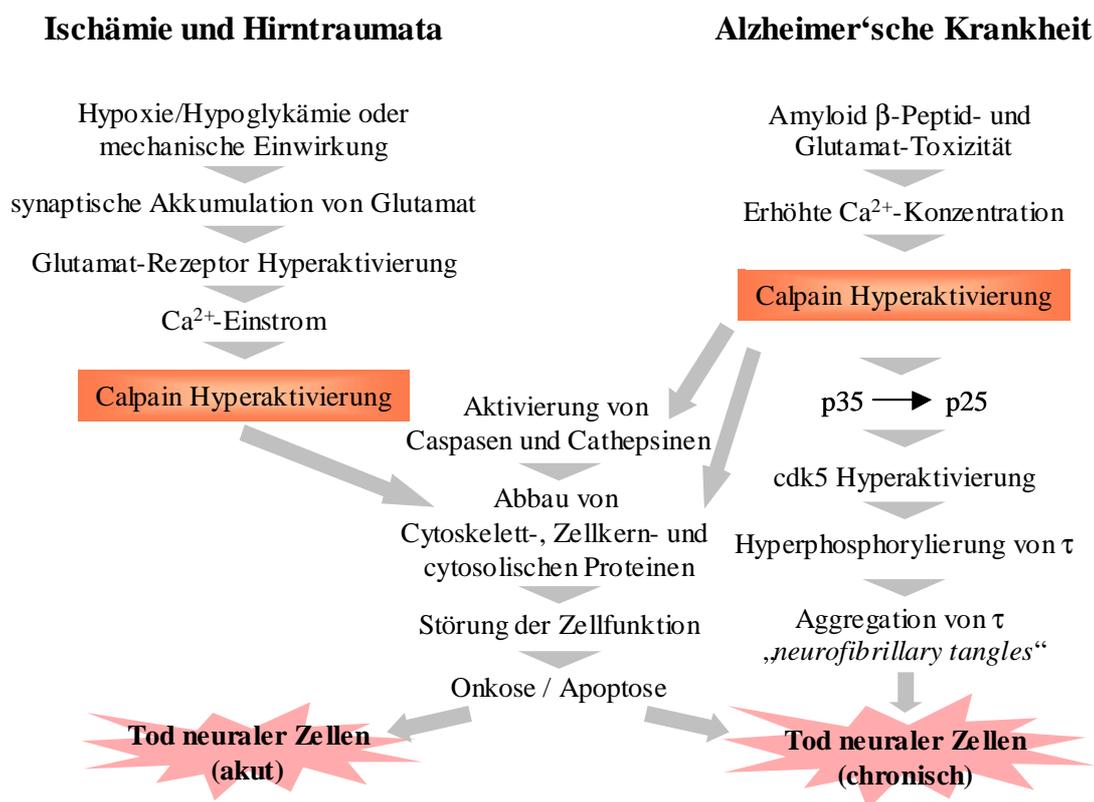
Studien neueren Datums stellten einen Zusammenhang zwischen Calpain-Aktivität und seiner Phosphorylierung her. EGF-stimulierte Phosphorylierung an  $\text{Ser}^{50}$  durch MAP-Kinase führt zur Aktivierung von membrangebundenem m-Calpain, nicht jedoch  $\mu$ -Calpain, welches an dieser Stelle keinen phosphorylierbaren Rest trägt<sup>[165]</sup>. In Calpain 3 befindet sich an dieser Stelle eine Glutaminsäure, die möglicherweise als Phosphomimetikum agieren und die weitgehende  $\text{Ca}^{2+}$ -Unabhängigkeit des Enzyms erklären könnte. Eine Phosphorylierung an  $\text{Ser}^{369}$  und/oder  $\text{Thr}^{370}$  durch cAMP-vermittelte Aktivierung der Proteinkinase A blockiert die Stimulation durch EGF-vermittelte Modifikation an  $\text{Ser}^{50}$  und inaktiviert m-Calpain<sup>[166]</sup>. Dies wurde bereits in einer Studie mit phosphomimetischen Punktmutationen an verschiedenen oberflächenexponierten Threonin- und Serin-Resten von m-Calpain postuliert<sup>[167]</sup>. Nach einer Hypothese von Friedrich sind die *in vitro* gefundenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen unerheblich für die Beurteilung der Aktivität von Calpain, da die Protease *in vivo* nicht maximal aktiviert vorliegt<sup>[121]</sup>. Als Gründe hierfür werden angeführt: 1) Der dramatische Anstieg der Aktivität bei unkontrolliertem Kalziumeinfluss in die Zelle. Läge Calpain in der Nähe halbmaximaler Aktivität vor, wäre nur mit einer Verdopplung zu rechnen. 2) In Zellkompartimenten sind bestimmte Proteine hoch angereichert, anders als *in vitro*, zumal Calpain vermutlich über Mittler-Proteine in der Nähe seiner Substrate verankert wird. Die hohe Zahl an Calpain-Substraten steigert deren Gesamtkonzentration zusätzlich und führt zu gesteigertem Gesamtumsatz, obwohl die Protease fernab maximaler Aktivität operiert. 3) Calpain ist nicht am Umsatz von Proteinen, sondern an der Signalweiterleitung beteiligt. Daher sind kleine, zeitlich und lokal eng begrenzte Mengen an aktiviertem Calpain ausreichend. 4) Die Kooperativität der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung könnte zur Feinabstimmung der Proteaseaktivität beitragen, da die Kalziumkonzentration in unterschiedlichen Bereichen der Zelle stark schwankt. 5) Fragmente von Calpastatin, dem endogenen Inhibitor von Calpain, führten zu einer *in vitro* Aktivierung von Calpain<sup>[168]</sup>. Ob dies *in vivo* eine Rolle spielt, ist bisher nicht aufgeklärt, ist jedoch anzunehmen, da unweigerlich prozessierte Calpastatin-Spezies in der Zelle anzutreffen sind.

### 1.3.6 Physiologie und Pathologie

Im Vergleich zu den Cathepsinen besitzen Calpaine eine geringere Selektivität und prozessieren ein breites Spektrum an Substraten. Ein Grund hierfür ist, dass die Bindungsstellen von kleineren Seitenketten gebildet werden und somit ein weniger ausgeprägtes Profil besitzen als bei den Cathepsinen<sup>[29]</sup>. Die recht flache, relative weit geöffnete und wenig strukturierte Oberfläche im Bereich des aktiven Zentrums erlaubt einer großen Zahl von Substraten den Zugang zum katalytischen Zentrum. Die genauen Bedingungen der Substraterkennung sind noch nicht bekannt, jedoch konnte eine gehäufte Beteiligung von PEST-Sequenzen beobachtet werden<sup>[121]</sup>. Allerdings zeigte sich, dass deren Anwesenheit für sich genommen kein hinreichender Faktor ist<sup>[110]</sup>. Generell wurden Calpain-Schnittstellen bevorzugt in unstrukturierten Bereichen zwischen den Domänen seiner Substratmoleküle identifiziert<sup>[169]</sup>.

Calpain ist nicht primär am Proteinabbau beteiligt, sondern vielmehr an der Modifikation der Aktivität einer Vielzahl intrazellulärer Enzyme, Struktur- und Signalproteine, und besitzt somit eine zentrale Rolle in der Regulation grundlegender zellulärer Prozesse, wie zum Beispiel Zellbeweglichkeit<sup>[170]</sup>, Zellzyklus<sup>[171]</sup> und -entwicklung<sup>[172]</sup>, Apoptose<sup>[173]</sup> sowie Signalweiterleitung<sup>[174]</sup>. Eine Reihe von Substraten, die mit der Zellbeweglichkeit in Zusammenhang stehen, wie FAK, Paxillin, Spectrin, Cortactin und Talin 1, werden spezifisch von  $\mu$ -, jedoch nicht m-Calpain modifiziert und aktiviert<sup>[175]</sup>. Besonders gut dokumentiert ist die Regulation der Integrin-vermittelten Zellwanderung. Calpain löst hier die Bindung zwischen dem Integrin-abhängigen fokalen Adhäsionskomplex und dem Actin-Zytoskelett durch Proteolyse von Talin. Das Fehlen des Calpain-Gens führt bereits in frühen Entwicklungsstadien zum Tod von Mäuseembryonen<sup>[130]</sup>. Pharmakologische Inhibierung von Calpain vermindert ebenfalls die Beweglichkeit behandelter Zellen<sup>[176]</sup>. Bedingt durch ihre Beteiligung an wichtigen zellulären Ereignissen spielen Calpaine auch eine Rolle bei schwerwiegenden Erkrankungen. Zum Beispiel werden Schädigungen nach Herzinfarkt<sup>[177]</sup> oder Hirnschlag<sup>[178]</sup> und neurodegenerative Prozesse<sup>[179]</sup> mit Calpain in Verbindung gebracht. Bei Hirnschlag wird durch Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$  und Freisetzung von  $\text{PiP}_2$  die übermäßige Aktivierung von

Calpain ausgelöst, welches unkontrolliert Fodrin spaltet, und somit neurale Schäden im Hippocampus verursacht<sup>[115, 180]</sup>. Ein ähnlicher Mechanismus bedingt die durch Reperfusion nach Herzinfarkt hervorgerufene Gewebsnekrose<sup>[181, 182]</sup> (siehe Abbildung 7). Bei der Alzheimer'schen Krankheit induzieren  $\beta$ -Amyloid-Plaques die abnorme Aktivierung von Calpain, welche durch Prozessierung des Aktivators p35 zu p25 zur übermäßigen Aktivierung der cyclinabhängigen Kinase 5 (cdk5) und Hyperphosphorylierung des Mikrotubuli-assoziierten Proteins  $\tau$  führt.  $\tau$  aggregiert zu sogenannten *neurofibrillary tangles*, die zusammen mit A $\beta$ -Plaques interneuronale Läsionen verursachen<sup>[183-185]</sup>. Inhibierung von Calpain unterdrückt die Ausbreitung pankreatischer  $\beta$ -Zellen, hemmt gleichzeitig die Produktion von Insulin<sup>[186]</sup>, wodurch eine Beteiligung der Protease an Diabetes wahrscheinlich wird.



**Abbildung 7: Beteiligung von Calpain an ischämischen Ereignissen und Alzheimer'scher Krankheit.**

Eine der wenigen bisher bekannten Erkrankungen im Zusammenhang mit einem Mangel an Calpain ist die Gliedergürtel-Muskeldystrophie Typ 2A (LMGD2A). Sie wird durch eine Mutation des Gens für Calpain 3 verursacht, so dass LMGD2A-Patienten über kein aktives Calpain 3a verfügen<sup>[124]</sup>.

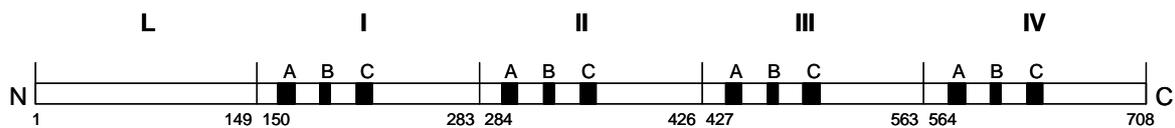
## 1.4 Calpastatin

Calpastatin<sup>[187]</sup> ist ein in Wirbeltiergeweben ubiquitär exprimiertes Protein, das 1976 von Dayton et al. in Skelettmuskulatur von Schweinen entdeckt wurde<sup>[143]</sup>. Seine Aufreinigung gestaltete sich schwierig. Erst 1982 konnte es in reiner Form aus humanen Erythrocyten erhalten werden<sup>[188]</sup>, wobei seine Stabilität bis etwa 100 °C<sup>[136]</sup> genutzt wurde. Eine neuere, auf Immunoaffinität basierende Reinigungsmethode umgeht Probleme mit seiner extensiven proteolytischen Spaltung<sup>[189]</sup>. Calpastatin ist ein hochaffiner<sup>[190]</sup> und spezifischer Inhibitor für Calpain, andere Proteine werden nicht inhibiert. Die bisher in verschiedenen Wirbeltiergeweben identifizierten Calpastatine besitzen eine Sequenz-Homologie von mehr als 65%<sup>[191]</sup>; bisher wurden keine homologen Gene in anderen Lebensformen identifiziert. Die Primärstruktur von Calpastatin zeigt keine Homologie mit bekannten Proteinen, die Familie der Cystatine eingeschlossen. Humanes Calpastatin ist zwar nur auf einem Gen kodiert<sup>[192]</sup>, jedoch werden durch die Nutzung verschiedener Promotoren<sup>[177, 193]</sup> und alternatives Spleißen<sup>[146, 194]</sup> mindestens acht verschiedene Isoformen mit Molekulargewichten zwischen 17,5 kDa und 84 kDa exprimiert. Meist sind in einem Gewebetyp mehrere Isoformen co-lokalisiert, wobei oftmals eine mengenmäßig stark überwiegt.

### 1.4.1 Struktur

Humanes hepatisches Calpastatin, eine der am besten untersuchten Varianten, besitzt ein Molekulargewicht von 75,5 kDa<sup>[195]</sup>. Die repetitiven homologen Domänen I-IV von je etwa 140 Aminosäuren Länge weisen untereinander nur eine Sequenzhomologie von 23 bis 36% auf<sup>[196, 197]</sup>. Jede dieser Domänen für sich allein besitzt inhibitorische Aktivität<sup>[198-200]</sup>, womit prinzipiell die simultane Inhibition mehrerer Calpain-Moleküle ermöglicht wird<sup>[199, 201]</sup>. Ihre Affinität nimmt in der Reihenfolge I > IV > III > II ab<sup>[202]</sup>. Zusätzlich existiert eine N-terminale Untereinheit, Domäne L, deren Länge in verschiedenen Spleiß-Varianten veränderlich ist<sup>[203, 204]</sup>. Ihre Funktion ist noch nicht endgültig geklärt, jedoch wurde vorgeschlagen, dass Domäne L mit der Aktivierung der spannungsabhängigen Kalziumkanäle, sowie einer Interaktion mit der Calmodulin-ähnlichen Untereinheit von Calpain zusammenhängt<sup>[205-207]</sup>. Die Anlagerung von Calpastatin an Membranen *in vivo* wird

Domäne L zugeschrieben<sup>[208-210]</sup>. In einigen Spleiß-Varianten fehlen jedoch verschiedene Domänen. So sind zum Beispiel in der Erythrocyten-70 kDa-Form die Domänen L und I nicht vorhanden<sup>[211]</sup>. Calpastatine anderer Vertebraten besitzen zum Teil noch eine zusätzliche N-terminale XL-Domäne, welche drei Phosphorylierungsstellen aufweist<sup>[193]</sup>. Die verschiedenen Spleißvarianten besitzen nur ein geringfügig unterschiedliches Potential Calpain zu inhibieren, und ihre Funktion ist weiterhin ungewiss.



**Abbildung 8: Domänenstruktur von humanem hepatischem Calpastatin. Die Domänen L und I bis IV sind angedeutet, ebenso die Unterdomänen A, B und die inhibitorische Domäne B. Unterhalb der Domänen ist jeweils die Lage des Polypeptids innerhalb der Aminosäuresequenz abgetragen.**

Calpastatin besitzt keine Sekundärstrukturelemente wie  $\alpha$ -Helix oder  $\beta$ -Faltblatt, wie mittels CD-Spektroskopie<sup>[212]</sup> und NMR<sup>[213]</sup> belegt werden konnte. Jedoch bestehen Hinweise auf teilweise geordnete Bereiche, die bei Bindung an andere Proteine Sekundärstrukturelemente ausbilden könnten<sup>[212]</sup>. Die Abschnitte A und C bestehen aus jeweils 14, Subdomäne B aus 12 Aminosäuren, alle drei sind in verschiedenen Spezies hoch konserviert. Zudem variiert die Anzahl der Aminosäuren zwischen diesen Subdomänen nur gering<sup>[191]</sup>. Unterdomäne B ist mit circa 95% für den Hauptanteil der Hemmwirkung verantwortlich, blockiert jedoch für sich genommen Calpain nicht<sup>[200]</sup>. Das 27-mer (DPMSSTYIEELGKREVTIPPKYRELLA, im Weiteren mit CP1B bezeichnet) aus Exon 1B weist nanomolare Aktivität auf ( $IC_{50} \sim 25$  nM)<sup>[202, 213-215]</sup>. Die Unterdomänen A und C selbst sind nicht in der Lage Calpain zu inhibieren, steigern jedoch das Potenzial von Untereinheit B<sup>[199, 202, 216]</sup> bei kovalenter Verknüpfung der Untereinheiten<sup>[200]</sup>. BIAcore<sup>TM</sup>-Experimente zeigten, dass Unterdomäne A mit Domäne IV von Calpain wechselwirkt, während C an Domäne VI bindet, beide in Abhängigkeit der Kalzium-Konzentration<sup>[200, 206, 207]</sup>. Durch diese Bindung wird die Anlagerung von Calpain an die Zellmembran unterbunden<sup>[217]</sup>. Kristallstrukturdaten veranschaulichten, dass Untereinheit A bei der Bindung eine helikale Struktur ausbildet<sup>[218]</sup>, ebenso wie Untereinheit C bei Bindung an Domäne VI

im Computermodell. Beide Peptide lagern sich demnach in ähnlicher Weise an eine Bindungstasche an, welche sich in Gegenwart von Kalzium zwischen Helices der EF-Hand 1 und 2, beziehungsweise 1' und 2' bildet. Der Austausch eines Leucins in Region A durch einen Helix brechenden Prolinrest verminderte die Affinität zu Domäne IV erheblich<sup>[207]</sup>. Calpastatin-Peptide verhindern die Autolyse von Calpain *in vitro*<sup>[219]</sup>, jedoch ist noch nicht geklärt, ob *in vivo* die Bindung vor der Autolyse, danach, oder möglicherweise auch an beide Formen stattfindet.

Die Inhibierung von Calpain durch Calpastatin ist kompetitiv sowohl mit Protein- als auch niedermolekularen Substraten, wie Suc-Leu-Tyr-AMC<sup>[220]</sup>. Dennoch wurde postuliert, dass keine direkte Interaktion mit dem katalytischen Zentrum vorzuliegt, da eine Bindung auch dann möglich ist, wenn das katalytische Zentrum durch reversible oder irreversible Inhibitoren blockiert ist<sup>[110, 202]</sup>. Durch Autolyse erzeugte Calpain-Fragmente<sup>[221]</sup> werden ebenso wenig durch Calpastatin inhibiert wie  $\mu$ I-II<sup>[222]</sup>, beziehungsweise mI-II<sup>[122]</sup>. Zudem hemmt Calpastatin die katalytische Aktivität von Calpain 3 nicht<sup>[115]</sup>, vermutlich aufgrund fehlender Wechselwirkungen mit den EF-Hand-Domänen. Calpain 3 besitzt keine 28 kDa-Untereinheit, somit fehlt D-VI; in  $\mu$ - und mI-II fehlen beide EF-Hand Domänen. Offensichtlich ist das Vorhandensein aller drei Bindungsareale von Calpain für seine Inhibierung durch Calpastatin unerlässlich. Eine schematische Darstellung ist Abbildung 6, Seite 17 zu entnehmen.

Peptide aus Untereinheit A und C senken interessanterweise den Kalziumbedarf von Calpain *in vitro*<sup>[168]</sup>. Da Calpastatin leicht proteolytisch gespalten wird, könnten ähnliche peptidische Bruchstücke auch *in vivo* bei der Aktivierung von Calpain eine Rolle spielen. Bei erhöhtem intrazellulären Kalziumspiegel kann *in vivo* sogar ein Abbau durch Calpain beobachtet werden<sup>[158, 223, 224]</sup>. Zunächst erfolgt eine durch  $\mu$ -Calpain vermittelte konservative Spaltung unter Freisetzung einzelner Domänen von Calpastatin<sup>[225]</sup>. Jede der einzelnen Domänen für sich ist aktiver als das intakte Protein, somit ist zunächst eine Amplifikation der inhibitorischen Aktivität zu beobachten. Bei höheren  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen und längerer Verweildauer erfolgt der Abbau durch m-Calpain, so dass die Gesamtaktivität von Calpastatin deutlich gesenkt wird. Somit ist ein kurzzeitig wirksamer Schutzmechanismus vor übermäßiger Calpain-Aktivität vorhanden, der jedoch bei längerer Belastung versagt.

## 1.4.2 Regulation

Die Inhibierung von Calpain durch Calpastatin ist reversibel und  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig<sup>[190, 226, 227]</sup>. Die Ursache hierfür muss im Aktivierungsmechanismus von Calpain begründet sein, da Calpastatin selbst keine  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen besitzt. Die hierbei notwendige  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist niedriger als die für die Autolyse von Calpain erforderliche. Zudem liegt Calpastatin im Zytosol im Vergleich zu Calpain in vielfachem Überschuss vor. Um dennoch die Aktivierung von Calpain zu gewährleisten, müssen Protease und Inhibitor unterschiedliche Aufenthaltsorte innerhalb der Zelle besitzen. Calpastatin wird *in vivo* durch Proteinkinase A und C (PKA, PKC) phosphoryliert<sup>[228, 229]</sup>. Melloni und Mitarbeiter<sup>[230]</sup> zeigten, dass Calpastatin in ruhenden LAN-5 Zellen fast ausschließlich in zwei kleinen, membranlosen granulären Strukturen in Kerneinstülpungen lokalisiert ist. Bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Einfluss oder Stimulation der Zelldifferenzierung werden die granulösen Strukturen in kurzer Zeit gelöst und Calpastatin ins Zytosol abgegeben, wo es im Verlauf von etwa 1,5 h durch Caspasen<sup>[231]</sup> und Calpain selbst<sup>[225]</sup> abgebaut wird. Gleichzeitig wird Calpain aus dem Zytosol an die Zellmembran verlagert. Hier wird Calpain möglicherweise autolytisch aktiviert und erneut ins Zytosol abgegeben, wo es von Calpastatin inhibiert wird<sup>[230]</sup>. Dies könnte einen Schutz vor übermäßiger Calpain-Aktivität darstellen, der jedoch bei länger anhaltenden Reizen aufgrund der verminderten Calpastatin-Konzentration versagt, woraufhin pathologische Vorgänge ausgelöst werden. Die Änderung der Lokalisierung von Calpastatin korreliert mit seiner Phosphorylierung/Dephosphorylierung durch PPase und PKA<sup>[232]</sup>. Die Inhibierung von PPase unterdrückt die Auflösung der granulösen Calpastatin-Strukturen *in vivo*, während die Stimulation von PKA die Rückbildung der selben Strukturen zur Folge hat. PMA-stimulierte Phosphorylierung durch PKC führt nicht zur Rückbildung der Strukturen, trotz Phosphorylierung von Calpastatin<sup>[232]</sup>. In einer weiteren Studie konnten Melloni und Mitarbeiter belegen, dass die Phosphorylierung durch PKC am N-Terminus, besonders von niedermolekularen Calpastatin-Varianten, stattfindet, wodurch die für die Bindung an Calpain notwendige  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erhöht und das inhibitorische Potential gesenkt wurde<sup>[233]</sup>.

## 1.5 Inhibitoren der papainähnlichen Cysteinproteasen

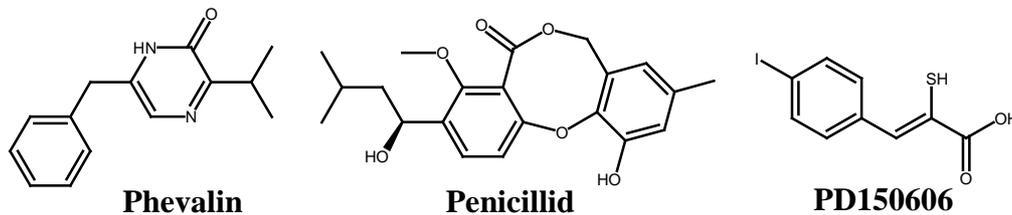
Seit seiner Entdeckung im Jahre 1964<sup>[106, 107]</sup> ist Calpain das Objekt intensiver Forschung, bedingt durch seine besondere Struktur und den einmaligen Mechanismus seiner Aktivierung (vergleiche Abschnitt 1.3). Mit der Erkenntnis, dass Calpain in einer Reihe physiologischer und pathologischer Prozesse eine Schlüsselrolle zukommt, erwuchs das Interesse an hochaffinen und spezifischen Inhibitoren für diese ungewöhnliche Protease. Allgemeine Proteaseinhibitoren wie Iodessigsäure, 5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoesäure), N-Ethylmaleinimid, Mersalyl, Isokumarine und Diisopropyl-phosphofluoridat inhibieren Calpain und wurden in den ersten Studien eingesetzt. Kalzium-Chelatbildner verhindern die zur Ausformung der aktiven Konformation notwendige Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an die Protease und wirken somit auch als Calpain-Inhibitoren. Da diese Agenzien jedoch unspezifisch sind, und eine Vielzahl anderer Proteasen ebenfalls durch sie inhibiert wird, ist ihre Verwendbarkeit in biologischen oder medizinischen Studien eingeschränkt.

Die Vertreter der Cathepsin-Familie haben annähernd ebensoviel Aufmerksamkeit auf sich gezogen. Hierbei stellt sich oft das Problem, Moleküle zu entwickeln, die trotz der großen strukturellen Ähnlichkeiten selektiv nur eines der Enzyme hemmen. In den letzten Jahren wurden verschiedene Verfahren und Ansätze verwendet, um Leitstrukturen aus Reihenuntersuchungen von Substratbibliotheken, sowie natürliche und synthetische Cysteinprotease-Inhibitoren zu optimieren. Da einige der Cathepsine, sowie  $\mu$ - und  $m$ -Calpain ubiquitär im Organismus anzutreffen sind, ist es oftmals schwierig, gezielt einzelne Gewebe, wie einen Tumor, anzusprechen. Dies kann durch die Wahl geeigneter Applikationsformen oder durch selektive Adressierung des Wirkstoffs<sup>[234]</sup>, beispielsweise mit Antikörpern, geschehen.

Im Folgenden wird ein Einblick in die Studien synthetischer und natürlicher Inhibitoren für die Familien der Calpaine und Cathepsine gegeben. Verschiedene chemische Strategien werden aufgezeigt und unterschiedliche Verfahren zur Findung neuer vielversprechender Moleküle beleuchtet, um so einen Überblick über den Stand der Forschung zu geben. Da im Rahmen dieser Arbeit peptidische Inhibitoren

verwendet wurden, ist ihnen besonderes Augenmerk gewidmet, Analoga des Epoxids E-64 werden in einem gesonderten Abschnitt behandelt.

Da nichtpeptidische Inhibitoren im Zusammenhang mit dieser Arbeit eine untergeordnete Rolle spielen, sollen hier nur wenige Beispiele gezeigt werden. Phevalin wurde aus *Streptomyces* isoliert<sup>[235]</sup>. Es inhibiert Calpain mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 1,3  $\mu\text{M}$ . Das aus *Penicillium* F60760 gewonnene Penicillid<sup>[236]</sup> besitzt einen  $IC_{50}$  von 7,1  $\mu\text{M}$  gegenüber Calpain. Die  $\alpha$ -Mercaptoacrylsäure PD 150606 bindet in ähnlicher Weise wie Calpastatin-Unterdomäne A an Domäne IV von Calpain (vergleiche Abschnitt 1.4.1). Sie inhibiert Calpain in nichtkompetitiver Weise, jedoch stellte sich heraus, dass auch der Kainat/AMPA-Rezeptors inhibiert wird<sup>[237]</sup>.



**Abbildung 9: Nichtpeptidische Calpain- und Cathepsin-Inhibitoren**

### 1.5.1 Allgemeines

Nach dem Modell nach Schechter und Berger der Bindung an katalytischen Zentren von Proteasen werden diese in einzelne Taschen unterteilt, denen jeweils ein bestimmter Aminosäurerest ihrer Substrate oder entsprechende Strukturelemente der Inhibitoren zugewiesen werden<sup>[238]</sup>. Auf der aminoterminalen („ungestrichenen“) Seite der Schnittstelle befinden sich die Aminosäurereste P1, P2, P3... des Substrats, beziehungsweise die zugehörigen S1-, S2-, S3-,... Bindungstaschen des Enzyms. Auf der carboxyterminalen („gestrichenen“) Seite die entsprechenden Bereiche P1', P2', P3'..., beziehungsweise S1', S2', S3'... Gezählt wird jeweils von der zu spaltenden Peptidbindung weg zu den Enden des Substrats hin.

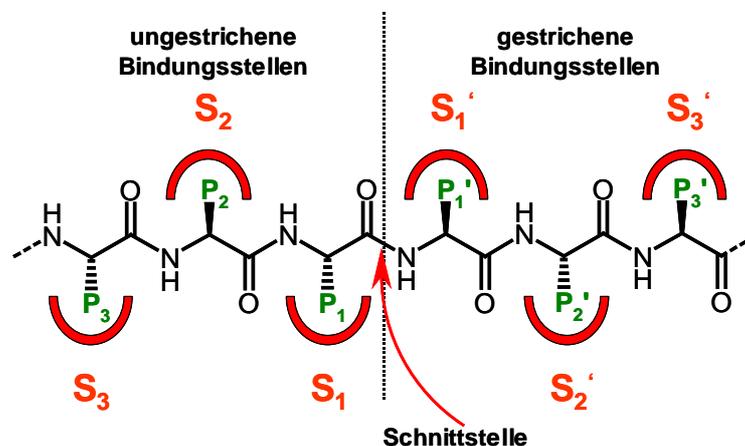


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Substratbindung nach Schechter und Berger<sup>[238]</sup>. In grün sind jeweils die Aminosäureseitenketten von P3 bis P3' des Substrats angedeutet, in rot die korrespondierenden Bindungstaschen S3 bis S3' der Protease.

Die Mehrzahl der Inhibitoren für Cysteinproteasen bildet über eine kovalente Bindung ein tetraedrisches Produkt, ähnlich wie bei der Substrathydrolyse (siehe Abbildung 1, Seite 4). Generell basieren solche Inhibitoren auf der hohen Elektrophilie der reaktiven Gruppe, ihre Bindung kann reversibel oder irreversibel sein. Beispielsweise sind Aldehyde,  $\alpha$ -Keto-Carbonyl- oder  $\alpha$ -Keto-Phosphorverbindungen reversible Inhibitoren, während die häufig verwendeten substituierten Methylketone, O-Acylhydroxylamine, Vinylsulfone und Epoxide irreversible Inhibitoren sind.

## 1.5.2 Aldehyde

Moleküle mit Aldehydfunktion gehören zu den ersten verwendeten Cysteinprotease-Inhibitoren. Sie blockieren das aktive Cystein über die reversible Bildung eines Thioacetals. Eine Reihe von Aldehyden mit inhibitorischem Potential konnte aus verschiedenen Unterarten von *Streptomyces* isoliert werden. Beispiele hierfür sind das aus *Actinomycetes* isolierte Leupeptin (Ac-Leu-Leu-Arg-H)<sup>[239, 240]</sup>, Antipain ([S)-1-carboxy-2-phenylethyl]-carbamoyl-L-Val-Arg-H<sup>[241]</sup>, die Staccopine P-1 und P-2 (Val-Val-Val-Val-Phe-H und Val-Val-Val-Val-Tyr-H)<sup>[242]</sup> und Strepin P-1 (N-isovaleryl-Tyr-Val-Arg-H)<sup>[243]</sup>. SAR-Studien mit N-terminal durch hydrophobe Gruppen wie Benzyloxycarbonyl oder Acetyl derivatisierten Molekülen brachten Substanzen wie Calpeptin (Z-Leu-Nle-H)<sup>[244]</sup>, MDL 28,170 (Z-Val-Phe-H)<sup>[245]</sup> und Calpain-Inhibitor I und II (Ac-Leu-Leu-Nle-H und Ac-Leu-Leu-Met-H)<sup>[246]</sup> hervor. Ein großer Teil der Affinität dieser Moleküle rührt von der Wechselwirkung des P2-Leucin mit der bei papainähnlichen Cysteinproteasen wohldefinierten S2-Tasche her. Diese verankert die Inhibitoren in ihrem substratähnlichen Bindungsmodus<sup>[247]</sup>. In den Positionen P1 und P2 bestimmen Wasserstoff- und Salzbrücken, ab P3 Van-der-Waals- und hydrophobe Wechselwirkungen die Bindung an das Enzym. Das größte Manko all dieser Moleküle ist ihre geringe Selektivität. So inhibiert beispielsweise „Calpain-Inhibitor I“ Calpain, Cathepsin L und B<sup>[246]</sup> ebenso wie das Proteasom<sup>[248]</sup>. Zudem werden Aldehyde unter physiologischen Bedingungen rasch oxidiert<sup>[249]</sup>. Die Zellgängigkeit der Substanzen wurde durch die N-terminale Derivatisierung mit hydrophoben Gruppen verbessert, dennoch bleibt ihr Nutzen eingeschränkt, auch wenn sie in einer Reihe von *in vitro* Studien an isolierten Proteinen und lebenden Zellen verwendet wurden<sup>[250-252]</sup>.

### 1.5.3 $\alpha$ -Methylketone und Vinylsulfone

Drenth und Mitarbeiter nutzten 1976 das Chloromethylketon ZPACK (Z-Phe-Ala-C(O)-CH<sub>2</sub>Cl) zur ersten Bestimmung der Kristallstruktur eines Cysteinprotease-Inhibitor-Komplexes<sup>[253]</sup>. Auf Grundlage computergestützter Modelle postulierten sie tetraedrale Zwischenprodukte der Acylierung von Cysteinproteasen und die inzwischen allgemein akzeptierte Beteiligung eines Histidin- und Glutaminrests am Katalysemechanismus. Die Lage solcher Hemmstoffe wurde als substratartig bestimmt<sup>[254, 255]</sup>, mit einem hydrophoben Rest (hier Phenylalanin) in der S2-Tasche und dem Chloromethylketon in Position S1. Im Gegensatz zu Serinproteasen, bei denen die kovalente Bindung vom essentiellen Histidinrest ausgeht<sup>[256]</sup>, bilden solche Elektrophile mit Cysteinproteasen eine Acylbindung aus. Cathers et al. bestimmten den pK<sub>s</sub>-Wert der pH-abhängigen konformationellen Änderung des *occluding loop* von Cathepsin B mittels eines epoxidischen Inhibitors und seines Chloromethylderivats<sup>[40]</sup>. Eine Reihe strukturell verwandter Fluoromethylketone wurde gegen Krankheiten wie Malaria<sup>[257]</sup> und Bilharziose<sup>[258]</sup> entwickelt, die durch parasitäre Einzeller verursacht werden. Die Wirkstoffe blockieren spezifische Cathepsine, wie beispielsweise Cruzain<sup>[259]</sup>. Die Toxizität von Vinylsulfonen ist im Vergleich zu den Chloro- oder Fluoromethylketonen deutlich geringer. Ihre geringere Bioverfügbarkeit bedingt ein niedrigeres Blutserumniveau, so dass der intrazelluläre Raum nicht erreicht wird. Vinylsulfon K11777 ist gegen die Chagas-Krankheit hochwirksam<sup>[260]</sup>, inhibiert jedoch ebenfalls humane Cathepsine wie Cathepsin V<sup>[261]</sup>.

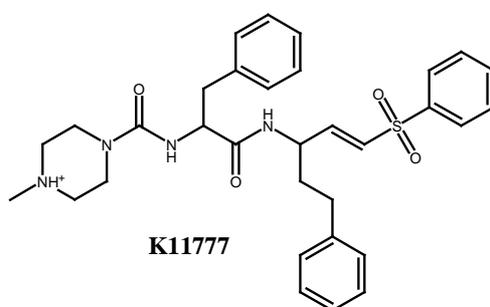


Abbildung 11: Strukturformel des Cruzain-Inhibitors K11777

### 1.5.4 Epoxybernsteinsäure-Derivate

Die in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren mit Epoxybernsteinsäure als reaktiver Einheit werden im Folgenden gesondert behandelt. Im Text eingefügte Sequenzen sind in Richtung der Substratbindung (von ...P2', P1' nach P1, P2...) angegeben. Nur am Rande sei erwähnt, dass auch Inhibitoren mit anderen Epoxid-Motiven entwickelt wurden, wie das  $\alpha,\beta$ -Epoxyketon E1 (siehe Abbildung 14), welches Aktivität gegen Cruzain besitzt. Epoxybernsteinsäure-Peptide sind die best untersuchte Gruppe der Cysteinprotease-Inhibitoren. Sie bilden mit dem katalytischen Thiol einen irreversiblen  $\alpha$ -Hydroxy-Thioether (siehe Abbildung 12) und sind aufgrund der hohen Nukleophilie der katalytischen Thiolgruppe selektiv für Cysteinproteasen<sup>[262]</sup>. Der  $pK_s$ -Wert des Cystein-Thiols beträgt 8,5, der  $pK_s$ -Wert des Histidin-Imidazols liegt bei 7<sup>[263]</sup>. Daher findet in Cysteinproteasen ein Transfer des Protons von Cystein auf Histidin statt, so dass ein Thiolat mit einem  $pK_s$ -Wert von etwa 4 entsteht. Der  $pK_s$  des nun protonierten Histidins wird dabei auf 8,5 angehoben<sup>[263]</sup>. Im Fall von Serinproteasen findet dagegen kein solcher Protonentransfer zwischen Serin Histidin statt, so dass die Nukleophilie des katalytischen Serins deutlich geringer ist.

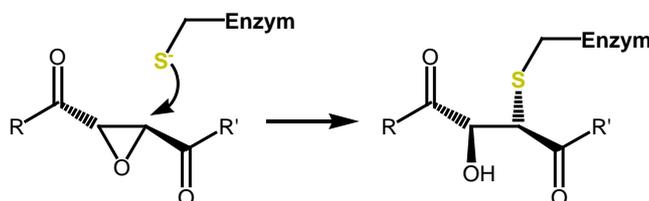
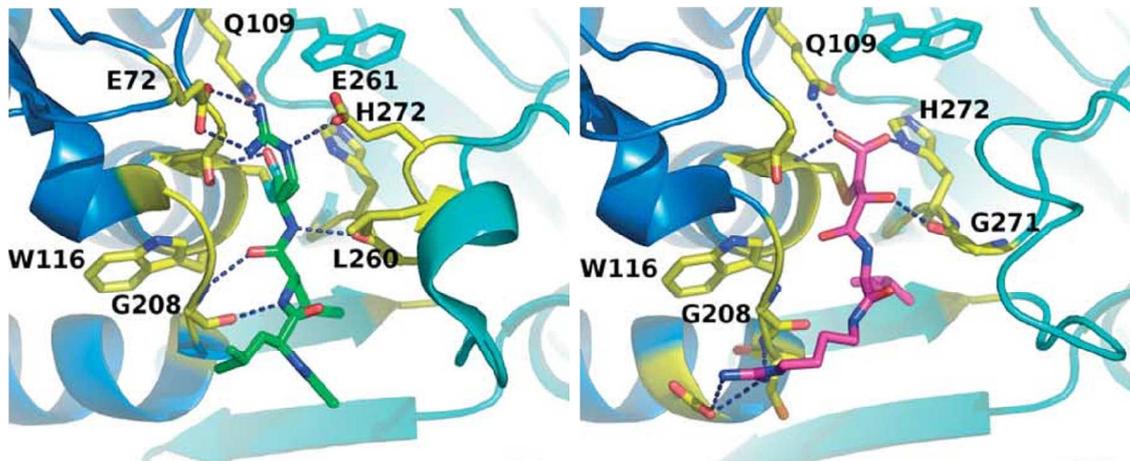


Abbildung 12: Mechanismus der Inhibierung von Cysteinproteasen durch E-64-Analoga

Das erste Molekül dieser Familie von Inhibitoren, E-64, wurde 1978 von Hanada aus *Aspergillus japonicus* TPR-64 isoliert<sup>[264]</sup> und kurz darauf totalsynthetisch hergestellt<sup>[265]</sup>. E-64-Derivate sind selektiv für papainähnliche Cysteinproteasen und weisen geringe Toxizität auf, weshalb sie zu Standardwerkzeugen biologischer und biophysikalischer Studien dieser Proteine wurden, zum Beispiel zur Titration ihrer aktiven Zentren<sup>[93, 228, 265-268]</sup>. Der hoch konservierte Bindungsmodus wurde mittels NMR<sup>[269]</sup> und Röntgenkristallographie<sup>[270-272]</sup> ermittelt. C2 des Oxiranrings ist an das Thiol gebunden und das Peptid besitzt einen propeptidartigen Bindungsmodus<sup>[271]</sup>. Die Leucin-Seitenkette ist in der S2-Tasche gebunden, während das freie Carboxyl im

Oxyanionen-Loch zu liegen kommt. Der hydrophobe Rest des Inhibitors liegt im Bindungsareal ab Position S3. SAR-Studien von E-64-Derivaten offenbarten die Anforderungen an eine effektive Bindung zur Protease. Für Calpain selbst existieren hierbei keine Daten, jedoch bestimmten Moldoveanu et al. die Struktur von  $\mu$ I-II<sup>[247]</sup>.



**Abbildung 13: Bänderdarstellung der Röntgenstruktur des Komplexes von  $\mu$ I-II mit Leupeptin (links) und E-64 (rechts). Es ist jeweils der Ausschnitt des katalytischen Spalts gezeigt. Die Inhibitoren sind jeweils als Stäbchenmodell dargestellt, die Zahlenwerte bezeichnen an der Interaktion mit dem Inhibitor beteiligte Aminosäuren der Protease.**

Barrett und Mitarbeiter entwickelten ebenfalls eine Reihe von Inhibitoren auf Basis des Epoxybernsteinsäure-Motivs. Besonders hervorzuheben sind CA030<sup>[273]</sup> und CA074<sup>[274]</sup>, die hohe Selektivität für Cathepsin B aufweisen. Wie sich zeigte, binden sie nach einem alternativen Modus, in dem die Carboxylgruppe ähnlich dem C-Terminus eines Substrats an den *occluding loop* dockt<sup>[275]</sup>. Das Peptid kommt dabei in Richtung der Substratbindung zum liegen. Anders als üblich wird der Thioether mit C3 des Epoxids gebildet, jedoch entsteht dieser Unterschied nur durch die unterschiedliche Nomenklatur (vergleiche Abbildung 14), die Lage des Epoxids im katalytischen Spalt ist tatsächlich immer gleich. Sowohl CA030 als auch CA074 sind selbst nicht membranpermeabel, im Gegensatz zu ihren Prolin-Methylestern<sup>[276]</sup>, aus denen intrazellulär der eigentliche Hemmstoff freigesetzt wird.

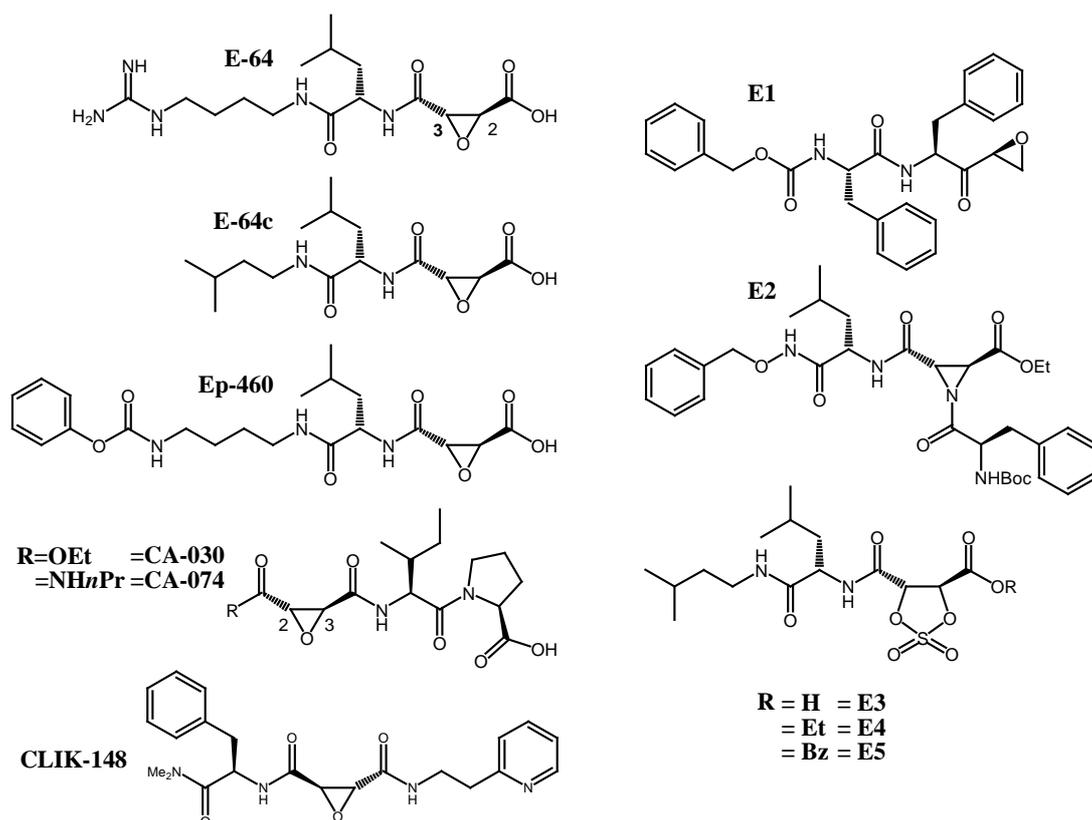
Katunuma und Mitarbeiter entwickelten eine Serie Epoxybernsteinsäure-basierter, für Cathepsin L selektiver, Inhibitoren. CLIK-066<sup>[277, 278]</sup> und CLIK-148<sup>[279]</sup> sind hervorzuheben, da beide hohe Selektivität gegenüber den Cathepsinen B, K, S, und C und gute Zellgängigkeit demonstrierten. Leider wurden nur unvollständige und

unübersichtliche Daten aufgelistet und eine Angabe kinetischer Daten fehlte gänzlich. Die Kristallstruktur des Komplexes von CLIK-148 mit Papain<sup>[279]</sup> zeigte einen E-64-artigen Bindungsmodus, in dem der Pyridinring im gestrichenen Teil des katalytischen Spalts und die Seitenkette des Phenylalanins in S2 zu liegen kommt. Der Vergleich mit den Strukturdaten für Cathepsin L, B und K ergab die Argumentation, dass der raumfüllende Pyridinring mit dem *occluding loop* von Cathepsin B unvereinbar ist<sup>[253, 275]</sup>. CLIK-079, welchem dieser Aromat fehlt, zeigte dementsprechend keinerlei Selektivität gegenüber Cathepsin B. Die Selektivität gegenüber Cathepsin K wurde mit der Größe der S2-Tasche und Unterschieden der Position 142 (Papain-Nummerierung) begründet. Während in Cathepsin K an dieser Stelle ein Glutamin zu finden ist, trägt Cathepsin L ein Leucin. Ein P1'-Lysin-Rest stabilisiert folglich die Bindung an Cathepsin K und vermindert die Selektivität der Inhibitoren. Prinzipiell erbrachten die vorgestellten *in vitro* wie *in vivo* Studien mit CLIK-148 eindrucksvolle Ergebnisse, jedoch bei teilweise sehr unübersichtlicher Datenlage<sup>[280]</sup>. So konnte der Knochenabbau durch CD34<sup>+</sup>-Tumorzellen ebenso wie durch mittels TNF- $\alpha$  angeregte Osteoklasten unterdrückt werden. Die Invasivität und Metastasierung verschiedener Knochenkrebs-Zelllinien konnte im Mausmodell sowohl bei intravenöser, als auch bei oraler Gabe verringert werden.

Ein Austausch des Epoxids führt im Allgemeinen zur dramatischen Verschlechterung der Inhibierung. Das E-64c analoge DC-11, das statt des Oxirans eine Doppelbindung trägt, ist etwa tausendfach weniger potent<sup>[281]</sup>. Aziridin-Analoga wie E2 weisen ebenfalls stark verminderte Aktivität auf<sup>[282]</sup>, Cyclopropanderivate sind inaktiv<sup>[283]</sup>. Der Austausch des Oxirans durch ein Dioxathiolandioxid<sup>[284]</sup> senkte die Affinität zu Calpain, jedoch waren die Substanzen E3-5 exzellente Inhibitoren für Cathepsin B.

Die absolute Konfiguration des Epoxids ist von entscheidender Bedeutung. Das D-(2*R*,3*R*)-Isomer von E-64 wies ein deutlich vermindertes inhibitorisches Potential auf<sup>[281]</sup>. Studien mit weiteren Derivaten zeigten zunächst ebenfalls eine klare Bevorzugung der (2*S*,3*S*)-Konfiguration<sup>[93, 285, 286]</sup>. Schaschke et al. wiederlegten jedoch die strikte Bevorzugung der (2*S*,3*S*)-Konfiguration zumindest für Cathepsin B-Inhibitoren, die mit den ungestrichenen Bindungstaschen wechselwirken<sup>[64]</sup>. Das (2*R*,3*R*)-Derivat von CA030<sup>[274]</sup> wies exzellente

Hemmwirkung und Selektivität auf und übertraf die Hemmwirkung der Stammverbindung sogar um mehr als eine Zehnerpotenz. Im Gegensatz dazu zeigt das (2*R*,3*R*)-Derivat des sehr ähnlichen CA074<sup>[274]</sup> wesentlich geringere Affinität als CA074 selbst. Für Inhibitoren wie CA030, welche in den gestrichenen Bereich des katalytischen Spalts von Cathepsin B binden, ist die Interaktion der Carboxylgruppe mit dem *occluding loop* entscheidend, weshalb Esterderivate der Verbindungen stark verminderte Aktivität zeigen. Zusammenfassend wurde geschlossen, dass die Unterscheidung nach substrat- oder propeptidähnlichem Bindungsmodus, ebenso wie die Bevorzugung eines Diastereomers von minimalen Unterschieden der Inhibitorstruktur abhängt. Offensichtlich konkurriert die Bindung des Carboxylats an den *occluding loop* mit der hydrophoben Wechselwirkung zwischen Peptid und Protease.



**Abbildung 14: Verschiedene E-64 Derivate. Für E-64 und CA-030 sind die Oxiran C-Atome nummeriert.**

Die Carboxylgruppe ist äußerst wichtig für die Interaktion mit dem Oxyanionen-Loch von Calpain. So zeigt zum Beispiel E-64d, der Ethylester von E-64c, *in vitro* ein um das ca. 100- bis 1000-fache geringeres Potential, jedoch wird die Estergruppe solcher

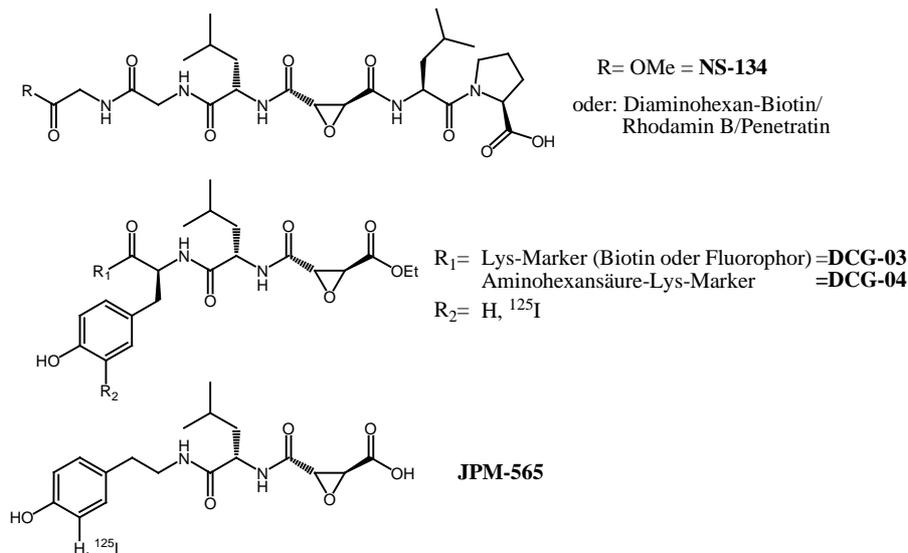
Verbindungen *in vivo* jedoch rasch durch Esterasen hydrolysiert und die ursprüngliche Verbindung wieder hergestellt<sup>[287]</sup>. Da gleichzeitig die Zellgängigkeit verbessert wird, sind solche Moleküle ideal für zellbasierte Studien geeignet. Für andere papainähnliche Cysteinproteasen ist die Gewichtung der Interaktion zwischen der Carboxylgruppe und dem Oxyanionen-Loch weit weniger ausgeprägt. Auch substituierte Carbonylverbindungen wie Amide weisen hier gute Aktivitäten auf. Dies wird zum Beispiel durch Inhibitoren wie CA074<sup>[274]</sup> oder NS-134<sup>[288]</sup> belegt, die in dieser Position ein Amid tragen und exzellente Inhibitoren für Cathepsin B sind.

Veränderungen im ungestrichenen Teil beeinflussen das inhibitorische Potential sowie die Zellpermeabilität der Hemmstoffe. Der Austausch von Agmatin aus E-64 gegen Isopentyl in E-64c steigert die Affinität des Moleküls nicht, verbessert jedoch die Zellgängigkeit<sup>[281, 289]</sup>. Werden größere hydrophobe Gruppen angeknüpft, wie zum Beispiel Z-1,4-Diaminobutyl in Ep-460, so wird die Wirksamkeit drastisch erhöht<sup>[281]</sup>. Tatsächlich zeigte sich, dass sich die geladene Guanidogruppe von E-64 nicht an der Bindung mit Calpain beteiligt und zum Lösemittel hin orientiert ist<sup>[247]</sup>.

Bei den bisher untersuchten Molekülen, in denen das P2-Leucin durch andere Aminosäuren ersetzt wurde, ist eine Verschiebung der Selektivität von Calpain zu den Cathepsinen zu beobachten<sup>[273, 274, 286]</sup>. Ein Vergleich der Kristallstrukturdaten für Komplexe von E-64-Derivaten mit Actinidin<sup>[271]</sup> und Papain<sup>[270, 290]</sup> mit der Lage des Propeptids in Procathepsin B<sup>[291]</sup> zeigen eine Verschiebung der Aminosäure-Seitenketten um etwa eine Bindungslänge, was bereits bei der Konzeption von Inhibitoren bedacht werden muss.

Leider zeigen E-64-Derivate keinerlei Selektivität innerhalb der papainähnlichen Cysteinproteasen<sup>[93, 285, 292, 293]</sup>. Ein direkter Vergleich der in der Literatur angegebenen Inhibitionskonstanten ist oft schwierig, da die Messungen bei unterschiedlichen Temperaturen erfolgten und  $k_2/K_i$ - oder  $IC_{50}$ -Werte angegeben sind. Solche Inhibitoren wurden in zahlreichen *in vitro* Untersuchungen sowohl an isolierten Proteasen, als auch in zellbasierten Experimenten als molekulare Werkzeuge verwendet um Aufschluss über die mit den Enzymen verbundenen Prozesse zu erhalten. So wurde beispielsweise Calpain mit [<sup>3</sup>H]Ac-Ep-459 markiert um den zeitlichen Verlauf der Autolyse zu analysieren<sup>[281]</sup>.

Schaschke et al. adressierten sowohl die ungestrichenen, als auch gestrichenen Bindungsstellen von Cathepsin B. Ein erstes doppelköpfiges Epoxid mit Agmatin-Ornithin-Rest im ungestrichenen Teil wies entgegen den auf computerbasierten Modellen<sup>[275]</sup> gestützten Erwartungen keine verbesserte Bindung auf. Offensichtlich ist ein einfaches Umdrehen des Substratbindungsmotivs unzureichend. Zudem sind augenscheinlich die Beiträge einzelner Aminosäuren oder auch Peptidsequenzen nicht einfach additiv; vielmehr wird oftmals eine Bindungsgeometrie erzwungen, welche die Bindung eines anderen Strukturelements stört und so die Gesamtaffinität deutlich gegenüber dem zunächst erwarteten Wert verringert. Ein optimierter Inhibitor, NS-134, der einen Teil des Propeptids auf der ungestrichenen Seite trägt, wies wesentlich stärkere Bindung zu Cathepsin B auf<sup>[288]</sup>. Der Bindungsmodus wurde hier durch Absättigung des Glycylcarboxylats festgelegt, wie mittels Röntgenkristallographie bestätigt werden konnte<sup>[294]</sup>. Der Inhibitor erstreckt sich von S4 bis S2', das Epoxid bindet wie E-64 mit C2. Überraschend zeigte sich jedoch, dass die Peptidkette nicht dem Verlauf des Propeptids von Cathepsin B, sondern vielmehr dem von Cathepsin L, K oder X folgt. Konjugate solcher Inhibitoren mit Rhodamin B oder Biotin können als Marker für die Proteomik eingesetzt werden<sup>[295]</sup>. Ein NS-134-Derivat zeigte vergleichbare Hemmung. Die Marker sind hierbei zum Solvens hin gerichtet, so dass das an die Protease gebundene Peptid mit einer Avidinsäule selektiv herauspräpariert werden kann. Das mit Biotin markierte Peptid NS-196 wurde in einer zellbasierten Studie zur Untersuchung der Rolle von Cathepsin B bei der Selbstzerstörung zytotoxischer T-Lymphozyten eingesetzt<sup>[296]</sup>. Ein Cyclodextrin-Konjugat von NS-134 wurde als molekulares Vehikel für zytotoxische Substanzen konzipiert<sup>[297]</sup>, um so gezielt Tumorzellen mit verstärkter Oberflächenexpression von Cathepsin B zu adressieren. Um die Zellgängigkeit zu verbessern, wurde zusätzlich N-terminal ein heptameres Penetratin-Peptid<sup>[298]</sup> angefügt. Das Inhibitionspotential dieses Konstrukts war gegenüber NS-134 *in vitro* nochmals um etwa das Vierfache gesteigert, in lebenden Zellen reichte etwa eine hundertfach geringere Konzentration im Vergleich zu NS-134.

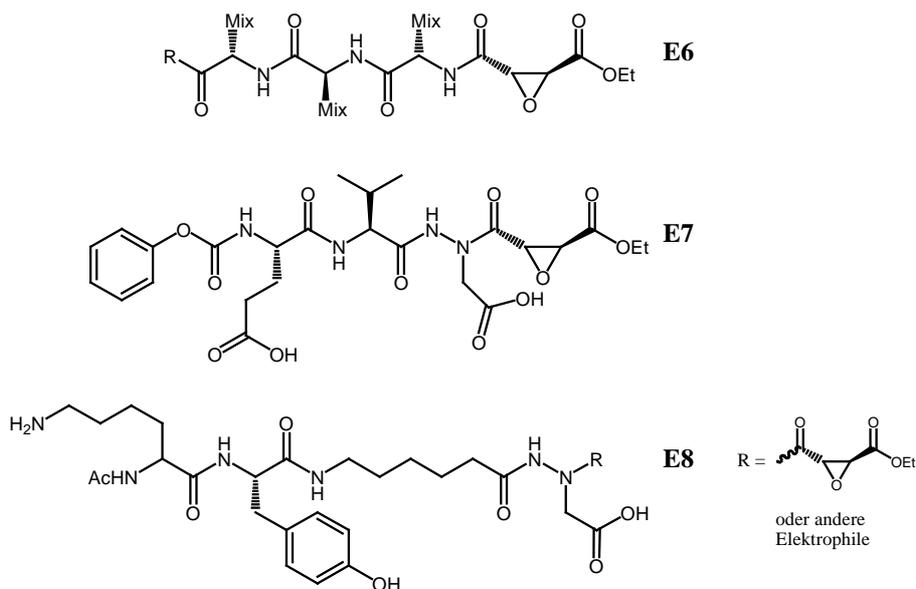


**Abbildung 15: Reporter-moleküle auf Basis von E-64.**

Das von Matsumotu et al. vorgestellte JPM-565 kann über sein Tyramin radioaktiv markiert und als Reporter-molekül eingesetzt werden<sup>[299]</sup>. Bogoyo und Mitarbeiter wurden hierdurch inspiriert, eine Bibliothek radioaktiv markierter, beziehungsweise biotinylierter Reporter-moleküle herzustellen. Die Epoxide DCG-03 und DCG-04 wurden als Sonden für Studien der zellulären Aufgaben der Cathepsine verwendet<sup>[300, 301]</sup>. Es wurde demonstriert, dass sich verschiedene Tumorzelllinien nicht nur im Expressionsmuster, sondern auch der Aktivität der einzelnen Cathepsine stark voneinander unterscheiden<sup>[302]</sup>. Das von CA074 abgeleitete MB-074<sup>[303]</sup>, in dem *n*-Propyl gegen <sup>125</sup>I-markiertes Tyramin substituiert ist, belegte in einem ähnlichen Experiment die unterschiedliche Aktivität von Cathepsin B in verschiedenen Tumorzelllinien und Extrakten verschiedener Gewebe aus Ratten<sup>[300]</sup>. DCG-04 wurde eingesetzt, um markierte Proteine mittels einer Avidin-Affinitätsäule zu isolieren. So konnten Cathepsin L, H und B mittels Sequenzierung und MS-Analyse identifiziert werden, was die Verwendbarkeit solcher Systeme für Analysen des Proteoms demonstriert. Mit einem solchen Affinitätsmarker konnte zudem die Beteiligung von m-Calpain und Calpain 3b an grauem Star untersucht werden<sup>[304]</sup>, wobei sich zeigte, dass die Aktivität von Calpain 3b aufgrund proteolytischer Prozessierung in erkranktem Gewebe bei nahezu identischer Gesamtmenge wie in gesundem Gewebe stark erhöht ist. Mit einer Bibliothek von 19 DCG-04-Derivaten, in denen die P2-Position variierte, wurden Gewebsextrakte gesunder und entarteter Proben

behandelt und die verbleibende Proteaseaktivität mit  $^{125}\text{I}$ -markiertem DCG-04 visualisiert<sup>[300]</sup>. Die Bevorzugung aliphatischer Aminosäuren in der P2-Position bestätigte sich, andere Aminosäuren führten zu schlechterer Hemmung, erhöhten jedoch teilweise die Selektivität leicht. Für Cathepsin B wurde so die Präferenz  $\text{Leu} \approx \text{Nle} \approx \text{Ile} > \text{Trp} > \text{Tyr} > \text{Phe}$  gefunden. Ein ähnlicher Ansatz mit teilrandomisierten Bibliotheken vom Typ E6 wurde für Untersuchungen der ungestrichenen Seite der Cathepsine verwendet<sup>[305, 306]</sup> und zum Patent angemeldet<sup>[307]</sup>. Anhand dieser Daten wurden geeignete Inhibitor-Kandidaten ermittelt<sup>[305, 306]</sup> und die Proteasen entsprechend ihres Inhibitionsprofils eingruppiert<sup>[306]</sup>. Unbekannte Proteasen fallen hierbei durch ihre fehlende Ähnlichkeit zu anderen Proteasen auf. Ein Konzept mit doppelköpfigen Epoxybernsteinsäure-Peptiden zur Markierung von Proteasen der Papain-Familie wurde ebenfalls entwickelt<sup>[308]</sup>.

Ein generelles Manko der E-64-Analoga ist das Fehlen von P1-Seitenketten. Die von Powers und Mitarbeitern zur Inhibierung von Caspasen entwickelten Epoxysuccinyl-Azapeptide E7, erlauben jedoch eine Adressierung der S1-Tasche von Proteasen.<sup>[309-311]</sup> Die Gruppe um Bogoy stellte eine Synthese von Azapeptiden E8 mit Epoxid-Motiv und anderen reaktiven Gruppen an fester Phase vor<sup>[312]</sup>. Solche Bibliotheken könnten zur gezielten Untersuchung der S1-Tasche verwendet werden.



**Abbildung 16: Epoxid-Bibliotheken, P1'-Azapeptide nach Powers und Bogoy**

### 1.5.5 Abschließende Bemerkungen

Insgesamt kann resümiert werden, dass vielfältige Anwendungsmöglichkeiten für niedermolekulare Inhibitoren untersucht wurden, besonders zur Behandlung einiger schwerwiegender Krankheiten. So wurden beispielsweise Anwendungen als Immunomodulatoren<sup>[313]</sup>, der Einsatz gegen Osteoporose<sup>[314-316]</sup>, bei Krebsleiden<sup>[90, 98, 317]</sup> oder Arteriosklerose<sup>[73, 318]</sup> geprüft. Leider sind trotz der erheblichen Anstrengungen die Ergebnisse als nur teilweise befriedigend zu bezeichnen. Für  $\mu$ - oder m-Calpain konnte bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt kein geeigneter Inhibitor gefunden werden. Die bisher bekannten Substanzen hemmen mindestens eine andere Protease, meist Cathepsine gleich gut oder besser als Calpain, so dass therapeutische Eingriffe in die Calpain-Aktivität immer noch außerhalb der Möglichkeiten liegen. Auf dem Gebiet der Cathepsine konnten vereinzelt Erfolgsmeldungen berichtet werden, jedoch befinden sich bisher ausschließlich zwei gegen Cathepsin K gerichtete Wirkstoffe zur Behandlung von Osteoporose in klinischen Studien<sup>[319]</sup>. Dennoch konnten durch die Arbeiten auf diesem Gebiet tiefere Einblicke in die Funktionsweise und Regulation dieser in den Schlüsselpositionen vieler zellulärer Mechanismen sitzenden Proteasen gewonnen werden.

## 1.6 Substratbibliotheken

In einer Reihe von Studien wurde die Bindung von Substraten und Substratbibliotheken an Proteasen untersucht. Die Ergebnisse hieraus können zur Entwicklung hochaffiner und spezifischer fluorogener Substrate für *in vivo*-Experimente und Untersuchung von Inhibitoren und Wirkstoffen herangezogen werden, ebenso wie zur computergestützten Suche natürlicher Proteasesubstrate in Genomsequenzen. Für die Entwicklung selektiver Inhibitoren werden Anhaltspunkte gewonnen, wenngleich die Ergebnisse nicht uneingeschränkt übertragbar sind. Einige Studien an papainähnlichen Cysteinproteasen seien hier beispielhaft vorgestellt.

### 1.6.1 Vergleich natürlicher Substrate

Tompa et al. stellten eine computergestützte Analyse von 106 Schnittstellen in 49 Substraten von  $\mu$ - und m-Calpain vor<sup>[121]</sup>. Es wurde ausschließlich die Primärstruktur zum Vergleich herangezogen und die gefundenen Häufigkeiten wurden durch Vergleich mit dem statistischen Vorkommen in den online-Datenbanken Swiss-Prot und TrEMBL<sup>[63]</sup> gewichtet. Für die Bindungstaschen S4 bis S7' wurden folgende Präferenzen gefunden:

**Tabelle 3: Präferenzen der Bindungstaschen von  $\mu$ - und m-Calpain in bezug auf natürliche Substrate nach<sup>[121]</sup>. Übereinstimmungen mit der Sequenz von CP1B (vergleiche Abschnitt 1.4.1) sind fettgedruckt.**

Position	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'	P5'	P6'	P7'
Präferenz	T	P(W)	L, T,V	K,Y,R	S,T	P,I	<b>P,T</b>	P	P	<b>C,Y(W)</b>	R

Die Präferenz für Prolin in P3' war hierbei mit dem 5,59-fachen Vorkommen im Vergleich zur statistischen Verteilung besonders ausgeprägt. Ebenfalls auffällig war eine Häufung von Aminosäuren im gestrichelten Teil, die der homologen Sequenz TIPX~~Y~~R der inhibitorischen Domänen von Calpastatin entsprechen. Die dieser Sequenz vorausgehenden Aminosäuren, Glutaminsäure und Valin, kommen dagegen so gut wie nie an den entsprechenden Stellen in Substraten vor. Global betrachtet wurden relativ häufig Regionen mit hohem PEST-Wert<sup>[320]</sup> bevorzugt. Austausch der Positionen P1 und P1' der Autolyse-Schnittstellen von Calpain B aus *Drosophila*

*melanogaster* durch selten gefundene Aminosäuren verhinderten tatsächlich die Spaltung. Interessanterweise fand jedoch eine Verlagerung der Schnittstellen statt, wobei die neuen Stellen wesentlich langsamer gespalten wurden als die nativen<sup>[121]</sup>. Das auf den Ergebnissen basierende fluorogene Substrat Dabcyl-TPLKSPPPSPR-EDANS zeigte eine deutlich höhere Umsatzrate als herkömmliche fluorogene Substrate. Ein auf den ermittelten Häufigkeiten beruhender Algorithmus konnte jedoch Spaltstellen anderer Proteine nicht mit ausreichend großer Sicherheit vorhersagen. Offensichtlich beruht die Substraterkennung durch Calpain nicht nur auf der Primärstruktur. Eine Verbindung zu hydrophoben Regionen konnte entgegen einer früheren Prognose von Sakai et al.<sup>[321]</sup> nicht gefunden werden<sup>[121]</sup>. Hingegen spielt die Sekundärstruktur eine große Rolle, da in etwa 70% der Fälle ungeordnete Bereiche des Substrats bevorzugt wurden.

### **1.6.2 Positional scanning combinatorial libraries (PS-SCL)**

Die Arbeitsgruppe Storer veröffentlichte eine Studie mit Peptiden der Sequenz Dansyl-FRXWA-OH, in denen in Position X die Aminosäuren Tyr, Phe, Leu, Val, Ala, Ser, Asn, Gln, Asp, Glu und Lys getestet wurden<sup>[322]</sup>. Im sogenannten PS-SCL-Ansatz (*positional scanning combinatorial libraries*) wurden Cathepsin B, L, S und Papain untersucht, wobei die Sequenz Phe-Arg jeweils eine Positionierung der Aminosäure X in P1'-Position sicherstellen sollte. Die Detektion erfolgte anhand der Verminderung des FRET-Effekts zwischen Tryptophan und Dansyl bei Spaltung des Peptids. Cathepsin B bevorzugte große hydrophobe Aminosäuren, Cathepsin L hingegen etwas kleinere. Für Cathepsin S zeigte sich eine leichte Präferenz für Alanin, für Papain konnte kein eindeutiger Trend bestimmt werden. Die nur geringen Unterschiede in der Effizienz der Substrathydrolyse wurden als Indiz für eine untergeordnete Rolle der ungestrichenen Taschen bei der Substratbindung angesehen.

Portaro et al. stellten eine PS-SCL-Studie an Papain, Cathepsin B und L vor<sup>[323]</sup>. Ausgehend von der Sequenz Abz-AAFRSAQ-EDDnp wurden die Positionen P4, P3, P2' und P3' jeweils durch Austausch mit anderen Aminosäuren untersucht, die Spaltung fand jeweils an der Bindung Arg-Ser statt. Es wurden ausschließlich die Aminosäuren Trp, Tyr, Phe, Leu, Ala, Ser, Asn, Asp, Lys und His verwendet, um bei

geringer Größe der Bibliothek zumindest eine Aminosäure jedes Typs (groß, klein, sauer, basisch, etc.) einzubeziehen. Die Umsatzrate wurde ebenfalls über die Abnahme des FRET-Effekts bei Spaltung des Peptids bestimmt. Folgende Präferenzen wurden gefunden:

**Tabelle 4: Präferenzen der Bindungstaschen von Cathepsin B, L und Papain in bezug auf PS-SCL Bibliotheken nach<sup>[322, 323]</sup>**

Position	P4	P3	P2	P2'	P3'
CathB	L≈F>W	L>Y	F≈R	D L,W	-
CathL	F>L>H	F≈W>H	hydrophob	W>>L≈Y	-
Papain	L>H>F	F≈L	F	W>L	hydrophob,

Für Cathepsin B wurde in einer speziell für Carboxydipeptidasen konzipierten Studie zunächst mit FRET-Peptiden der Sequenz Abz-GXXZXX(Dnp)-OH die S1-Tasche der Protease untersucht<sup>[324]</sup>. Die Positionen X waren hierbei jeweils randomisiert und Position Z wurde mit einer definierten Aminosäure belegt. Hierbei zeigte sich, dass in Position P1 Arginin am besten geeignet ist, gefolgt von Leucin, Serin und Alanin. Dieses Ergebnis floss in die Konzipierung der weiteren Bibliotheken ein, in denen die oben mit Z bezeichnete Position durch Arginin und jeweils eine der mit X bezeichneten Positionen mit definierten Aminosäuren besetzt wurde. Anhand der gefundenen Präferenzen wurde das für Cathepsin B spezifische Peptid Abz-GIVRAK(Dnp)-OH synthetisiert, welches die bis dato höchste gemessene Umsatzrate für diese Protease besitzt.

**Tabelle 5: Präferenzen der Bindungstaschen von Cathepsin B nach<sup>[324]</sup>**

Position	P3	P2	P1	P1'
Präferenz	hydrophob	Val / aliphatisch, basisch sauer	Arg > Leu, Ser, Ala	Ala, hydrophob sauer

### 1.6.3 Phage-display

Beim sogenannten *Phage-display* werden kommerziell erhältliche Bakteriophagen-Bibliotheken verwendet, die eine Vielzahl verschiedener Peptide präsentieren, die an die auf einem Trägermaterial immobilisierte Protease binden. Jeder einzelne Phage besitzt nur ein bestimmtes Oberflächenpeptid, somit kann eine Auswahl erfolgen. Nach Entfernen unspezifisch gebundener Vertreter werden Phagen höherer Avidität, und dementsprechend Peptide höherer Affinität, eluiert. Die so selektierten Phagen

können in Bakterien vermehrt und einer neuen Selektionsrunde unterworfen werden. Nach mehreren Selektionszyklen können schließlich die Phagen höchster Avidität vereinzelt und kloniert werden, deren DNS analysiert und so die Sequenz des entsprechenden Peptids ermittelt wird. Umsatzrate oder Inhibitionskonstante werden am synthetisch hergestellten Peptid bestimmt. Urleb und Mitarbeiter selektierten über Cystin-Disulfidbrücken zyklisierte Heptapeptide einer kommerziell erhältlichen Phagen-Bibliothek anhand ihrer Affinität zu Papain<sup>[325]</sup>. Es wurden 15 Phagen hoher Avidität ausgewählt und einem quantitativen ELISA-Test unterzogen. Die entsprechenden Peptide zeigten die in Tabelle 6 aufgeführten Trends. Das Peptid mit der höchsten Inhibitionskraft, CWEWGGWHCGGSS-OH (im unterstrichenen Teil über ein Disulfid zyklisiert), wies einen  $K_i$ -Wert von 7,1 $\mu$ M auf.

**Tabelle 6: Präferenzen der Bindungstaschen von Papain - Phage Display Bibliotheken nach<sup>[325]</sup>.**

Position	1	2	3	4	5	6	7
Trend	W	W,S,T	L,T,M	klein	G	Aromat	basisch

#### 1.6.4 Randomisierte harzgebundene Peptide

Die Arbeitsgruppe Meldal stellte eine Studie mit randomisierten, harzgebundenen Heptapeptiden an Papain vor<sup>[326]</sup>. Die Spaltung wurde über ein FRET-Paar aus Lys(Abz)-OH und N-terminal gebundenem Tyr(NO<sub>2</sub>) detektiert und mittels Edman-Abbau an fester Phase untersucht. Es zeigte sich, dass Tyr(NO<sub>2</sub>) eine hohe Affinität zur S2-Tasche besitzt und somit die Positionierung der Peptide bestimmte. In einem zweiten Ansatz mit Oktapeptiden sollte Prolin in C-terminaler Position die Bindung von Tyr(NO<sub>2</sub>) an S2 unterbinden. Zudem mussten saure Aminosäuren ausgeschlossen werden, da die elektrostatische Anziehung zwischen der positiv geladenen Oberfläche der Protease und sauren Peptiden eine hohe Affinität vorspiegelte. Der theoretisch mögliche Konfigurationsraum von 20<sup>7</sup> Peptiden wurde bei weitem nicht ausgeschöpft, und nur etwa 270.000 Verbindungen wurden getestet<sup>[326]</sup>.

**Tabelle 7: Präferenzen der Papain-Bindungstaschen für randomisierte Peptide nach<sup>[325]</sup>.**

Position	P3	P2	P1	S1'-S4'
Trend	P, V	hydrophob	A, G, E, R	klein

### 1.6.5 Oriented Peptide Libraries - zielgerichtete Peptidbibliotheken

Turk et al.<sup>[15, 63]</sup> stellten ein Konzept mit randomisierten sowie zielgerichteten Peptidbibliotheken zur Bestimmung der optimalen Sequenz für den ungestrichenen und gestrichenen Teil von Substraten vor. Hierbei werden zunächst N-terminal acetylierte, komplett randomisierte Peptidbibliotheken erzeugt und partiellem Verdau, in diesem Fall durch Metalloproteasen, unterworfen. Die Präferenz im C-terminalen Teil des Peptids wird durch Edman-Sequenzierung der Peptide von ihrem N-Terminus aus bestimmt und so eine Häufigkeitsverteilung für die Aminosäuren des gestrichenen Teils ermittelt. Am N-terminalen Teil, sowie in ungespaltenen Peptiden blockiert die N-terminale Acylgruppe die Sequenzierung. Nun werden teilrandomisierte Peptide mit den häufigsten C-terminalen Aminosäuren des ersten Durchlaufs, welche die Spaltstelle bereits vorselektieren, der Proteolyse unterworfen. Über eine C-terminale Biotin-Gruppe können ungespaltene Peptide, sowie die C-terminalen Reste gespaltener Peptide entfernt werden. Die N-terminalen Peptide werden erneut durch Edman-Abbau sequenziert und die Aminosäurepräferenz der ungestrichenen Seite bestimmt. Als Nachteil wurde angegeben, dass Proteasen mit schwachen Präferenzen im ungestrichenen Teil bereits im ersten Zyklus kein eindeutiges Ergebnis liefern.

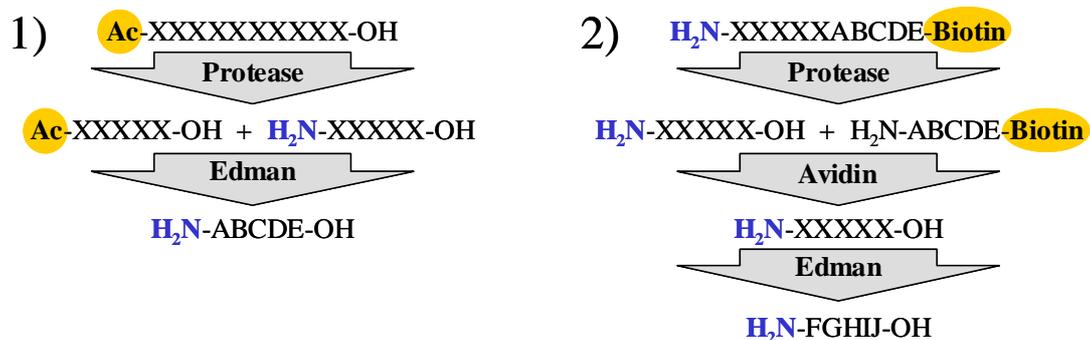


Abbildung 17: Schematische Darstellung der Aufklärung der Aminosäurepräferenzen von Protease-Bindungstaschen nach<sup>[15, 63]</sup>. 1) Bestimmung der Präferenzen der gestrichenen Seite; 2) Bestimmung der Präferenzen der ungestrichenen Seite. Weitere Erläuterung im Text.

Die Gruppe um Davies suchte mit dieser Methode nach einem geeigneten Calpain-Substrat<sup>[327]</sup> mit Hilfe des von der selben Gruppe entwickelten  $\mu$ I-II-Konstrukts<sup>[122]</sup>. Im zweiten Zyklus wurden statt biotinylierter Peptide MAP-Dendrimere verwendet um Probleme mit dem Verlust von Biotin-Aktivität und damit verbundenem höherem Hintergrundrauschen zu vermeiden.

**Tabelle 8: Präferenzen der  $\mu$ I-II Bindungstaschen - zielgerichtete Substratbibliotheken nach<sup>[327]</sup>.**

Position	P5-P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'
Präferenz	(L, F, P)	L>V>I	L $\approx$ F	M>A>R $\approx$ K, P	M $\approx$ E $\approx$ A	R>K>P <del>polar</del>

Die Präferenz für hydrophobe Aminosäuren in den ungestrichenen Positionen ist in Übereinstimmung zu früheren Arbeiten an Peptidyl-Chloromethylketonen<sup>[211]</sup> und niedermolekularen AMC-Peptidsubstraten<sup>[241]</sup>. Als optimale Substrat-Sequenz von P3 bis P3' wurde Pro-Leu-Phe-Ala-Glu-Arg ermittelt, die in einem FRET-Testsubstrat im Vergleich zu SLY-AMC eine deutlich gesteigerte Umsatzrate aufwies.

## 2 Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der strukturellen Voraussetzungen für die Inhibierung von Enzymen aus der Familie der papainähnlichen Cysteinproteasen. Es wurden verschiedene Ansätze bearbeitet, über die Einblicke in die Wechselwirkung der Inhibitoren mit den Zielproteinen gewonnen werden sollten. Hierzu wurde eine Reihe verschiedener Peptidmoleküle, zum Teil nichtpeptidische Gruppen enthaltend, durch chemische Synthese an fester Phase hergestellt, die als Sonden zur Untersuchung der Wechselwirkung mit den Zielproteinen dienen sollten.

### *P'-Inhibitorbibliotheken*

Es wurde ein *bottom-up* Ansatz für die Entwicklung eines generellen Konzepts zur Entwicklung neuer molekularer Sonden für die Familie der papainähnlichen Cysteinproteasen verfolgt. Mit solchen Sonden sollte eine Verbesserung der Affinität und Selektivität von Inhibitoren für einzelne Mitglieder der Proteasefamilie erreicht werden. Das besondere Augenmerk lag hierbei auf der gestrichenen Seite des katalytischen Spalts der Proteasen. Zu diesem Zweck wurden teilrandomisierte Peptidbibliotheken geplant. Über eine Ankergruppe, das E64-Derivat Ep-460, sollte eine kovalente Bindung der Peptide an den Cysteinrest der katalytischen Triade abgesichert werden. Durch Bestimmung der Inhibitionskonstanten der jeweiligen Mitglieder der Bibliothek sollten die besten Inhibitoren ermittelt, und danach in einem weiteren Zyklus von Synthese und enzymkinetischen Messungen einer weiteren Optimierung zugeführt werden.

### *Verkürzte Calpastatin Peptide*

Ziel war, die minimale Aminosäuresequenz eines Peptids aus Unterdomäne B, Domäne I des humanem hepatischen Calpastatins zu ermitteln, bei der noch mindestens eine mikromolare Hemmung von  $\mu$ -Calpain erreicht würde. Das bereits bekannte aus 27 Aminosäuren bestehende synthetische Peptid (CP1B) wurde hierbei zugrunde gelegt. Hierdurch sollte eine verbesserte Kenntnis der strukturellen Voraussetzungen für eine starke Wechselwirkung zwischen Enzym und Substrat

gewonnen und gleichzeitig eine Vereinfachung der Synthese weiterer modifizierter Calpastatin-Peptide ermöglicht werden. Hierzu wurde die Synthese von Peptiden verschiedener Länge, sowie von C- und N-terminalen Fragmente und weiteren Derivaten von CP1B geplant, ebenso wie die Charakterisierung ihrer Hemmwirkung in kinetischen Assays in bezug auf Calpain.

#### *Zyklische homodetische Calpastatin Peptide*

Ausgehend von der ermittelten minimalen Sequenz aus dem endogenen Calpain-Inhibitor Calpastatin wurden Seitenketten-verknüpfte endozyklische homodetische Peptide konzipiert, um das weitgehend unstrukturierte Peptid in der Teilsequenz Glu<sup>10</sup>-Leu<sup>11</sup>-Gly<sup>12</sup>-Lys<sup>13</sup> (CP1B-Nummerierung) konformationell einzuschränken. Durch Verminderung der Ringgröße dieser endopeptidischen Zyklen um jeweils eine CH<sub>2</sub>-Einheit sollte der Einfluss des reduzierten konformationellen Spielraums auf die Bindungsaffinität der Peptide beleuchtet werden.

#### *CP1B Photoaffinitäts-Peptide*

Zur Ermittlung des Bindungsmodus des CP1B-Peptids an humanes  $\mu$ -Calpain war die Synthese einer Reihe von CP1B-Derivaten geplant, die eine durch UV-Licht aktivierbare reaktive Gruppe, sowie eine Biotin-Reportergruppe tragen. Nach Belichtung und partiellem Verdau des Calpains könnte dadurch das verbrückte Paar aus CP1B und dem kovalent gebundenen Calpainfragment in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Prof. Christian Sommerhoff, München, über die Biotingruppe des CP1B-Derivats mittels Gelelektrophorese und Western Blot identifiziert werden. Durch Edman-Sequenzierung und massenspektrometrische Zuordnung des erhaltenen Fragments sollten die Domänen von Calpain, welche mit CP1B in Wechselwirkung treten, bestimmt werden. Auf diese Weise könnten mögliche Kontaktstellen zwischen Calpastatin und  $\mu$ -Calpain außerhalb der katalytischen Domäne II identifiziert, und so der Bindungsmodus des überbrückenden Peptids definiert werden.

## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Konzept der P'-Bibliotheken für Calpaine und Cathepsine

Das hohe Interesse an den mit den Proteasen der Familien C01 und C02 verknüpften Prozessen führte in den letzten Jahren zu einer Verstärkung der Bemühungen zur Erzeugung geeigneter Inhibitoren für diese Enzyme. Um ein rationales Inhibitor-Design zu ermöglichen, wurde eine Vielzahl von Studien mit SAR-Untersuchungen der katalytischen Zentren der papainähnlichen Cysteinproteasen vorgestellt. Jedoch handelt es sich im Fall Inhibitor-basierter Studien meist um die Verbesserung von Leitstrukturen und es existieren wenige Daten aus systematischen Screenings zur Untersuchung der Präferenzen der Bindungstaschen. Beispielsweise veröffentlichte die Gruppe um Donkor eine Studie mit an Chloromethylketone konjugierten Tripeptiden<sup>[328]</sup> zur Untersuchung der Präferenzen von Calpain. Bogyo und Mitarbeiter untersuchten mit von E-64 abgeleiteten Inhibitor-Bibliotheken die Positionen P2 bis P4 mit natürlichen und nichtnatürlichen Aminosäuren. Verschiedene Cathepsine, sowohl in isolierter Form, als auch als Mischung aus zellulären Proteinextrakten, wurden untersucht<sup>[300, 305, 306]</sup>. Die in bisherigen Studien gewonnenen Daten beziehen sich jedoch fast ausnahmslos auf die ungestrichene Seite des katalytischen Spalts, so dass zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur unzureichende Kenntnisse über die S'-Region dieser Proteasen vorhanden sind. Auch für Cathepsin B, in dem der alternative Bindungsmodus (siehe Abschnitt 1.5.4) der E-64-Derivate den peptidischen Teil der Inhibitoren auf die gestrichene Seite zwingt, sind im Bereich der S'-Taschen strukturell nur einzelne Punkte auf der topographischen Karte abgesteckt. Zudem handelt es sich hierbei eigentlich um ein Zufallsprodukt. Tatsächlich wurde der Bindungsmodus von Inhibitoren wie CA030 zunächst als dem von E-64 gleichend beschrieben<sup>[273]</sup> und erst später als substratähnlich erkannt<sup>[275]</sup>, wobei die Aminosäureseitenketten in den S'-Taschen zum Liegen kommen. In einer Reihe von Studien wurden die Substrat-Präferenzen der papainähnlichen Cysteinproteasen untersucht. Dies geschah durch Vergleich natürlicher Substrate<sup>[121]</sup>, oder mittels rationaler Bibliotheken, wie *Positional scanning libraries*<sup>[322-324]</sup>, *Phage-display*<sup>[325]</sup>, komplett randomisierter<sup>[326]</sup> oder wissensbasierter Substratbibliotheken<sup>[15]</sup>.

<sup>63, 327]</sup>. Diese Ergebnisse sind jedoch nicht uneingeschränkt übertragbar auf die Entwicklung von Inhibitoren, da ihre Bindung, insbesondere die irreversibler Inhibitoren, anderen Gesetzmäßigkeiten folgt. So ist ein gutes Substrat durch einen hohen  $K_M$ -Wert bestimmt, was auf Inhibitoren logischerweise nicht zutrifft.

Im Rahmen dieser Arbeit wird die erste systematische Untersuchung der gestrichenen Seite des katalytischen Spalts der Cathepsine und Calpaine mit Hilfe fokussierter Bibliotheken irreversibler Inhibitoren vorgestellt. Die Ankergruppe wurde so gewählt, dass bereits eine Beschränkung auf Klan CA, Familie C01 und C02 bestand. Der hoch konservierte Bindungsmodus der E-64-Derivate<sup>[269-272]</sup> sicherte die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Das hier verwendete Derivat Ep-460<sup>[329]</sup> zeichnet sich durch seine besonders hohe Aktivität gegenüber den Calpainen aus. Die S2-Position ist mit einem Leucin ideal belegt, da papainähnliche Cysteinproteasen diese oder andere hydrophobe Seitenketten bevorzugen, wie aus unterschiedlichen Studien klar hervorgeht<sup>[32, 211, 241, 247, 272, 330-332]</sup>. Zwar zeigte sich für Cathepsin B eine Bevorzugung substituierter Aromaten in der P2-Position, jedoch wird Leucin ebenfalls hervorragend akzeptiert<sup>[64]</sup>. Da oberhalb von S3 eine hydrophobe Fläche vorzufinden ist<sup>[43, 247, 272, 291]</sup>, ist Ep-460 (= Z-HN-(CH<sub>2</sub>)-NH-Leu-[tEps]-OH\*) ideal geeignet, die Dipeptide für die Interaktion mit den Mitgliedern der Enzymfamilie in vergleichbarer und reproduzierbarer Weise zu positionieren. Zudem wurde so die Einbeziehung der Calpaine in die Studie erleichtert, da Ep-460 sich durch seine hohe Affinität zu den Calpainen auszeichnet. Als ein weiterer Vorteil dieser Ankergruppe zeigte sich, dass Epoxide dieses Typs ausgezeichnet handhabbar sind. Sie zeigen in trockenem Zustand keinerlei Neigung zu unerwünschten Reaktionen. Im Gegensatz zu Peptidaldehyden beispielsweise sind sie ohne weitere Vorkehrungen wie Lichtausschluss oder Schutzgas über längere Zeiträume sogar bei Raumtemperatur lagerfähig. Letztere weisen zudem eine große Tendenz zur Epimerisierung der C<sub>α</sub>-Position auf, wodurch ihre Verwendbarkeit weiter eingeschränkt wird. Allgemein besitzen Epoxybernsteinsäure-Derivate auch in Lösung nur eine sehr geringe Neigung zu

---

\* Da es sich bei Epoxybernsteinsäure um eine Di-Säure handelt, ist zu beachten, dass Leucin im linken Teil der Moleküle nicht in Standardorientierung steht.

unspezifischen Reaktionen. Die Epoxidgruppe zeigt sich erstaunlich reaktionsträge, ihre Handhabung ist sogar in stark basischen Medien mit Nukleophilen wie Hydroxyl-Ionen (siehe Abschnitt 5.3.1) unproblematisch. Hierauf begründet sich auch ihre Selektivität für Cysteinproteasen, da die Nukleophilie der katalytischen Thiolgruppe größer ist als die der Hydroxylgruppe von Serinproteasen oder anderer freier Cysteingruppen. Dies zeigt sich besonders eindrucksvoll im Fall von Calpain, das in Abwesenheit von Kalzium nicht durch E-64-Derivate inaktiviert wird<sup>[281]</sup>, da die Nukleophilie der Thiolgruppe durch den fehlenden Ladungstransfer auf den Histidinrest der katalytischen Triade stark vermindert wird. Somit ist auch ihre Beständigkeit und Selektivität *in vivo* von vornherein größer als bei anderen für Cysteinproteasen gebräuchlichen Inhibitoren.

Die Optimierung wurde in zwei Runden aufgeteilt. Im ersten Teil wurde die P1'-Position untersucht, wobei die P2'-Position randomisiert blieb. Nach Messung der Hemmkinetik jeder P1'-Bibliothek schloss sich eine zweite Optimierungsrunde an. In dieser wurde die P2'-Position untersucht, während in P1' jeweils die beste Aminosäure für die zu untersuchende Protease aus der P1'-Untersuchung verwendet wurde. Im Gegensatz zu Untersuchungen anderer Gruppen<sup>[300, 305, 306]</sup> wurde die P1'-Position bei der Untersuchung der P2'-Präferenz also nicht randomisiert. Es wurde befürchtet, dass die einzelnen Beiträge der jeweils besten Aminosäuren in P1'- und P2'-Position aus solchen voneinander unabhängigen Experimenten nicht zwingend additiv seien. Studien mit Inhibitoren für sowohl den gestrichenen wie ungestrichenen Abschnitt des katalytischen Spalts von Cathepsin B machten dies bereits deutlich<sup>[64]</sup>. Somit würde bei der Bestimmung des insgesamt besten Inhibitors ein relativ großer Fehler einfließen, der durch den hier verwendeten Ansatz vermieden werden sollte. Prinzipiell sollte eine vollständige Bibliothek am besten geeignet sein, solche Fehler auszuschließen. Jedoch ist der Informationsgehalt, der aus einem solchen Ansatz gewonnenen Ergebnisse, wenn überhaupt, nur wenig größer, der Arbeitsaufwand jedoch ungleich höher. Im Falle einer vollständigen Bibliothek müssen  $n^x$  einzelne Verbindungen hergestellt werden, in einem teilrandomisierten wie dem hier vorgestellten werden dagegen nur  $n \cdot x$  Ansätze benötigt, wobei  $n$  die Anzahl der Aminosäuren und  $x$  die Länge der Peptide bezeichnet. Bei Dipeptiden mit je 19

Aminosäuren ergibt sich so ein Verhältnis von 361 zu 38, so dass bereits hier der ungleich größere Syntheseaufwand zur Erzeugung kompletter Bibliotheken offensichtlich wird.

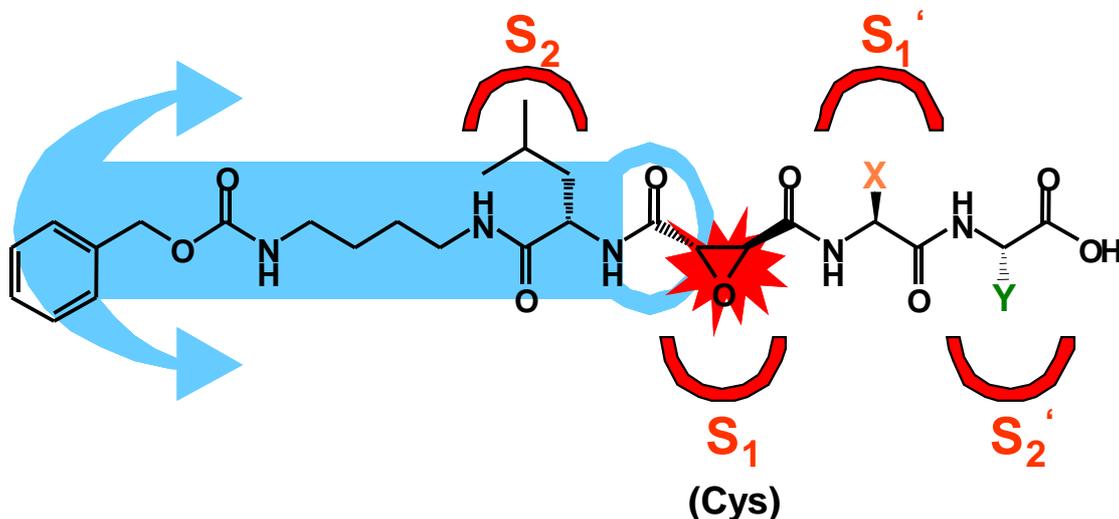


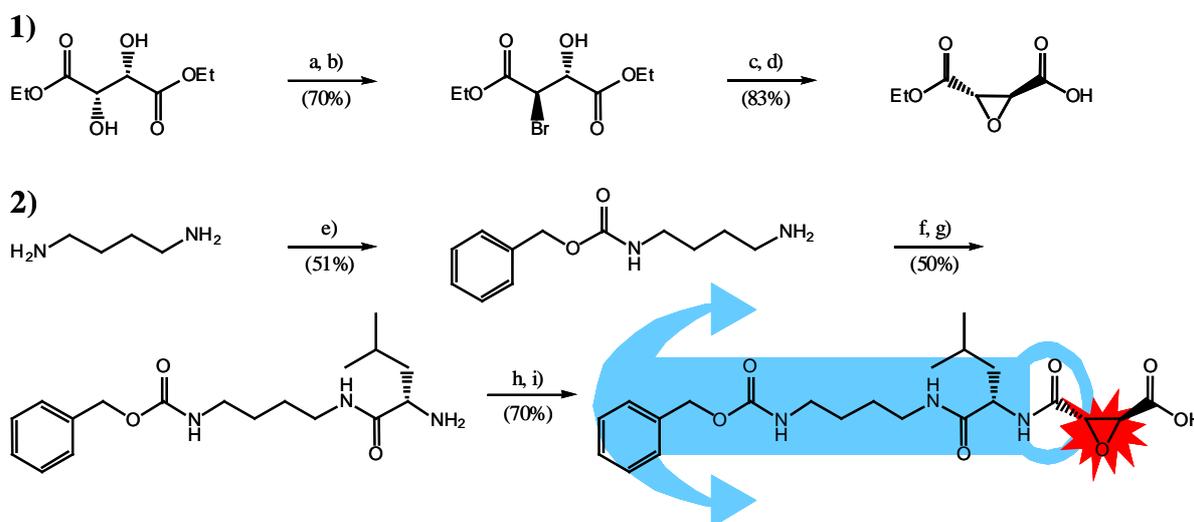
Abbildung 18: Konzept der P'-Bibliotheken. Die Ankerfunktion ist blau unterlegt, die Bindungstaschen der Protease sind in rot angedeutet. Der lineare Teil des Ankers bindet oberhalb von P2 an die Oberfläche der Protease, Leucin bindet in die S2-Tasche. Die irreversible Bindung zum katalytischen Cystein findet über die Epoxidgruppe (rot) statt. Im rechten Teil ist das Dipeptid zur Evaluierung der S'-Präferenzen der Proteasen angedeutet. Zur weiteren Erläuterung vergleiche Abbildung 20.

Im Folgenden wird zunächst die Synthese des Ankerbausteins und der Bibliotheken kurz vorgestellt und spezielle Probleme während der Synthese werden beleuchtet. Im Anschluss werden die Hemmwerte der Bibliotheken und verschiedener Einzelverbindungen erläutert und im Vergleich mit Literaturdaten diskutiert.

### 3.1.1 Synthese der P'-Sonden

#### 3.1.1.1 Synthese des Ankerbausteins Ep-460

Die Synthese von (2*S*,3*S*)-*trans*-Epoxybernsteinsäure-diethylester erfolgte analog einer enantioselektiven Prozedur aus D-(-)-Weinsäurediethylester<sup>[333]</sup>. Alle erzeugten Epoxide zeichnen sich durch hohe Beständigkeit gegenüber einer Reihe von Reaktionsbedingungen, sogar Anwesenheit von Nukleophilen aus. Tatsächlich war die selektive Abspaltung einer Ethylgruppe mittels KOH ohne Öffnung des Oxirans möglich. Auf diese Weise wurde (2*S*,3*S*)-*trans*-Epoxybernsteinsäure-monoethylester in hoher Reinheit erhalten. Da die freie Säure unter den Reaktionsbedingungen als Natriumsalz ausfällt, wurde trotz Überschusses an Base lediglich eine Carboxylgruppe entschützt. Die Synthese von *N*-Benzyloxycarbonyl-1,4-diaminobutan **JMP079** erfolgte durch substöchiometrische Zugabe von *Z*-Chlorid unter strikter pH-Kontrolle, um die selektive Reaktion nur einer der Aminofunktionen sicherzustellen, analog der von Atwell und Denny beschriebenen Prozedur<sup>[334]</sup>. Die Peptidkupplung von *N*-Benzyloxycarbonyl-*N'*-leucyl-1,4-diaminobutan **JMP052** mit Epoxybernsteinsäure wurde mit PyBop in DMF ausgeführt. Versuche mit anderen Kupplungsreagenzien führten zu heterogenen Mischungen mit sehr geringem Anteil des gewünschten Produkts. Nach dem Entfernen der Ethylschutzgruppe konnte der fertige Ankerbaustein **Ep-460** als Kaliumsalz erhalten werden.

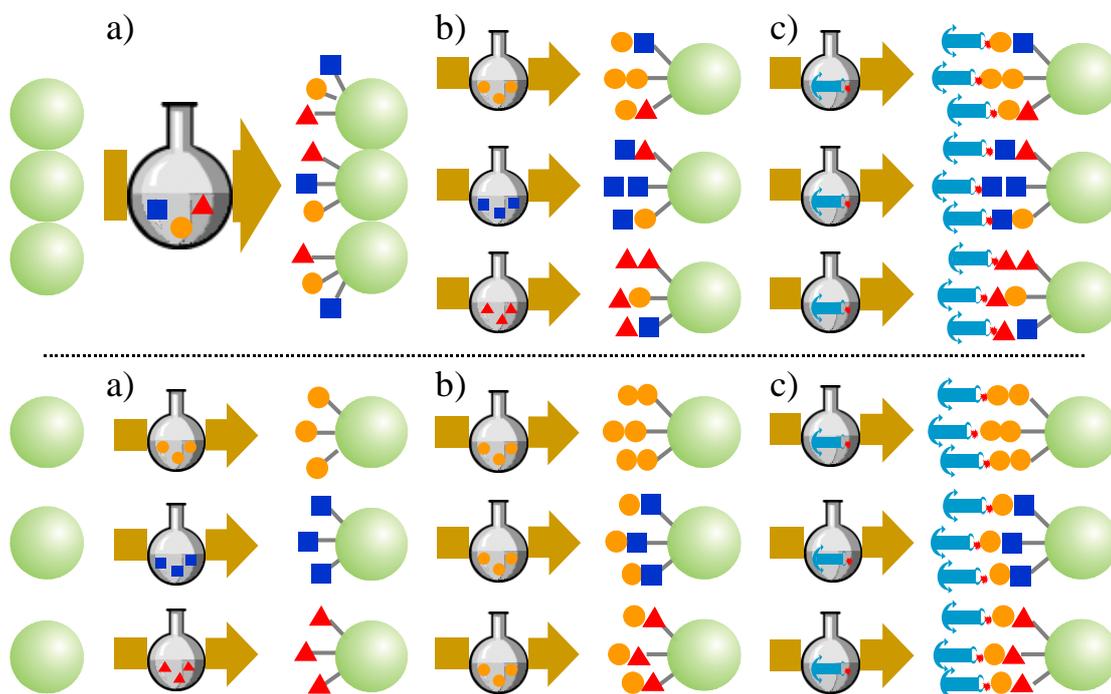


**Abbildung 19: Synthese des Ankerbausteins Ep-460**

- 1) a) HBr/HOAc, 0°C; b) HBr/HOAc 30%; c) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Aceton; d) KOH, EtOH
- 2) e) *Z*-Cl, pH4, RT; f) Boc-Leu-OSu, DIEA; g) 95% aq. TFA; h) PyBop, KO-tEps-OEt; i) KOH, H<sub>2</sub>O/Dioxan

### 3.1.1.2 Synthesekonzept der P'-Bibliotheken

Die Synthese der Peptidbibliotheken erfolgte nach der Fmoc-Strategie mit orthogonalen säurelabilen Seitenketten-Schutzgruppen. Anders als allgemein üblich wurde Arginin als ( $\omega,\omega'$ )-Boc- und nicht Pmc- oder Pbf-Derivat eingeführt, um Probleme bei der abschließenden Spaltung zu vermeiden. Zunächst wurden neunzehn teilrandomisierte Bibliotheken mit jeweils fester Aminosäure in P1'-Position erzeugt, P2' wurde durch eine isomolare Mischung von Aminosäuren belegt. Beide Positionen wurden von den proteinogenen Aminosäuren besetzt, wobei Cystein und Methionin wegen Problemen mit deren Oxidation ausgeschlossen wurden. Methionin wurde durch das isostere Norleucin ersetzt. Es folgte die Evaluierung der jeweiligen S1'-Präferenzen der Proteasen durch Messung der irreversiblen Hemmkinetiken. Daraufhin wurden je neunzehn Peptide in Parallelsynthese erzeugt, welche jeweils die am besten geeignete Aminosäure in P1' trugen. In P2'-Position befand sich bei jedem der Mitglieder jeweils eine der neunzehn oben erwähnten Aminosäuren.



**Abbildung 20: Schematische Darstellung der Synthese der P1'- und P2'-Bibliotheken**  
**Oben; P1' screening:** a) Beladung mit isokinetischer Mischung in P2', aufteilen in gleichgroße Mengen. b) Anbringen je einer definierten Aminosäure in P1'. c) Kupplung der Ankergruppe, nachfolgend TFA-Spaltung. Ermittlung des besten Kandidaten für das P2' screening.  
**Unten; P2' screening:** a) Beladung der einzelnen Harzmengen mit je einer definierten Aminosäure. b) Anbringen der besten P1'-Aminosäure. c) Kupplung der Ankergruppe, nachfolgend TFA-Spaltung. Kinetische Messungen zur Ermittlung des stärksten Inhibitors

### 3.1.1.3 Synthese der P1'-Bibliotheken

Um eine äquimolare Verteilung der Aminosäuren in P2'-Position zu erreichen, wurde eine isokinetische Mischung verwendet, wie sie von der Gruppe um Houghten vorgestellt wurde<sup>[335]</sup>. Diese Mischung wurde unter Verwendung von DIC und substöchiometrischer Mengen DMAP als Acyltransfer-Katalysator auf das Harz aufgebracht. Eine zu diesem Zeitpunkt durchgeführte Aminosäureanalyse wies eine akzeptable Abweichung von einer ideal äquimolaren Verteilung der Aminosäuren aus, jedoch war Prolin in deutlichem Unterschuss vorhanden, Arginin konnte nicht nachgewiesen werden. Das beladene Harz wurde in gleichgroße Portionen geteilt und im folgenden Kupplungsschritt wurde je eine Aminosäure in P1'-Position auf jeden Ansatz gekuppelt (siehe Abbildung 20). Das Anbringen der Ankergruppe wurde mit HOBt/HBTU in Abwesenheit von Base bewerkstelligt, da das Molekül bereits in seiner Carboxylatform vorlag. Im abschließenden Schritt wurden die Peptide vom Harz gespalten und die Seitenketten-Schutzgruppen entfernt. Hierzu wurde eine Lösung von nur 20% TFA in DCM verwendet, da höhere TFA-Konzentrationen zu teilweisem Verlust der N-terminalen Z-Gruppe führten. Hieraus ergab sich die Notwendigkeit, Arginin als Bis-Boc-Derivat einzusetzen, da das Pbf-Derivat unter den gegebenen Bedingungen nicht vollständig geschützt wurde. Die Untersuchung der Bibliotheken mittels LC-MS zeigte, dass alle Peptide, bis auf die entsprechenden Prolin- und Arginin-Derivate vorhanden waren. Das Fehlen des Prolin-Derivats kann auf die Bildung eines Diketopiperazins während der Kupplung der folgenden Aminosäure zurückgeführt werden. Diese erfolgt unter gleichzeitiger Abspaltung vom Harz und stellt ein häufig auftretendes, literaturbekanntes Problem bei Kupplungen auf ein direkt am Harz verankertes Prolin dar<sup>[336]</sup>. Da Arginin als ( $\omega,\omega'$ )-di-Boc-Derivat eingeführt wurde, fand unter den gewählten Bedingungen bei der Harzbeladung wahrscheinlich die intramolekulare Bildung eines Lactams zwischen  $N^\delta$  und der freien Säuregruppe statt, wie bereits von Cezari et al. beschrieben<sup>[323]</sup>. Auf diese Weise wurde die Aminosäure der Reaktion entzogen. Die Bibliothek wurde trotz der Abweichung von der idealen Verteilung der Aminosäuren eingesetzt, da dennoch eine Untersuchung der generellen S1'-Präferenz der Proteasen möglich ist.

### 3.1.1.4 Synthese der P2'-Bibliotheken

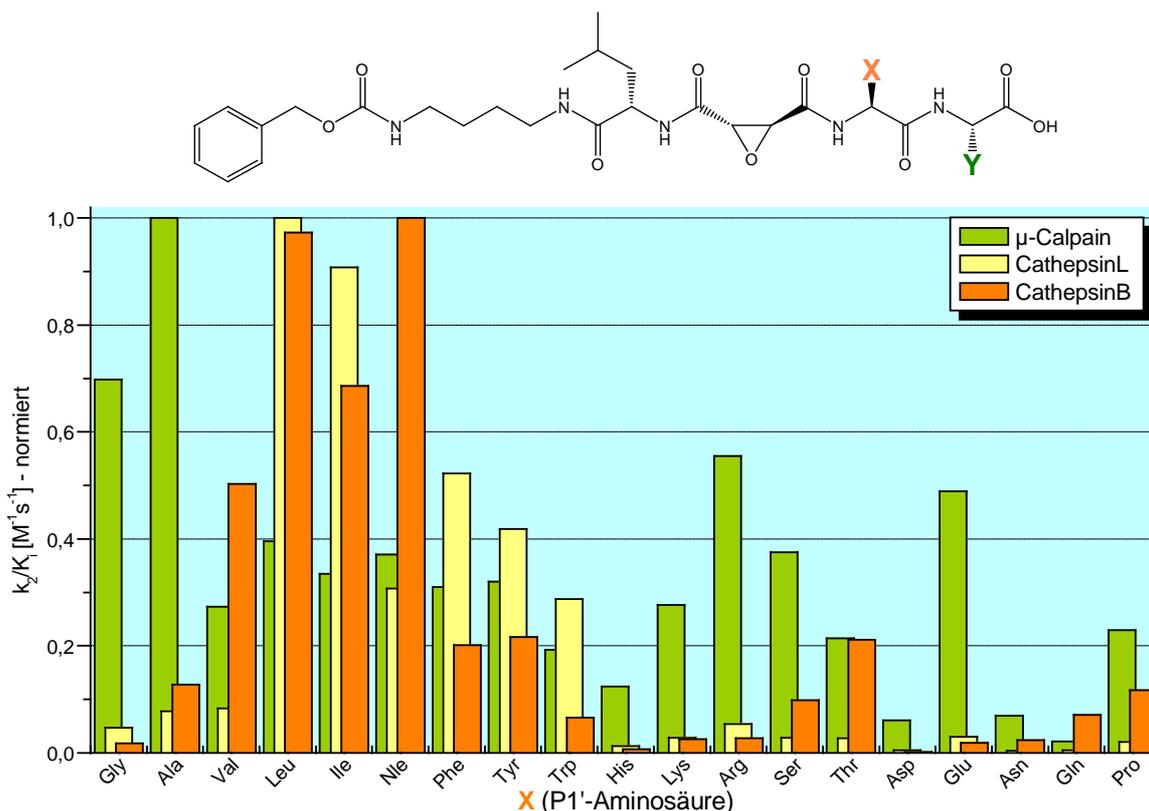
Die besten Kandidaten des P1'-Screenings wurden jeweils durch Dekonvolution der Bibliotheken weiter untersucht. Hierzu wurden die entsprechenden Gruppen von je neunzehn Aminosäuren in Parallelsynthesen hergestellt. Die Synthesen wurden mit vorbeladenen Trityl-Harzen durchgeführt, die jeweils bereits die gewünschte P2'-Aminosäure trugen. Ausnahmen stellten hierbei Norleucin, welches auf Wang-Harz beladen wurde, und Prolin dar. Um bei letzterem die Probleme des P1'-Screenings zu vermeiden, wurde ein vorbeladenes 2-Chlorotritylharz verwendet, da hier die Bildung von Diketopiperazinen an substituierten Tritylharzen vernachlässigbar ist<sup>[337, 338]</sup>. Nach Fmoc-Spaltung wurde die im P1'-Screening gefundene Aminosäure auf jeden Ansatz gekuppelt (siehe Abbildung 20). Die Abspaltung von Harz wurde mit 20% TFA in DCM bewerkstelligt. Die Aufreinigung stellte sich in einigen Fällen diffiziler dar als zunächst angenommen, da TFA-Addukte die Präzipitation erschwerten. Im Fall besonders apolarer Peptide, die ausschließlich hydrophobe Aminosäuren wie Glycin oder Phenylalanin trugen, konnte die Präzipitation durch tropfenweise Zugabe der Abspaltlösung zu einer Mischung von MTB/PE (1:2 v/v) erreicht werden. Waren polare Seitenketten anwesend, wurde die Fällung vermutlich durch die Bildung von TFA-Addukten gestört. In diesen Fällen musste die Säure zunächst im Vakuum entfernt werden. Im Fall der basischen Aminosäuren Lysin, Arginin und Histidin musste dies mit besonderer Sorgfalt durch mehrfache Co-Evaporation mit Toluol und Hexan erfolgen. Der Rückstand wurde dann in einer möglichst geringen Menge *i*PrOH aufgenommen und zu einer Lösung von MTB/PE (1:2 v/v) getropft, woraufhin die Fällung einsetzte. Die Mehrzahl der Peptide konnten direkt ohne weitere Behandlung gefriergetrocknet und danach in den kinetischen Experimenten verwendet werden. Einige Produkte mussten jedoch vorher mittels HPLC gereinigt werden, um eine sehr hohe Reinheit der Proben sicherzustellen.

### 3.1.1.5 Synthese der Cathepsin X P1'-Bibliotheken

Wie für die P2'-Bibliotheken wurden vorbeladene TCP-Harze verwendet, außer für Prolin und Norleucin. Im Verlauf der Synthese zeigte sich zudem ein Problem mit der Synthese des Arginin-Derivats, welches nur als Pbf-geschütztes Derivat an einem vorbeladenen Harz vorhanden war. Das hieraus erhaltene Rohprodukt enthielt noch einen größeren Anteil des geschützten Derivats. Das gewünschte Produkt konnte jedoch bei der Reinigung mittels RP-HPLC nicht wiedergewonnen werden. Dieser Umstand konnte mehrfach reproduziert werden, seine Ursache blieb jedoch ungeklärt. Die Beladung eines Wang-Harzes mit Fmoc-Arg(Boc)<sub>2</sub>-OH scheiterte ebenfalls, da die Absättigung der unbeladenen Hydroxylgruppen des Harzes erfolglos blieb. Ungeschütztes Harz reagierte ebenfalls mit dem Anker-Baustein, so dass das Rohprodukt erneut verunreinigt war. Bei Verwendung von Ac<sub>2</sub>O ohne Zugabe von Base erfolgte die Abspaltung der Aminosäure vom festen Träger, mit DIEA oder Lutidin fand keine Reaktion statt. Wurde DMAP verwendet, war die vornehmlich zu beobachtende Reaktion die unerwünschte Spaltung der Fmoc-Gruppen und Acetylierung der freien Aminotermini. Schließlich wurde ein 2-Cl-Trt-Harz mit Fmoc-Arg-OH beladen, welches unter sehr milden Bedingungen mit MeOH und DIEA abgesättigt werden konnte. Die Kupplung des Anker-Bausteins und Abspaltung der Peptide erfolgte wie für die Dipeptidbibliotheken beschrieben.

### 3.1.1.6 Vergleich der S1'-Präferenzen von $\mu$ -Calpain, Cathepsin B und L

Bei der Messung der kinetischen Daten der Bibliotheken ergaben sich teilweise Probleme mit der Löslichkeit der Peptide, die durch vorheriges Lösen in DMSO und anschließendes Verdünnen im Messpuffer umgangen werden konnten. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Untersuchungen vorgestellt.



**Abbildung 21: Präferenzen der S1'-Bindungstaschen von  $\mu$ -Calpain (grün), Cathepsin L (gelb) und Cathepsin B (orange). Die Position Y ist jeweils durch eine isomolare Mischung von neunzehn Aminosäuren (siehe experimenteller Teil) belegt. Es sind relative irreversible Hemmwerte ( $k_2/K_i$  [M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>]) angegeben, wobei jeweils der potenteste Inhibitor auf den Wert 1 gesetzt wurde.**

Die Auswertung der Messergebnisse der teilrandomisierten Bibliotheken (Abbildung 21) zeigt die S1'-Präferenzen der Proteasen auf. Zudem werden strukturelle Unterschiede des katalytischen Spalts der verschiedenen Enzyme sichtbar.

Im Fall von  $\mu$ -Calpain werden kleine hydrophobe Aminosäure-Seitenketten bevorzugt. Die Bibliotheken mit Alanin oder Glycin in der P1'-Position weisen mit deutlichem Abstand die höchsten Hemmwerte auf. Andere hydrophobe Seitenketten werden ebenfalls gut toleriert, die Hemmwerte solcher Inhibitoren liegen jedoch deutlich niedriger. Tatsächlich ist die Region direkt um das aktive Cystein herum bei

$\mu$ -Calpain klein und eng, so dass größere Aminosäuren zur Repulsion des Inhibitors führen. Die Gruppe um Davies zeigte anhand von aus der Röntgenstruktur von  $\mu$ I-II, einem rekombinanten Konstrukt der Domänen I und II von  $\mu$ -Calpain<sup>[122]</sup>, gewonnenen Daten, dass zwei Schleifen aus den Aminosäuren 69-82, beziehungsweise 251-261 teilweise in den katalytischen Spalt hineinragen und ihn somit im Vergleich zu anderen papainähnlichen Cysteinproteasen deutlich verengen<sup>[247]</sup>. So vermindert beispielsweise der Austausch des Oxirans von E-64 durch ein voluminöseres Dioxathiolandioxid<sup>[284]</sup> die Affinität zu Calpain, nicht jedoch zu Cathepsin B, dessen katalytischer Spalt größer ist.

Die Arginin-Bibliothek besitzt ebenfalls einen erstaunlich hohen  $k_2/K_T$ -Wert. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Bindung in diesem Fall tatsächlich nicht direkt über die S1'-Tasche, sondern über eine weiter entfernt gelegene Stelle negativen Potentials auf der Oberfläche der Protease zustande kommt. Diese kann sogar außerhalb des katalytischen Spalts liegen. So liegen beispielsweise die Aminosäuren Glu<sup>72</sup> und Glu<sup>261</sup> in Reichweite einer Arginin-Seitenkette. Die kürzere basische Aminosäure Lysin besitzt einen deutlich niedrigeren Hemmwert, da vermutlich die Länge der Seitenkette nicht ausreicht, um die Aminofunktion optimal zu positionieren. Eine ähnliche Beobachtung kann für das Paar Glutaminsäure und Asparaginsäure gemacht werden. Im Gegensatz zu Glutaminsäure wird Asparaginsäure nur sehr schlecht toleriert, so dass in diesem Fall vermutlich eine basische Stelle abseits des katalytischen Spalts nicht mehr erreicht werden kann. In einer Studie mit gerichteten, teilrandomisierten Substratbibliotheken<sup>[327]</sup> an  $\mu$ I-II fanden sich ebenfalls die Aminosäuren Alanin und Arginin unter den am besten geeigneten P1'-Resten, jedoch wurde hier Methionin als optimale Aminosäure bestimmt. Die Bibliothek mit dem isosteren Norleucin in P1' zeigt bei der hier vorgestellten Untersuchung jedoch eher eine mäßig hohe Affinität.

Tompa et al. verglichen 106 Spaltstellen 49 proteinischer Calpain-Substrate und ermittelten die am stärksten gehäuften Aminosäuren für jede Bindungsposition<sup>[121]</sup>. Sie gaben ein Peptid mit der Sequenz PLKSPSP als ideales Substrat an. In diesem Peptid liegt ein Lysinrest an P1'-Position, was im Gegensatz zu den hier gefundenen Ergebnissen steht. Studien anderer Gruppen zeigten jedoch, dass im Fall von Calpain

die Aminosäurepräferenz von Proteinsubstraten unerheblich für das Design niedermolekularer Inhibitoren und Substrate ist. In Proteinsubstraten kann diese Sequenz erheblich von der optimalen abweichen, da durch Sekundär- und Tertiärstrukturelemente auch weniger bevorzugte Bindungen so platziert werden können, dass dennoch eine Spaltung stattfindet<sup>[339]</sup>. In manchen Fällen werden sogar aus der Sequenz eines Proteinsubstrats isolierte Peptide nicht mehr prozessiert. Eine einfache statistische Auswertung der Präferenz proteinischer Substrate gibt zudem keine Information über die Kinetik der Spaltung wieder, so dass auch solche mit niedriger Affinität in eine solche Bewertung einfließen. In einer Studie mit gerichteten Peptidbibliotheken erhielten Turk und Mitarbeiter folgerichtig eine abweichende ideale P3-P3' Sequenz PLFAER<sup>[327]</sup>. Das entsprechende Peptid wies eine achtfach höhere Umsatzrate als das aus Proteinsubstraten gewonnene auf. Diese Präferenz für Alanin in P1'-Position stimmt wiederum mit der in dieser Arbeit gefundenen überein. Ein großer Teil der Affinität rührt im Falle von Calpain von der Interaktion mit der S2-Tasche her. Hier werden sowohl in proteinischen<sup>[121, 332]</sup> wie niedermolekularen<sup>[241, 327, 332]</sup> Substraten die hydrophoben Reste Leucin und Valin bevorzugt. Die Tatsache, dass dennoch ein signifikanter Unterschied zwischen den Sequenzen PLKSP und PLFAER besteht, trotz gleicher P3- und P2-Aminosäuren, macht den Anteil der gestrichenen Seite an der Wechselwirkung von Peptiden mit Calpain deutlich.

Cathepsin B bevorzugt in Position P1' ebenfalls hydrophobe Aminosäuren. Hierbei zeigt sich im Unterschied zu  $\mu$ -Calpain jedoch eine deutliche Präferenz für die größeren hydrophoben Aminosäuren Norleucin und Leucin. Seitenketten mit aromatischen Gruppen und Threonin werden ebenfalls toleriert, während saure und basische Aminosäuren zu einer deutlichen Verminderung der Hemmung führen. Die S1'-Tasche von Cathepsin B wird von Leu<sup>181</sup>, Leu<sup>182</sup>, Met<sup>196</sup> und Trp<sup>221</sup> gebildet. Daher ist die Präferenz für hydrophobe Aminosäuren bereits aufgrund der Struktur<sup>[291]</sup> zu erwarten und findet in den hier vorgestellten Ergebnissen ihre Bestätigung.

Cathepsin L zeigt eine ähnliche Präferenz der S1'-Tasche wie Cathepsin B. Größere hydrophobe Aminosäure-Seitenketten werden deutlich bevorzugt, wobei das Leucin- und Isoleucin-Derivat die höchsten  $k_2/K_i$ -Werte besitzen. Aromaten werden ebenfalls

recht gut toleriert, sogar etwas besser als von der gleichen Tasche in Cathepsin B. Saure und basische Aminosäuren werden ebenso wie von Cathepsin B nicht toleriert.

Die S1'-Bindungstaschen von Cathepsin B und L sind sich offensichtlich strukturell sehr ähnlich. Beide sind, ebenso wie P2, deutlich hydrophob. Das im Vergleich zu Leucin um eine CH<sub>2</sub>-Einheit längere Norleucin wird jedoch von Cathepsin L schlechter toleriert, während es für Cathepsin B offensichtlich die beste Raumerfüllung bietet. Die Bindungstasche von Cathepsin L ist offenbar etwas flacher, dafür ein wenig breiter, da verzweigte Reste wie Isoleucin von Cathepsin L besser akzeptiert werden. Zudem bedingt die Lage von Trp<sup>193</sup> am Boden der S1'-Bindungstasche von Cathepsin L durch  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung, dass die Bindung aromatischer P1'-Reste im Vergleich zu Cathepsin B begünstigt ist. Bei letztgenannter Protease ist der entsprechende Rest Trp<sup>221</sup> etwas in Richtung S2' verschoben<sup>[291]</sup>, so dass  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen mit S1' hier eine geringere Rolle spielen.

Eine Studie mit Peptiden der Struktur Dansyl-FRXWA-OH<sup>[322]</sup> erbrachte für Cathepsin B eine Bevorzugung hydrophober Reste, besonders von Leucin und Phenylalanin, was in guter Übereinstimmung mit den hier gefundenen Tendenzen ist. Für Cathepsin L wurden in der selben Studie Serin, Alanin und Lysin als ideale P1'-Aminosäuren angegeben, was dem hier gefundenen widerspricht. In guter Übereinstimmung ist jedoch wiederum das Ergebnis, dass saure Aminosäuren von beiden Proteasen nicht toleriert wurden und dass Cathepsin B generell größere Aminosäuren in seiner P1'-Tasche beherbergen kann als Cathepsin L.

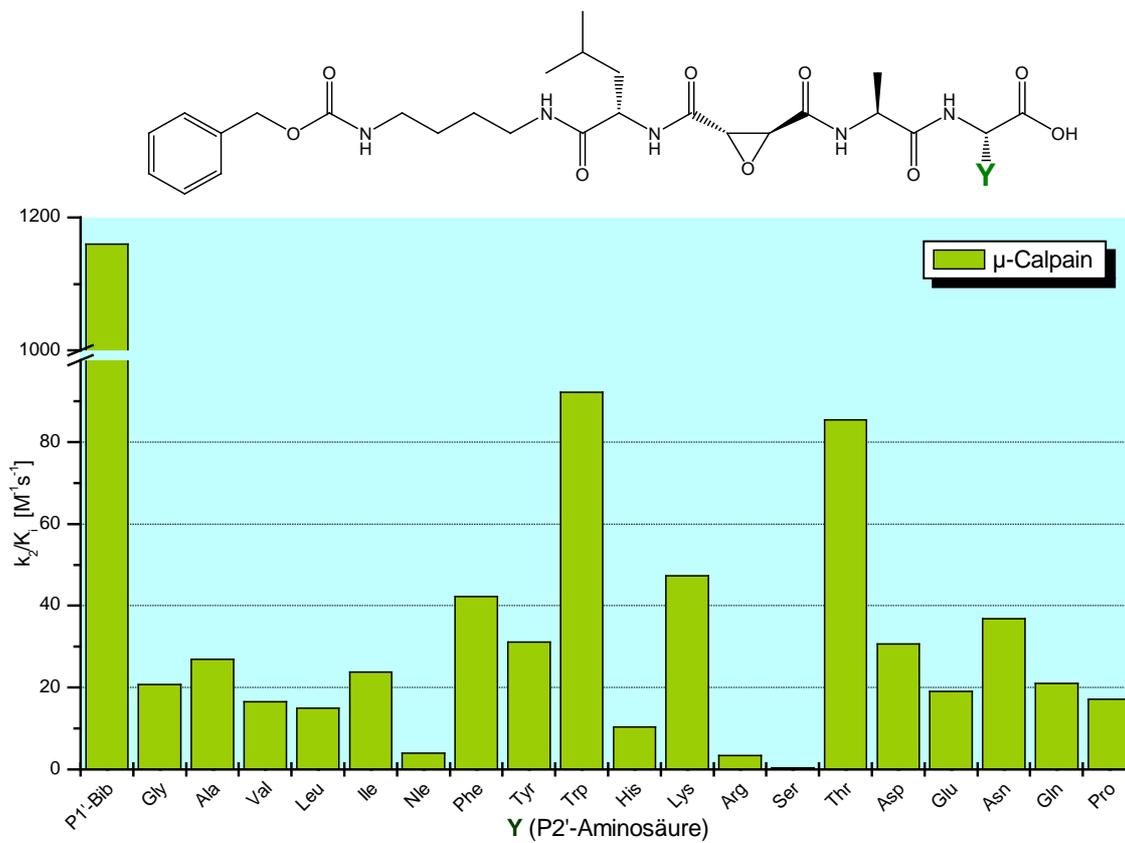
**Tabelle 9: Potenteste P1'-Inhibitorbibliotheken. Es sind jeweils die beiden Bibliotheken mit den höchsten  $k_2/K_i$ -Werten aufgeführt. Zum Vergleich ist jeweils der Hemmwert der freien Ankergruppe eingefügt.**

	$\mu$ -Calpain	Cathepsin L	Cathepsin B
<b>Anker</b>	10570	39806	$1,08 \cdot 10^5$
<b>JMP088-Ala</b>	1160		
<b>JMP088-Gly</b>	810		
<b>JMP088-Ile</b>		68930	
<b>JMP088-Leu</b>		75906	$1,15 \cdot 10^7$
<b>JMP088-Nle</b>			$1,18 \cdot 10^7$

Wie zu erwarten zeigt sich für  $\mu$ -Calpain ein deutlicher Verlust der Hemmwirkung durch den Wegfall der freien Carboxylgruppe. Bereits in früheren Studien mit Derivaten von E-64 zeigte sich, dass eine Veresterung der Carbonsäurefunktion ihre Interaktion mit dem Oxyanionen-Loch von Calpain unterbindet und zu einer drastischen Senkung der Inhibitionskonstante führt<sup>[287]</sup>. Die beste Bibliothek weist einen gemittelten Hemmwert auf, der etwa eine Größenordnung unter dem der Ankergruppe Ep-460 liegt. Dennoch können auf diesem Weg Informationen über die Beschaffenheit der gestrichenen Seite des katalytischen Spalts dieser Protease gewonnen werden, da sich die einzelnen Bibliotheken untereinander deutlich in ihren gemittelten  $k_2/K_i$ -Werten unterscheiden. Diese Unterschiede sind nur auf die Anwesenheit unterschiedlicher Aminosäuren in der P1'-Position zurückzuführen. Somit können solche Bibliotheken trotz verminderter absoluter Affinität als molekulare Messwerkzeuge wertvolle Dienste bei der Ergründung der Beschaffenheit der Oberfläche der Protease leisten.

Für Cathepsin B und L zeigt sich hingegen bereits für die P1'-Bibliotheken jeweils ein deutlicher Anstieg der Inhibitionskonstanten. Der für Cathepsin L ermittelte Wert von  $75906 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  für die P1'-Leucin Bibliothek ist fast doppelt so hoch, wie für die Ankergruppe allein. Für Cathepsin B konnte für die P1'-Norleucin Bibliothek mit einem Wert von  $1,18 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  sogar eine Steigerung auf das über Einhundertfache gegenüber Ep-460 erzielt werden. Diese drastische Steigerung des inhibitorischen Potentials ist leicht mit der Verschiebung der Carboxylgruppe um zwei Peptidbindungen zu erklären. In dieser Position kann diese Gruppe mit His<sup>110</sup> und His<sup>111</sup> des *occluding loop* der Protease in Wechselwirkung treten. Andere Studien zeigten bereits den großen Einfluss dieser Interaktion auf die Hemmwirkung von Inhibitoren<sup>[64, 276]</sup>. Tatsächlich erzwingt sie sogar eine Umkehr des Bindungsmodus einseitig mit Dipeptiden substituierter Epoxybernsteinsäure-Derivate im Vergleich zu anderen papainähnlichen Cysteinproteasen<sup>[275]</sup>. Solche Inhibitoren kommen bei Bindung an die gestrichene Seite des katalytischen Spalts von Cathepsin B in ähnlicher Weise wie natürliche Substrate der Protease zu liegen, und nutzen so die Carboxydipeptidase-Funktionalität von Cathepsin B zur Optimierung der Wechselwirkung aus.

### 3.1.1.7 $\mu$ -Calpain S2'-Präferenzen – Dekonvolution der P1' Alanin-Bibliothek

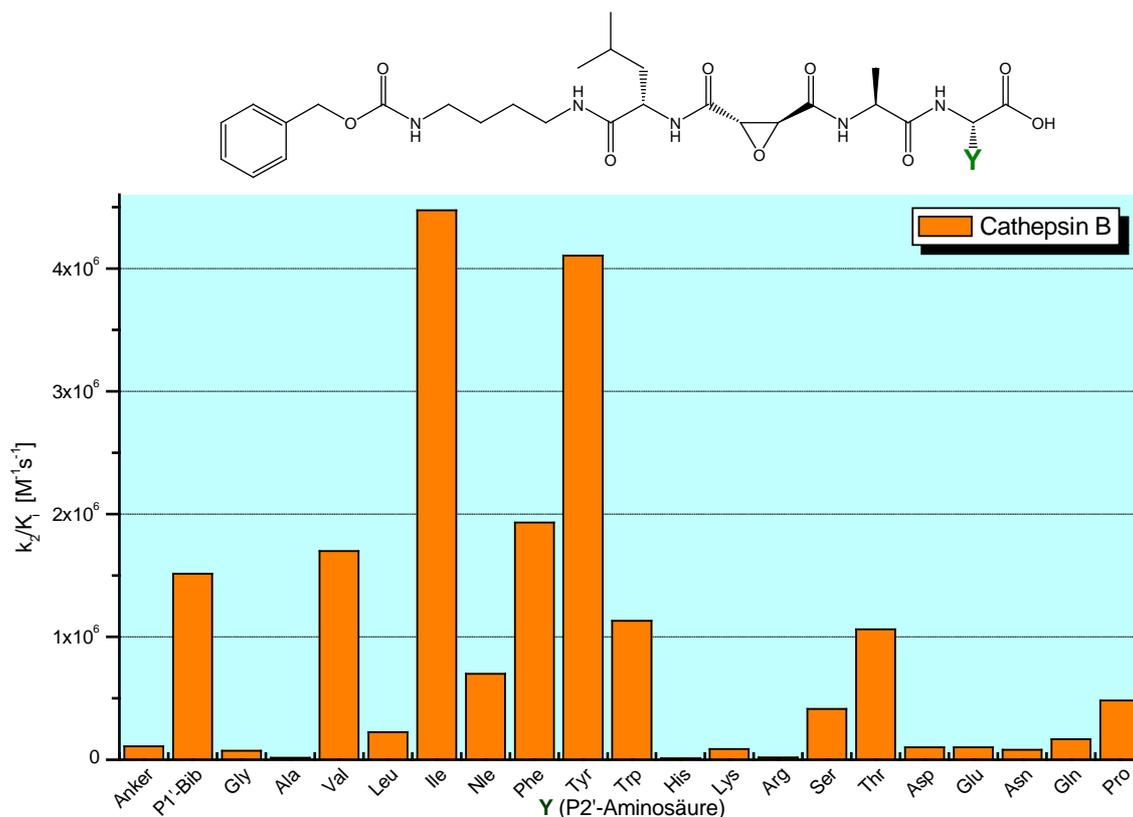


**Abbildung 22: Präferenzen der S2'-Bindungstasche von  $\mu$ -Calpain.** Die P1'-Position ist jeweils durch Alanin belegt. Es sind absolute irreversible Hemmwerte pseudo-zweiter Ordnung ( $k_2/K_i$  [ $M^{-1}s^{-1}$ ]) angegeben. P1'-Bib bezeichnet die in Abbildung 21 gezeigte Alanin-Bibliothek.

Erstaunlicherweise zeigte keine der Verbindungen aus der P2'-Bibliothek für  $\mu$ -Calpain einen annähernd ähnlichen Hemmwert wie die gemischte P1'-Alanin Bibliothek. Vielmehr weist selbst das Tryptophanderivat, der beste Inhibitor der Bibliothek, einen Hemmwert auf, der um etwa eine Zehnerpotenz unter der gemischten Bibliothek liegt. Möglicherweise liegt eine Art allosterischer Effekt vor, in dem zwei oder mehr der Inhibitormoleküle gemeinsam zur Hemmung der Protease beitragen. In Anbetracht der Vielzahl der Kombinationsmöglichkeiten wurde jedoch auf eine weitere Untersuchung dieses Effekts verzichtet. Zudem bestand keine Möglichkeit, eine Röntgenkristallstruktur von  $\mu$ -Calpain zu erhalten, so dass der genaue Mechanismus der Inhibition weiterhin im Unklaren bleibt. Die Analyse der Alanin-P1'-Bibliothek mittels LC-MS zeigte keine Verunreinigungen, so dass zumindest diese mögliche Ursache ausgeschlossen werden kann. Die aus der Kristallstruktur von  $\mu$ I-II durch Moldoveanu et al. getroffene Prognose, dass Calpain

in P2' saure Reste aufgrund der Interaktion mit Lys<sup>79</sup> bevorzugen sollte<sup>[247]</sup>, wie auch mittels teilrandomisierten Substratbibliotheken<sup>[327]</sup> gefunden wurde, konnte zumindest nicht erhärtet werden. Aufgrund der unklaren Lage dieser Ergebnisse wird an dieser Stelle auf eine weitere Diskussion der bei der Untersuchung der S2'-Tasche ermittelten Hemmwerte verzichtet, da keinesfalls eine eindeutige Zuordnung zu einer Interaktion mit dem katalytischen Spalt möglich ist.

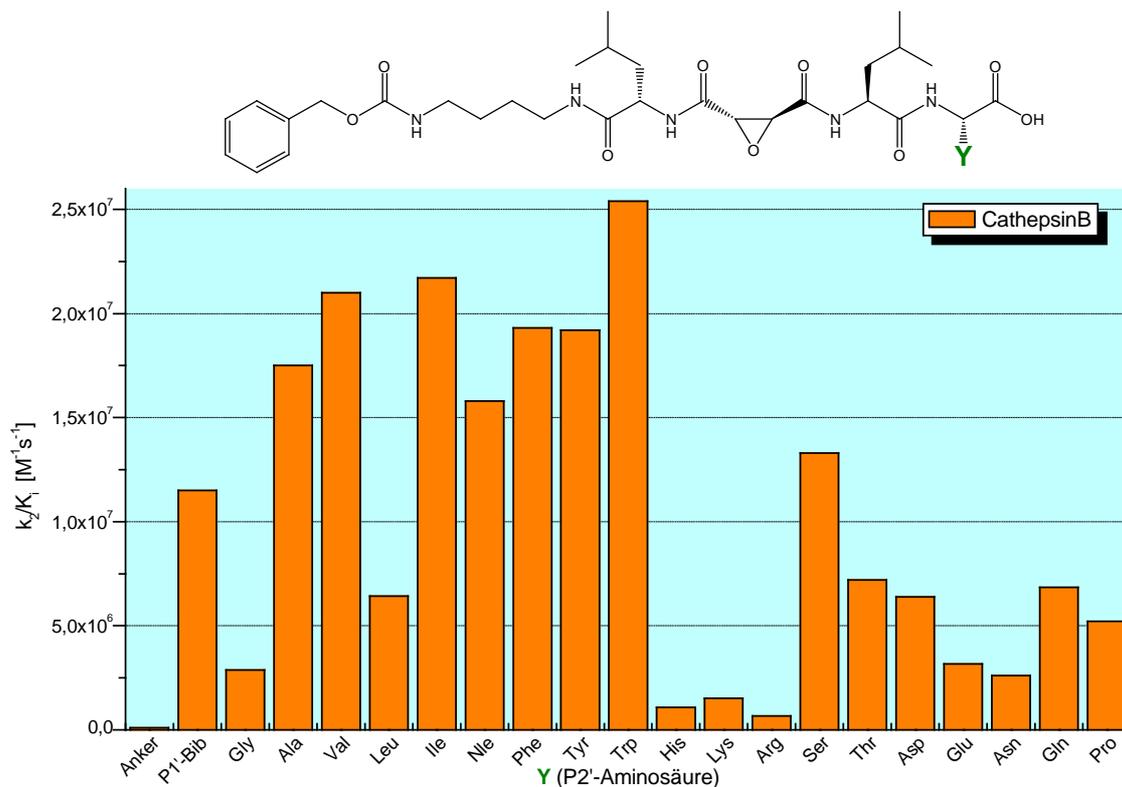
### 3.1.1.8 Cathepsin B S2'-Präferenzen – Dekonvolution der P1' Alanin-Bibliothek



**Abbildung 23: Präferenzen der S2'-Bindungstasche von Cathepsin B. Die P1'-Position ist jeweils durch Alanin belegt. Es sind absolute irreversible Hemmwerte pseudo-zweiter Ordnung ( $k_2/K_i$  [ $M^{-1}s^{-1}$ ]) angegeben. P1'-Bib bezeichnet die in Abbildung 21 gezeigte Alanin-Bibliothek.**

Der Mittelwert der P2'-Bibliothek mit Alanin als P1'-Aminosäure liegt für die Hemmung von Cathepsin B in der selben Größenordnung wie die gemischte Bibliothek aus dem P1'-Screening. Dieser Umstand kann zusätzliches als Indiz dafür angesehen werden, dass eine Verunreinigung nicht als Ursache des für  $\mu$ -Calpain beobachteten Effekts in Betracht kommt. Es zeigt sich erneut eine deutliche Bevorzugung hydrophober Aminosäure-Reste. Am besten geeignet sind in P2'-Position demnach Isoleucin und Tyrosin. Interessanterweise liegen die Hemmwerte der sehr ähnlichen Verbindungen mit Leucin- oder Norleucin-, beziehungsweise Phenylalanin-Seitenketten jeweils deutlich niedriger. Saure oder basische Gruppen werden in P2'-Position ebenso wenig toleriert wie in P1'.

### 3.1.1.9 Cathepsin B S2'-Präferenzen – Dekonvolution der P1' Leucin-Bibliothek



**Abbildung 24: Präferenzen der S2'-Bindungstasche von Cathepsin B. Die P1'-Position ist jeweils durch Leucin belegt. Es sind absolute irreversible Hemmwerte pseudo-zweiter Ordnung ( $k_2/K_i$  [M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>]) angegeben. P1'-Bib bezeichnet die in Abbildung 21 gezeigte Leucin-Bibliothek.**

Zur Ermittlung der P2'-Präferenz wurde die P1'-Leucin Bibliothek dekonvolviert. Zwar war die Inhibitionskonstante der Norleucin-Bibliothek etwas höher, jedoch war der Unterschied nur sehr gering, so dass bestenfalls sehr geringe Abweichungen in den P2'-Präferenzen zu erwarten waren. Zudem wird so der direkte Vergleich mit den P2'-Präferenzen von Cathepsin L erleichtert. Der Vergleich der Hemmwerte der P2'-Bibliothek mit Leucin in P1'-Position weist viele Gemeinsamkeiten mit der entsprechenden Bibliothek mit P1'-Alanin auf. Wiederum zeigt sich eine deutliche Bevorzugung hydrophober Aminosäuren, und Inhibitoren mit basischen sowie sauren Aminosäure-Seitenketten in P2'-Position besitzen relativ niedrige Hemmwerte. Es zeigen sich jedoch auch überraschende Unterschiede zur P1'-Alanin-Bibliothek. Zum einen ist die Toleranz gegenüber den ungünstigen basischen und sauren Resten wesentlich größer, als im Fall der Moleküle mit P1'-Alanin. Diese Beobachtung kann auf den starken Einfluss der P1'-Leucin-Seitenkette zurückgeführt werden. Die Einführung der Leucin-Seitenkette in Verbindung mit der Verschiebung der freien

Carboxylgruppe um zwei Peptidlängen erbrachte eine Steigerung des Hemmwerts um das 100-fache. Im Vergleich hierzu ist die Steigerung bei Optimierung der P2'-Position mit einem Faktor von nur etwa zwei sehr gering. Eine vergleichbare Steigerung kann auch im Fall der P1'-Alanin-Bibliothek (siehe Abbildung 23) beobachtet werden, jedoch liegen sämtliche Hemmwerte um etwa eine Größenordnung niedriger. Somit nivelliert die starke Wechselwirkung zwischen Leucin in P1'-Position und der S1'-Tasche die Differenz der Hemmwerte unterschiedlicher P2'-Aminosäuren im Vergleich zur Alanin-Bibliothek. Die zweite bemerkenswerte Änderung im Profil der Leucin-Bibliothek gegenüber der Alanin-Bibliothek ist, dass die Reihenfolge des inhibitorischen Potentials einiger der hydrophoben Aminosäuren verschoben ist. So besitzen Alanin, Valin, Isoleucin, Norleucin, Phenylalanin, und Tyrosin ähnlich große Hemmwerte. In der Alanin-Bibliothek stechen die Hemmwerte von Isoleucin und Tyrosin dagegen deutlich hervor. Besonders auffällig ist jedoch die Bevorzugung von Tryptophan in der Leucin-Bibliothek, die im deutlichen Gegensatz zur relativ schwachen Inhibition des Ala-Trp-Derivats im Vergleich zum Rest der Alanin-Bibliothek steht. Somit zeigt sich, dass die Hemmwerte einzelner Aminosäure-Seitenketten nicht nach einem simplen additiven Mechanismus korrelieren. Vielmehr beeinflusst jede Aminosäure eines Hemmstoffs - und auch eines Substrats - durch ihre einzigartige Lage auf der Oberfläche des Enzyms die Geometrie der Peptidbindungen zumindest zu ihren unmittelbaren Nachbarn. Diese wiederum können dadurch besser positioniert oder auch aus ihrer optimalen Lage herausgedreht werden. Eine einfache Extrapolation der Beschaffenheit eines optimalen Inhibitors aus den Präferenzen einzelner Bindungstaschen ist somit in den meisten Fällen sicherlich nicht möglich. Dadurch wird erneut bestätigt, dass aus der Untersuchung von Substratbibliotheken erhaltene Ergebnisse nicht ohne Weiteres auf das Design von Inhibitoren übertragen werden können. Bestenfalls können solche Daten als eine Art Richtschnur dienen, um die Findung geeigneter Inhibitor-Kandidaten in eine bestimmte Richtung zu lenken. Dies gilt besonders für Inhibitoren, in denen kein substratartiger Bindungsmodus vorliegt, wie auch die in dieser Arbeit verwendeten Derivate von E-64. Da das Epoxid-Motiv aus vier kovalenten Bindungen besteht, eine Peptid-Einheit jedoch nur aus drei, ergibt

sich zwangsweise gegenüber einem vergleichbaren Substrat eine leichte Verschiebung der Seitenketten auf einer der Seiten des Epoxids, möglicherweise sogar auf beiden.

Jia et al. ermittelten den Bindungsmodus eines Chloromethylketons, Z-Arg-Ser-(OBz)-MeCl, an Cathepsin B mittels Röntgenstrukturanalyse<sup>[255]</sup>. Die Bindung der Benzylgruppe bezog bei diesem Inhibitor die S1-Tasche und sogar Teile von S1' mit ein. Die S1'-Tasche wurde als relativ weiträumig und sehr hydrophob beschrieben. Die hier gefundenen Aminosäurepräferenzen unterstützen diese Aussage und weiten sie auf die S2'-Bindungsregion aus. In einer Studie mit Peptidsubstraten der Struktur Abz-AFRSXAQ-EDDnp<sup>[323]</sup> wurde Asparagin als ideale Aminosäure ermittelt, Tryptophan, Alanin und Tyrosin waren ebenfalls sehr gut geeignet, während Prolin und Leucin nicht akzeptiert wurden. Die von den hier gefundenen Präferenzen abweichende Bevorzugung von Asparagin könnte darauf zurückgeführt werden, dass es sich bei dem in der Studie verwendeten Enzym um Ratten-Cathepsin B handelte, welches strukturelle Unterschiede zur humanen Protease aufweist. Die restlichen Daten zeigen jedoch sehr gute Übereinstimmung zu den hier ermittelten Messwerten.

Arbeiten von Schaschke et al. mit E-64-Analoga<sup>[288, 295, 298]</sup> machten deutlich, dass im ungestrichenen Bereich des katalytischen Spalts von Cathepsin B weniger die spezifische Abfolge einer Peptidkette entscheidend für die Bindung ist, als vielmehr das generelle Vorhandensein eines hydrophoben Ankers. Dies ist nicht weiter erstaunlich, bedenkt man die große räumliche Freiheit für Wechselwirkungen im Bereich jenseits der gut strukturierten und ebenfalls hydrophoben S2-Bindungsstelle. Sowohl Studien mit Substraten<sup>[31]</sup> als auch Inhibitoren<sup>[247, 340, 341]</sup> wiesen in diesem Bereich jeweils deutlich voneinander abweichende Präferenzen auf, in Abhängigkeit der genauen Struktur des verwendeten Molekültyps. Somit ist die Adressierung der gestrichenen Seite, insbesondere des *occluding loop* eine interessante Alternative, eine zusätzliche Differenzierung gegenüber anderen Proteasen zu erzielen.

Die hier gefundene Präferenz für eine derart große Aminosäure wie Tryptophan erscheint zunächst erstaunlich, wenn man bedenkt, dass der Raum in dieser Position durch den *occluding loop* begrenzt wird. Jedoch ist diese Bindungstasche bei Cathepsin B relativ großzügig bemessen, und sie ist von aromatischen Aminosäureresten begrenzt<sup>[291]</sup>. Der Boden der Tasche wird von Trp<sup>221</sup> gebildet und

an den Seiten flankieren Trp<sup>225</sup> und Phe<sup>180</sup>. Daher kann ein P2'-Aromat wie Tryptophan ideal durch  $\pi/\pi$ -Wechselwirkung mit den genannten Aminosäuren der Protease zur Stabilisierung der Bindung beitragen. Insgesamt bestätigt sich, dass das Bindungsareal von Cathepsin B auf der gestrichenen Seite etwas weitläufiger ist, als das von Cathepsin L, wie bereits aus der Kristallstruktur<sup>[291]</sup> zu erwarten war.

In Summe kann für die Untersuchung des ungestrichenen Bereichs des katalytischen Spalts von Cathepsin B festgehalten werden, dass eine Steigerung der Affinität um mehr als zwei Größenordnungen gegenüber dem freien Ankermolekül erreicht wurde. Dieses Ergebnis ist zum großen Teil auf die Salzbrücke zwischen der freien Carboxylgruppe und His<sup>110</sup> und His<sup>111</sup> der Protease zurückzuführen. Dennoch zeigten sich gewichtige Unterschiede in der Affinität beim Vergleich einzelner Aminosäure-Seitenketten, so dass der große Einfluss der Wechselwirkung dieser Gruppen mit den Bindungstaschen der Protease deutlich wird. Das Molekül Z-Leu-[tEps]-Leu-Trp-OH ist mit einer Inhibitionskonstante pseudo-zweiter Ordnung von  $2,54 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  der stärkste bisher literaturbekannte Inhibitor für Cathepsin B.

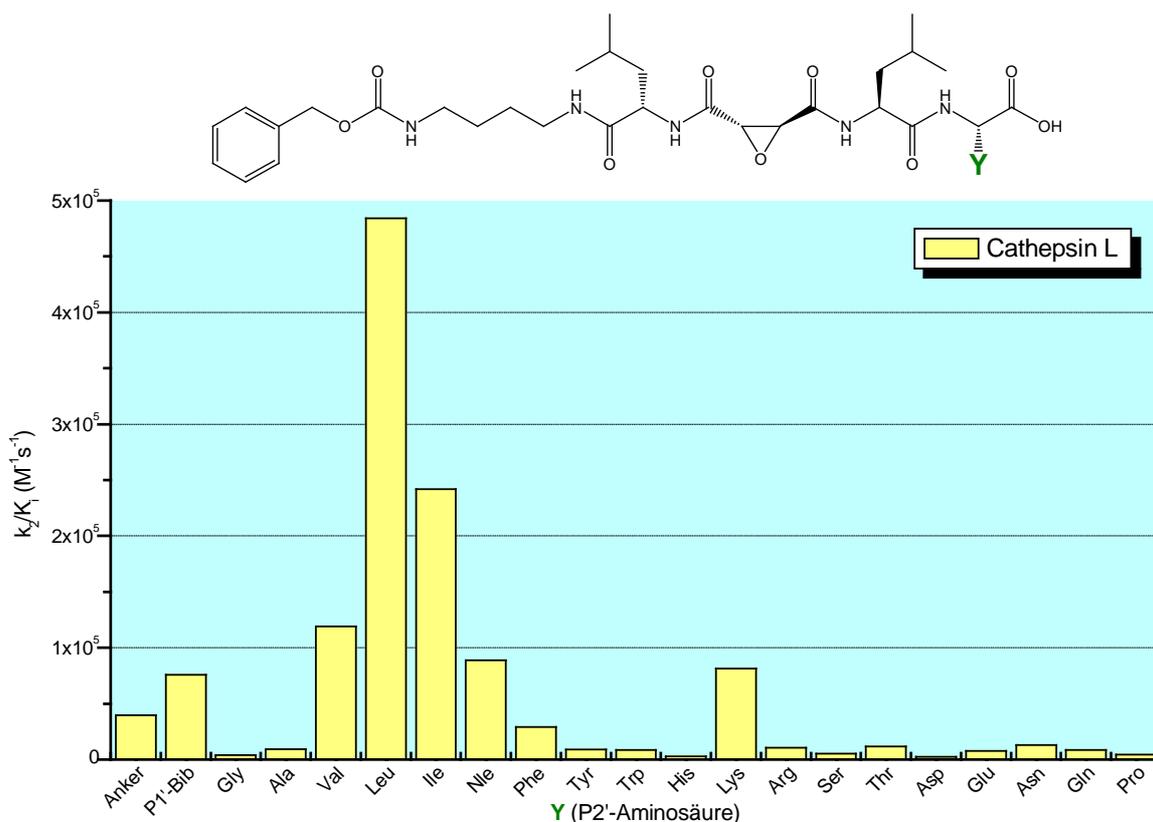
**Tabelle 10: Vergleich des besten Inhibitors für Cathepsin B, Z-HN-(CH<sub>2</sub>)-NH-L-[tEps]-LW-OH mit anderen literaturbekannten Cathepsin B-Hemmstoffen. Es werden, so vorhanden, die Hemmwerte für Cathepsin B und L angegeben, sowie die Selektivität für Cathepsin B gegenüber L. Die Stammverbindung E-64 ist für einen Vergleich ebenfalls mit aufgeführt.**

Inhibitor	Cathepsin B	Cathepsin L	Selektivität
Z-HN-(CH <sub>2</sub> )-NH-L-[tEps]-LW-OH	$2,54 \cdot 10^7$	8650	2936
MeO-GGL-(2S,3S)-[tEps]-LP-OH = NS-134 <sup>[295]</sup>	$1,52 \cdot 10^6$	1204	1262
Penetratin- $\omega$ Hex-NS-134-OH* <sup>[298]</sup>	$6,1 \cdot 10^6$	3590	1699
RhodaminB- $\omega$ Hept-NS-134-OH* <sup>[295]</sup>	$1,53 \cdot 10^6$	323	4736
Biotin-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -NH-NS-134 <sup>[295]</sup>	$1,73 \cdot 10^6$	256	6742
nPr-(2S,3S)-[tEps]-IP-OH = CA-074 <sup>[276, 303]</sup>	15800	-	-
iBu-(2S,3S)-[tEps]-IP-OH = CA-074b <sup>[276, 303]</sup>	29000	-	-
HOPhEt-(2S,3S)-[tEps]-IP-OH <sup>#</sup> = MB074 <sup>[303]</sup>	2750	-	-
E-64 <sup>[288]</sup>	81400	43800	1,9

Die Angaben der Hemmwerte verstehen sich als  $k_2/K_i$  [ $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]

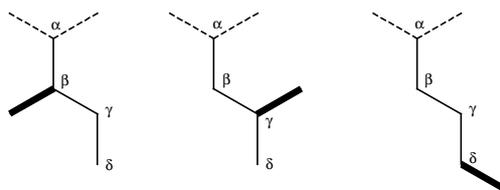
Aminosäuren sind im Einbuchstaben-Code angegeben: L = Leucin, I = Isoleucin, P = Prolin, G = Glycin, W = Tryptophan; \*  $\omega$  Hex =  $\omega$ -Aminohexansäure;  $\omega$ Hept =  $\omega$ -Aminoheptansäure

### 3.1.1.10 Cathepsin L S2'-Präferenzen – Dekonvolution der P1' Leucin-Bibliothek



**Abbildung 25: Präferenzen der S2'-Bindungstasche von Cathepsin L. Die P1'-Position ist jeweils durch Leucin belegt. Es sind absolute irreversible Hemmwerte pseudo-zweiter Ordnung ( $k_2/K_i$  [ $M^{-1}s^{-1}$ ]) angegeben. P1'-Bib bezeichnet die in Abbildung 21 gezeigte Leucin-Bibliothek.**

Die Untersuchung der Präferenz der S2'-Bindungstasche von Cathepsin L zeigt ein eindeutiges Bild. Hydrophobe aliphatische Aminosäuren werden hier stark bevorzugt, Leucin ist deutlich am besten geeignet. Die Tendenz ist ähnlich wie für die S1'-Tasche, jedoch ist die Diskrepanz der Hemmwerte ausgeprägter. Leucin besitzt eine doppelt so hohe Inhibitionskonstante, wie das Isoleucin-Derivat, welches der zweitpotenteste Inhibitor der Bibliothek ist. Hier zeigt sich, dass bereits geringe Unterschiede in der Geometrie einer Gruppe zu einer überraschend deutlichen Bevorzugung eines Derivats führen können. Die Seitenketten von Isoleucin, Leucin, und Norleucin unterscheiden sich lediglich in ihrer Konfiguration. Eine der  $CH_3$ -Gruppen ist sozusagen jeweils um ein Kohlenstoffatom weiter nach außen verschoben (siehe Abbildung 26). Somit ist ihre absolute Raumerfüllung vergleichbar, ihr Massenschwerpunkt jedoch unterschiedlich.



**Abbildung 26: Schematische Darstellung der Seitenketten von Isoleucin, Leucin und Norleucin. Die Kohlenstoffatome sind mit griechischen Buchstaben  $\alpha$ – $\delta$  bezeichnet. Die fett dargestellte Bindung ist jeweils um ein Kohlenstoffatom weiter vom  $\alpha$ -Kohlenstoffatom der Aminosäure entfernt.**

Bei der S2'-Bindungsstelle von Cathepsin L handelt es sich demnach um eine wohldefinierte Tasche mit strikten Anforderungen an bindende Aminosäuren. Überraschenderweise wies die bereits erwähnte Studie mit Peptidsubstraten der Struktur Abz-AFRSXAQ-EDDnp<sup>[323]</sup> Tryptophan als ideale P2'-Aminosäure aus, Tyrosin und Leucin wurden ebenfalls sehr gut akzeptiert. Hier zeigt sich erneut, dass eine Übertragung mittels Substratbibliotheken gewonnener Daten auf mit Inhibitor-Bibliotheken erhaltene Ergebnisse nur eingeschränkt möglich ist. Zumindest befand sich das in der vorliegenden Arbeit als ideal ermittelte Leucin auch in dieser Substratbibliothek bei den gut geeigneten Aminosäuren, so dass eine gewisse Korrelation besteht.

Insgesamt konnte gegenüber der freien Ankergruppe für das Molekül Z-HN-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NH-Leu-[tEps]-Leu-Leu-OH eine Steigerung der Inhibitionskonstante um das etwa Zwölfwache auf 484.000 M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> erreicht werden. Zwar ist ein solcher Gewinn im Vergleich zu den Ergebnissen für Cathepsin B relativ gering, jedoch fehlt bei Cathepsin L die starke ionische Wechselwirkung des Carboxylats mit den basischen Aminosäuren des *occluding loop*. Insofern ist die Diskrepanz nicht sonderlich überraschend und zeichnete sich bereits in den Ergebnissen der Messungen der P1'-Bibliotheken ab. Dennoch unterstreicht die Steigerung der Inhibitionskonstante für Cathepsin L, dass die gestrichene Seite, anders als vielfach postuliert, einen wichtigen Beitrag zur Affinität von Inhibitoren beitragen kann.

Eine Erhaltung des E-64-artigen Bindungsmodus im Molekül Z-HN-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NH-Leu-[tEps]-Leu-Leu-OH konnte nicht mit letzter Sicherheit festgestellt werden. Es ist jedoch bekannt, dass im ungestrichenen Bereich des katalytischen Spalts papainähnlicher Cysteinproteasen außerhalb von S2 keine gut ausgebildeten Taschen vorhanden sind<sup>[305, 306]</sup>. Generell weisen große hydrophobe

Gruppen besonders starke Wechselwirkung mit diesem Bereich auf und steigern daher die Affinität solcher epoxidischer Inhibitoren deutlich, wie beispielsweise beim Vergleich von E-64 und Ep-460 ersichtlich wird<sup>[281]</sup>. Daher ist kaum zu erwarten, dass ein Leu-Leu Dipeptid eine stärkere Affinität zur ungestrichenen Seite der Protease besitzt als die hydrophobe Ankergruppe.

Zum weiteren Vergleich wurde die symmetrische Verbindung Z-HN-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NH-Leu-[*t*Eps]-Leu-HN-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NH-Z synthetisiert, welche auf beiden Seiten die hydrophobe Kette der Ankergruppe trägt. Dieser Inhibitor besitzt jedoch mit 164,200 M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> einen deutlich niedrigeren Hemmwert als das Leu-Leu Derivat. Bei einer Umkehr des Bindungsmodus, in dem der Anker-Teil des Leu-Leu Derivats in der gestrichenen Seite des katalytischen Spalts zum Liegen käme, wäre die verminderte Affinität des symmetrischen Inhibitors auf den Austausch des Leu-Leu Dipeptids gegen Z-HN-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NH-Leu in der ungestrichenen Seite zurückzuführen. Dies bedeutete jedoch eine wesentlich höhere Affinität des Dipeptids im Vergleich zum hydrophoben Anker, was wiederum aus den oben angeführten Gründen unwahrscheinlich ist. Vielmehr ist zu vermuten, dass lediglich die durch das Anfügen eines Leu-Leu Peptids in Position P1' und P2' zusätzlich erhaltenen Wechselwirkungen mit der Oberfläche der Protease die Steigerung der Affinität bedingen. Die voluminöse Ankergruppe des symmetrischen Derivats wird dagegen im gestrichenen Teil des katalytischen Spalts weniger gut akzeptiert, weshalb die Affinität dieses Inhibitors gegenüber Z-HN-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NH-Leu-[*t*Eps]-Leu-Leu-OH vermindert ist.

### 3.1.1.11 S1'-Präferenzen von Cathepsin X

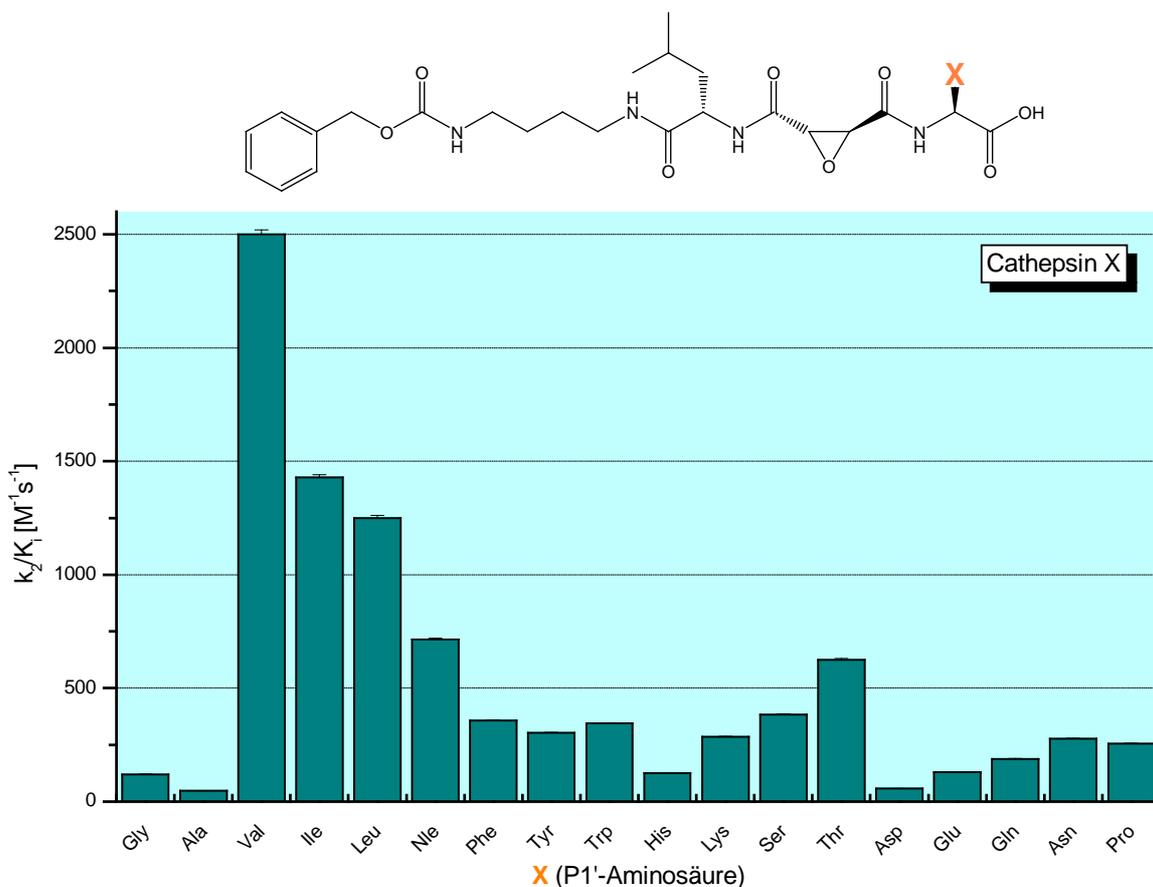


Abbildung 27: Präferenzen der S1'-Bindungstasche von Cathepsin X. Es sind absolute irreversible Hemmwerte pseudo-zweiter Ordnung ( $k_2/K_i$  [ $M^{-1}s^{-1}$ ]) angegeben.

Zur Untersuchung der Präferenz der gestrichenen Seite des katalytischen Spalts von Cathepsin X wurde eine Bibliothek mit jeweils nur einer P'-Aminosäure erzeugt. Die Lage des *mini-loop*, der die S2'-Bindungsstelle blockiert, bestimmt die Carboxymonopeptidase-Aktivität dieser Protease<sup>[43]</sup>. Somit kann nur eine Aminosäure eines Inhibitors ebenso wie eines Substrats im gestrichenen Teil zu liegen kommen. Mit Hilfe der Bibliothek konnten eindeutige Präferenzen für die S1'-Bindungsstelle gefunden werden. Erneut werden hydrophobe Aliphaten klar bevorzugt, wobei Valin die mit Abstand stärkste Wechselwirkung mit der Bindungstasche eingeht. Die Tasche ist offensichtlich eher flach, so dass kleine Reste besser toleriert werden. Mit zunehmender Länge steigt die Repulsion zwischen Inhibitor und Protease, so dass die voluminösen Aromaten schließlich kaum noch akzeptiert werden. Auch die übrigen Aminosäuren zeigen nur geringe Affinität zur Bindungstasche. Bemerkenswert ist,

dass das Alanin-Derivat einen äußerst niedrigen  $k_2/K_i$ -Wert besitzt, obwohl sicherlich keine Repulsion mit der Oberfläche der Protease zu erwarten ist. Vielmehr bietet eine einzelne Methylgruppe offensichtlich keine ausreichend große Oberfläche, um eine ausreichende Wechselwirkung mit der S1'-Bindungstasche zu ermöglichen. Es ist auch anzumerken, dass die Interaktion der freien Carboxylfunktion offensichtlich nicht den selben Effekt wie im Fall der Dipeptidbibliotheken und Cathepsin B hat. Möglicherweise wird die Carboxylgruppe nicht korrekt ausgerichtet um mit His<sup>234</sup> des *mini loop* in Wechselwirkung zu treten. Faktisch sind die synthetisierten Inhibitoren insgesamt nur mittelmäßig potent.

### 3.1.2 Resümee

Die S'-Bindungsregion von Proteasen der Familie C02 besteht nach den Röntgenstrukturen zu urteilen weniger aus einzelnen klar definierten Taschen, sondern stellt vielmehr ein flaches Areal dar<sup>[43, 247, 272, 291]</sup>. Am Boden dieses Areals bildet ein Tryptophanrest eine hydrophobe Fläche, die von meist hydrophoben Aminosäuren umrahmt wird. Es ist dementsprechend zu erwarten, dass in den P1' und P2'-Positionen besonders aktiver peptidischer Calpain- und Cathepsin-Inhibitoren vermehrt hydrophobe Aminosäuren gefunden werden. Dies bestätigt sich eindeutig in den Ergebnissen dieser Arbeit. Sowohl Cathepsin L als auch Cathepsin B bevorzugen deutlich hydrophobe aliphatische Aminosäuren in den Positionen S1' und S2'. Cathepsin X bestätigt diesen Trend ebenfalls durch seine Bevorzugung von Valin in der P1'-Position des Inhibitors. Für Calpain konnten zwar keine eindeutig interpretierbaren Resultate im Bereich der P2'-Position erhalten werden, in der P1'-Position zeigte sich jedoch eine starke Präferenz für die kleinsten hydrophoben Aminosäuren, Alanin und Glycin. Dies steht in Übereinstimmung mit den aus der Kristallstruktur abgeleiteten Erwartungen<sup>[247]</sup>. Im Gegensatz zu den hier vorgestellten Untersuchungen sind zunächst ähnlich erscheinende Studien, wie die der Gruppe um Bogyo<sup>[300, 305, 306]</sup>, auf eine Verwendung von E-64-Derivaten als Sonden für die Lokalisierung und Quantifizierung papainähnlicher Cysteinproteasen in zellbasierten Studien ausgerichtet und beschränken sich zudem ausschließlich auf den ungestrichenen Teil der Protease.

### 3.1.3 S1'-Präferenzen der Staphopaine A und B

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Professor Jan Potempa (Krakau, Polen) wurden die S1'-Präferenzen von Staphopain A und B bestimmt. Bei beiden handelt es sich um papainähnliche Cysteinproteasen aus dem pathogenen Bakterium *Staphylococcus aureus*<sup>[342]</sup>. Die genaue Funktion beider Proteasen ist bisher noch nicht bekannt. Vermutlich ist Staphopain A an der Invasivität<sup>[343]</sup> und Staphopain B an der Virulenz des Erregers<sup>[344]</sup> beteiligt.

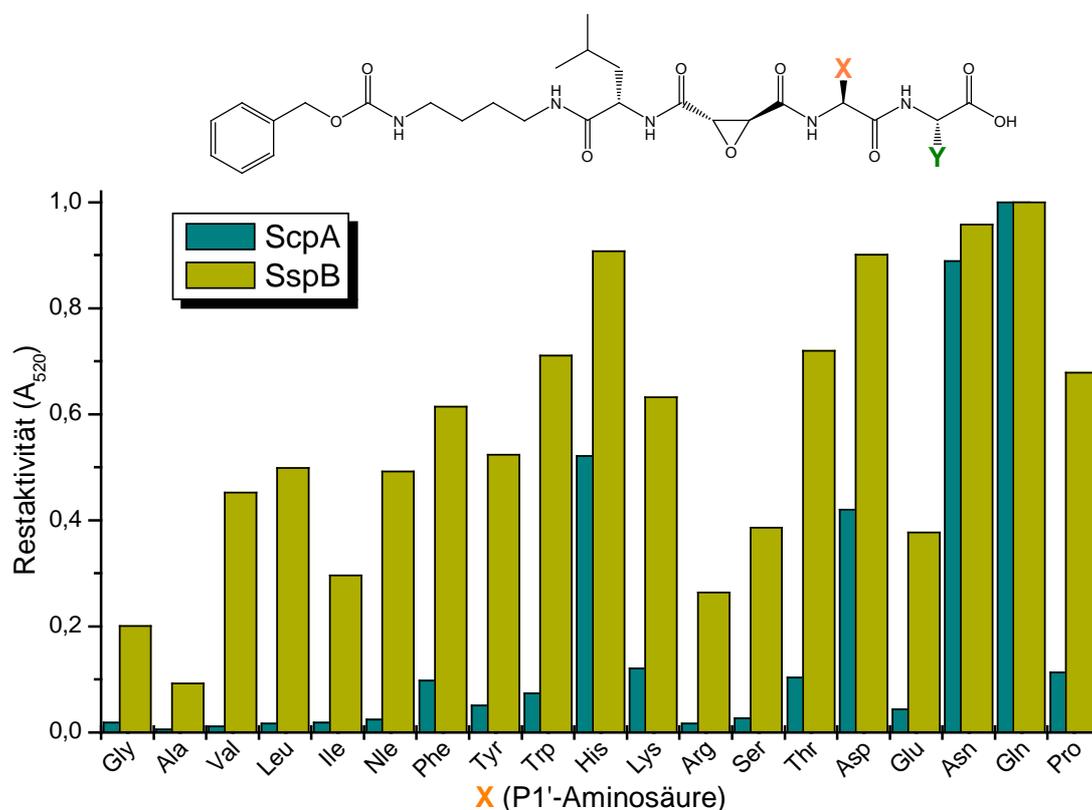


Abbildung 28: Präferenzen der S1'-Bindungstasche von Staphopain A (ScpA) und B (SspB). Die Position Y ist jeweils durch eine isomolare Mischung von neunzehn Aminosäuren (siehe experimenteller Teil) belegt. Die normierten Messwerte der Restaktivität im Azocoll-Assay (Absorption bei 520 nm) sind auf der Y-Achse aufgetragen. Im Fall von ScpA wurde das Enzym in einer Konzentration von 50 nM, im Fall von SspB 80 nM eingesetzt. In beiden Fällen betrug die Inhibitorkonzentration 10 µM.

Abbildung 28 zeigt die Präferenzen der S1'-Bindungstasche von Staphopain A (ScpA) und B (SspB). ScpA zeigt eine Präferenz für hydrophobe Aminosäuren, wobei jedoch auch Arginin, Serin und Glutamin gut toleriert werden. Innerhalb der hydrophoben Aminosäuren werden kleinere Aminosäuren bevorzugt, mit Ausnahme von Glycin, dem die Seitenkette für die Wechselwirkung mit der S1'-Tasche fehlt. Die

Bevorzugung größerer Seitenketten im Fall der basischen und sauren Aminosäuren könnte ein Hinweis auf einen alternativen Bindungsmodus sein, in dem die Seitenkette außerhalb der eigentlichen Bindungstasche zum Liegen kommt. Im Fall von SspB werden die kleinsten Aminosäuren Alanin und Glycin deutlich bevorzugt, Isoleucin wird ebenfalls recht gut toleriert. Generell sind größere Aminosäuren offensichtlich schlechter geeignet, da sie zur Repulsion mit der S1'-Tasche führen. Interessanterweise bilden Arginin und Glutaminsäure hierbei Ausnahmen. Besonders bemerkenswert ist dabei, dass die gesamte Tendenz, inklusive der beiden Ausnahmen Arginin und Glutaminsäure, der von  $\mu$ -Calpain sehr stark ähnelt.

Die hier vorgestellten Hemmwerte liegen sämtlich im mikromolaren Bereich, so dass nicht von potenten Inhibitoren gesprochen werden kann. Für das Alanin-Derivat wurde ein  $IC_{50}$ -Wert von 3,4  $\mu$ M bestimmt, für Glycin 4,9, für Arginin 5,0 und für Isoleucin 8,2  $\mu$ M. Für ScpA wurden keine Hemmwerte bestimmt, jedoch ist bereits aus den niedrigen Absorptionswerten des Azocoll-Assays zu erkennen, dass diese Protease wesentlich effizienter durch die Epoxid-Bibliotheken inhibiert wird als SspB. Mit den hier erzeugten Bibliotheken konnten interessante Einsichten in die Geometrie der Bindungstaschen einer bisher strukturell wenig untersuchten Protease gewonnen werden. Zudem ergibt sich aufgrund der Ähnlichkeit des S1'-Profils von Staphopain B und  $\mu$ -Calpain die Frage, ob dies mit struktureller Ähnlichkeit einhergeht. Diese Frage wird allerdings nur durch die Aufklärung der Röntgenstrukturen zu klären sein, die zum gegenwärtigen Zeitpunkt weder für  $\mu$ -Calpain, noch für Staphopain B zur Verfügung stehen.

Die geringe strukturelle Verwandtschaft von ScpA und SspB wird ebenfalls aus den hier gewonnenen Ergebnissen ersichtlich, die sich auch in der Verschiedenheit ihrer vermuteten Aufgaben in *Staphylococcus aureus* widerspiegelt.

## 3.2 CP1B-Peptide

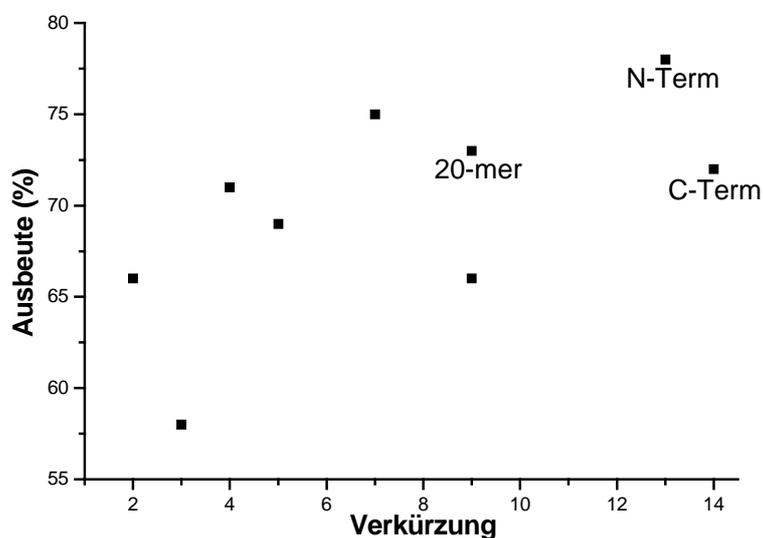
Zielsetzung war es, Einblicke in die Struktur-Wirkungsbeziehung eines aus Unterdomäne B von Domäne I aus humanem Calpastatin erhaltenen Peptids (im Weiteren mit CP1B bezeichnet) zu gewinnen. In diesem Zusammenhang wurden verschiedene Derivate dieses Peptids an einem automatisierten Batch-Synthesizer unter Verwendung der Fmoc-Strategie hergestellt. Nach erfolgter Reinigung und Gefriertrocknung wurde ihre Hemmwirkung gegenüber humanem  $\mu$ -Calpain (im Weiteren mit Calpain bezeichnet) in kinetischen Messungen quantifiziert. Um Informationen über die Beteiligung der terminalen Aminosäuren an der Bindung von CP1B an Calpain zu erhalten, wurden verschiedene verkürzte Analoga des CP1B Peptids hergestellt. Zudem sollte auf diese Weise die Synthese weiterer Derivate vereinfacht werden. Hierzu wurde die minimale Sequenz, die noch zu einer adäquaten Hemmung von Calpain ausreichend ist, bestimmt. Zunächst wurden sowohl schrittweise am C-Terminus verkürzte Varianten erzeugt, sowie solche, die N-terminal verkürzt wurden. Danach wurden die entsprechenden, an beiden Termini gekürzten Peptide hergestellt.

### 3.2.1 Synthesen der CP1B-Peptide

#### 3.2.1.1 Synthese terminal verkürzter CP1B Peptide

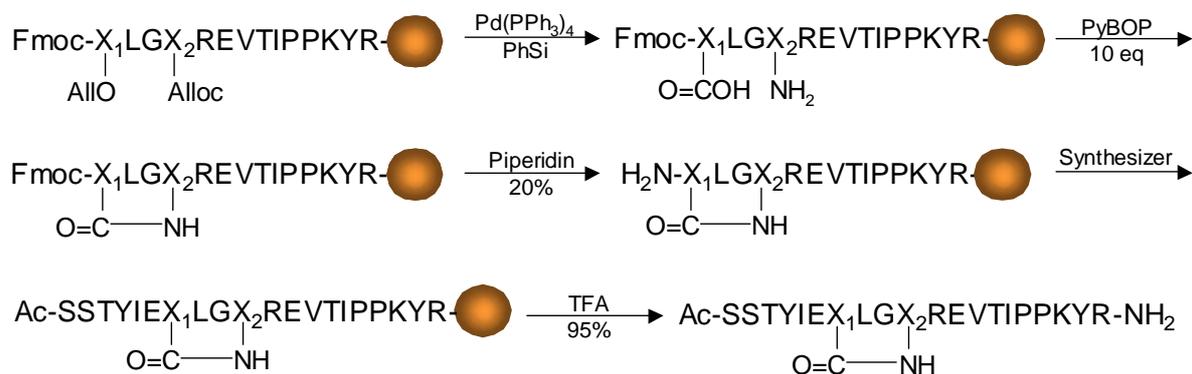
Die Synthese der linearen CP1B-Derivate wurde mit 0,25 mmol Rink-Amid-Harz am automatisierten Peptid-Synthesizer mit jeweils vierfachem Überschuss der Fmoc-Aminosäuren durchgeführt. Durch die C-terminale Amidgruppe des Rink-Harzes und N-terminale Derivatisierung mit einer Acetylgruppe wurde gesichert, dass der Einfluss des C- oder N-Terminus der Peptide auf die Bindung an  $\mu$ -Calpain vernachlässigbar ist. Die Sequenzen stellten laut der Vorhersage des Programms Peptide Companion (siehe experimenteller Teil) mäßig schwierige Syntheseprobleme dar. Daher wurden im N-terminalen Bereich Doppelkupplungen verwendet, um die Ausbeuten zu erhöhen. Tatsächlich wurden alle Peptide in guten Ausbeuten erhalten, wenn auch die Rohprodukte verunreinigt waren. Die Reinigung mittels präparativer RP-HPLC gestaltete sich erfolgreich, und Reinsubstanzen

konnten erhalten werden. Es kann resümiert werden, dass die Verkürzung Ausbeute und Reinheit der Rohprodukte allgemein verbesserte. Die Synthese der zentral überbrückten Derivate ergab deutlich geringere Ausbeuten, was zumindest im Fall des Aminocaprinsäure-Derivats sicherlich auf die hohe Hydrophobizität dieser  $\omega$ -Aminosäure zurückzuführen ist. Die Kupplung der 3,6-Dioxa-8-Aminooctansäure verlief ebenfalls mit relativ geringer Effizienz. Erstaunlicherweise gestaltete sich die Synthese des retro-inverso Derivats deutlich schwieriger, ohne dass ein offensichtlicher Grund hierfür ermittelt werden konnte. Das vollständige 27-mer CP1B wurde ebenso wie das scrambled-Derivat von einem kommerziellen Anbieter bezogen.



**Abbildung 29: Korrelation zwischen Verkürzung der CP1B-Peptide und Steigerung der Ausbeute. Das weiteren Studien zugrundegelegte 20mer ist markiert. Zum Vergleich sind zudem das N- und C-terminale Peptid ebenfalls aufgeführt.**

### 3.2.1.2 Synthese zyklischer homodetischer CP1B-Derivate



**Abbildung 30:** Schematische Darstellung der Synthese der zyklischen Peptide. X<sub>1</sub> und X<sub>2</sub> bezeichnen Platzhalter für die Aminosäuren X<sub>1</sub> = Glu, Asp, X<sub>2</sub> = Lys, Orn, Dab.

Die über Seitenketten zyklisierten Peptide **JMP106**, **107**, **108** und **111** wurden an 0,1 mmol Rink-Amid-Harz als fester Phase mit zehnfachem Überschuss der Fmoc-Aminosäuren synthetisiert und nach einer von Albericio und Mitarbeitern etablierten Methode zyklisiert<sup>[345]</sup>. Auf das mit Fmoc-Arg(Pbf) beladene Harz wurden am automatischen Synthesizer die Aminosäuren der Sequenz REVTIPPKY angefügt. Die Kupplung der folgenden vier Aminosäuren X<sub>1</sub>LGX<sub>2</sub> (X<sub>1</sub> = Asp, Glu; X<sub>2</sub> = Lys, Orn, Dab) erfolgte in der Einmalspritze. Es wurden jeweils Doppelkupplungen zu 2 Stunden mit je 4 Äquivalenten Aminosäure durchgeführt. Glutaminsäure und Asparaginsäure wurden als Seitenketten-OAll-Derivat, Lysin, Ornithin und Diaminobuttersäure durch eine Alloc-Gruppe geschützt eingesetzt. Die Freisetzung der Allyl-geschützten Seitenketten erfolgte in wasserfreiem DCM unter Schutzgasatmosphäre mit 1 mol% Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> als Katalysator und 20 Äquivalenten Phenylsilan als Reduktionsmittel. Hierbei war die Qualität des Katalysators von großer Bedeutung, da mit einer älteren Charge die Reaktion nur äußerst langsam vonstatten ging, während frischer Katalysator das Entschützen in kurzer Zeit ermöglichte. Die anschließende Zyklisierung wurde mit großen Überschüssen PyBop und HOBt bewerkstelligt, die Kontrolle vollständiger Kupplung erfolgte mittels des Tests nach Kaiser<sup>[346]</sup>. Die Reaktionszeit musste gegenüber einer gewöhnlichen Peptidkupplung deutlich verlängert werden, besonders im Fall des kleinsten Zyklus (Asp-Dab), bei dem ein weiterer Reaktionszyklus über 24 durchlaufen werden musste, um vollständige Zyklisierung zu erreichen. Dieser Umstand ist sicherlich auf die

erhöhte Ringspannung zurückzuführen. Der restliche Aufbau des N-terminalen Teils erfolgte erneut am Synthesizer. Die Absättigung des N-Terminus mit einer Acetylgruppe, ebenso wie die Abspaltung und Fällung erfolgten analog der im allgemeinen Syntheseteil beschriebenen Prozeduren. Die erhaltenen Rohprodukte, insbesondere im Falle des kleinsten Zyklus ( $X_1 = \text{Asp}$ ,  $X_2 = \text{Dab}$ ), wiesen einen hohen Grad an Heterogenität auf, so dass sich die Aufreinigung mittels RP-HPLC relativ schwierig gestaltete. Die Reinigung des Zyklus Asp-Dab erforderte sogar zwei aufeinander folgende chromatographische Reinigungsschritte.

### 3.2.2 Kinetik der Interaktion verschiedener CP1B-Peptide mit $\mu$ -Calpain

Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse der Untersuchungen an linearen CP1B-Peptiden vorgestellt, der darauf folgende Abschnitt behandelt zyklische homodetische Peptide zur Aufklärung eines spezifischen Sekundärstrukturelements.

#### 3.2.2.1 Terminal verkürzte CP1B-Peptide

Allen Messungen wurde als Vergleichswert der für das 27-mer CP1B-Peptid bestimmte  $K_i$ -Wert von 0,2 nM für  $\mu$ -Calpain zugrundegelegt (siehe Tabelle 11). Die Selektivität gegenüber Cathepsin L wurde zu einem Faktor von etwa 30000 bestimmt. Maki et al. gaben einen  $IC_{50}$ -Wert von 90-100 nM für  $\mu$ -Calpain und 20 nM für m-Calpain an<sup>[214]</sup>, die Gruppe um Anagli ermittelte einen  $IC_{50}$ -Wert von 12 nM für m-Calpain<sup>[220]</sup>. Die Inhibitionskonstante für Cathepsin B wurde ebenfalls bestimmt. Es ergaben sich für alle hier vorgestellten Peptide  $K_i$ -Werte deutlich oberhalb von 100  $\mu$ M, was aufgrund der Kollision von CP1B mit dem *occluding loop* der Protease zu erwarten war. Daher wird auf eine weitere Diskussion dieser Daten im Folgenden verzichtet. Zunächst wurde der Hemmwert eines randomisierten, kommerziell erhältlichen CP1B-Derivats als Kontrolle vermessen. Der ermittelte Wert von 6  $\mu$ M liegt um mehr als vier Größenordnungen über dem von CP1B und es bestand keine Selektivität gegenüber Cathepsin L. Um Hinweise auf eine Beteiligung des Peptidrückgrats an der Interaktion zwischen CP1B und Calpain zu erhalten, wurde ein *retro-inverso*-Derivat hergestellt und seine Inhibitionskonstante bestimmt. Als *retro-inverso* wird nach Goodman<sup>[347]</sup> die gleichzeitige Umkehr sowohl der Aminosäuresequenz, als auch der absoluten Konfiguration jeder Aminosäure bezeichnet. Hierdurch wird im Ganzen die Topologie der Seitenketten zueinander beibehalten, es ergibt sich lediglich ein Austausch der jeweiligen NH- und CO-Funktion der Amidbindung. Somit wird die Bildung möglicher zwischen dem Wildtyp-Peptid und seinem Zielprotein vorhandener Wasserstoffbrücken gestört. Eine (nahezu) unveränderte Inhibitionskonstante eines solchen *retro-inverso*-Peptids ist ein eindeutiger Hinweis dafür, dass Interaktionen zwischen Protein und Inhibitor im wesentlichen nur mit den Seitenketten des Inhibitors stattfinden und eine Beteiligung

des Rückgrats ausgeschlossen werden kann. Im hier vorliegenden Fall zeigte sich jedoch, dass das Rückgrat einen großen Anteil an der Wechselwirkung hat, da der für das *retro-inverso*-Derivat gefundene  $K_i$ -Wert von 726  $\mu\text{M}$  eine Steigerung um über sieben Größenordnungen bedeutet und daher einem vollkommenen Verlust der Affinität gleichzusetzen ist. Bei einer Suche nach peptidomimetischen Substanzen muss der Tatsache Rechnung getragen werden, dass die Hemmwirkung des CP1B-Peptids nicht allein auf seine Seitenkettenfunktionalitäten zurückzuführen ist.

**Tabelle 11: Hemmwerte der verkürzten CP1B-Peptide. Zum Vergleich ist der Hemmwert von CP1B ebenfalls angegeben. Zur Ermittlung der Selektivität der Derivate sind die Messwerte für Cathepsin L aufgeführt. Die Selektivität ist als Verhältnis der Hemmwerte Cathepsin L/  $\mu$ -Calpain angegeben, höhere Werte beschreiben höhere Selektivität. Der  $K_i$ -Wert für Cathepsin B wurde ebenfalls bestimmt. Er lag in allen Fällen oberhalb von 100  $\mu\text{M}$  und ist daher nicht aufgeführt.**

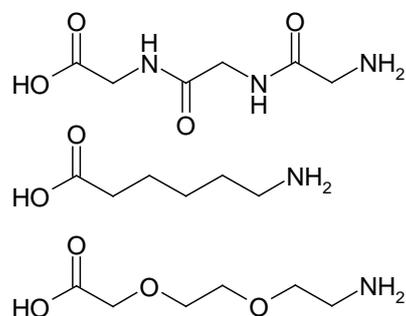
Name	Sequenz	$K_i$ [nM]		Selektivität
		$\mu$ -Calpain	Cathepsin L	
CP1B	DPMSSTYIEELGKREVTIPPKYRELLA	0,2	6000	30000
scrambled	APRLEIVPTMYIYKLSPTGSEKLGDER	6000	6000	1
retro-invers	ALLERYKPPITVERKGLEEIYTSSMPD	726000	-	-
N-Term	DPMSSTYIEELGK	6900	1000	0,14
C-Term	REVTIPPKYRELLA	35000	10000	0,29
C+N mix	1:1 Mischung N- und C-Term	8600	-	-
N-5	TYIEELGKREVTIPPKYRELLA	2,2	23000	10455
N-3	SSTYIEELGKREVTIPPKYRELLA	0,5	23000	46000
C-2	DPMSSTYIEELGKREVTIPPKYREL	0,5	45000	90000
C-4	DPMSSTYIEELGKREVTIPPKYR	0,8	21000	26250
N-5, C-4	TYIEELGKREVTIPPKYR	93,0	20000	215
<b>N-3, C-4</b>	<b>SSTYIEELGKREVTIPPKYR</b>	<b>47,0</b>	15000	319
N-3, C-6	SSTYIEELGKREVTIPPK	17000	124000	7,29
$\omega$ -AS	SSTYIEELG---TIPPKYR	125000	15000	0,12
PEG-AS	SSTYIEELG---TIPPKYR	11700	44000	3,76

Legende: retro-invers = retro-inverso Derivat von CP1B; scrambled = permutierte CP1B-Sequenz (kommerziell erhältlich); N-/C-Term = N- bzw. C-terminale Hälfte von CP1B; N/C-X = Anzahl der N- und/oder C-terminal entfernten Aminosäuren;  $\omega$ -AS =  $\omega$ -Aminohexansäure, --- markiert die Lage der Aminosäure in der Sequenz; PEG-AS = 3,6-Dioxa-8-Aminooctansäure, --- markiert die Lage der Aminosäure in der Sequenz

Ergebnisse eines von der Gruppe um Anagli ausgeführten  $\beta$ -Alanin-Scans<sup>[220]</sup> von CP1B gaben Hinweise auf eine besonders starke Abhängigkeit des Hemmwerts der verschiedenen Derivate von zwei Bereichen, die jeweils in der Nähe des Amino-, beziehungsweise des Carboxy-Terminus liegen. Da sich die Hemmwirkung von CP1B möglicherweise auf einen synergetischen Effekt zweier solcher getrennter „hot spots“

an beiden Enden des Peptids erklären ließe, wurden im Rahmen der vorliegenden Experimente zwei Peptide Ac-DPMSSTYIEELGK-NH<sub>2</sub> und Ac-REVTIPPKYRELLA-NH<sub>2</sub> synthetisiert, die jeweils die C- und N-terminale Hälfte von CP1B darstellen. In den kinetischen Studien zeigte sich, dass weder der N-, noch der C-terminale Teil für sich alleine genommen eine adäquate Hemmung von Calpain bewirken. Die in Tabelle 11 aufgeführten Daten zeigen, dass die Affinität in beiden Fällen mehrere Zehnerpotenzen niedriger als die des ganzen Peptids ist. Die N-terminale Hälfte zeigt hierbei mit einem  $K_i$ -Wert von 6,9  $\mu$ M immer noch eine fast fünffach bessere Hemmung, als der C-Terminus, der einen  $K_i$ -Wert von 35  $\mu$ M besitzt. Über eine Bevorzugung des N-terminalen Teils gegenüber dem C-Terminus an dieser Stelle zu spekulieren erscheint in Anbetracht dieser hohen Hemmwerte jedoch unzulässig. Beide Peptide sind nicht selektiv für  $\mu$ -Calpain, die für Cathepsin L gemessenen Werte liegen jeweils sogar etwas unterhalb der für  $\mu$ -Calpain bestimmten. Zur Überprüfung der gefundenen Werte wurde ebenfalls eine 1:1-Mischung der beiden Hälften vermessen. Der gefundene Hemmwert liegt bei grober Näherung im Mittel zwischen den einzelnen Peptiden. Ein etwaiger allosterischer oder sonstiger kooperativer Effekt ist nicht zu beobachten. Die Multiplikation der Hemmwerte beider Hälften ergibt einen Wert von 0,24 nM. Dieser Wert ist in exzellenter Übereinstimmung mit dem für CP1B gemessenen  $K_i$ -Wert von 0,2 nM. Daher ist naheliegend, dass in CP1B zwei voneinander unabhängige Zentren für eine bivalente Inhibition von Calpain durch das Peptid verantwortlich sind. In einem späteren Folgeversuch wurden die beiden Hälften über  $\omega$ -Aminohexansäure kovalent miteinander verknüpft, um so ein mögliches Indiz für eine Bivalenz von CP1B zu finden. Dieses Derivat (siehe Tabelle 11) wies jedoch mit einem  $K_i$ -Wert von 125  $\mu$ M einen vollkommenen Verlust der Hemmwirkung auf. Dieser starke Effekt ist sicherlich zum Teil auf die Verwendung des Linkers zurückzuführen, der im Vergleich zum ersetzten Tripeptid um gleich zwei CH<sub>2</sub>-Einheiten kürzer ist (siehe Abbildung 31). Die resultierende Verschiebung des Peptidrückgrats führt zur inkorrekten Platzierung der Aminosäuren. Folglich wurden in einem weiteren Derivat die Hälften mit einer  $\omega$ -PEG-Aminosäure verknüpft, welche annähernd die Länge eines Tripeptids widerspiegelt (siehe Abbildung 31). Im Peptid

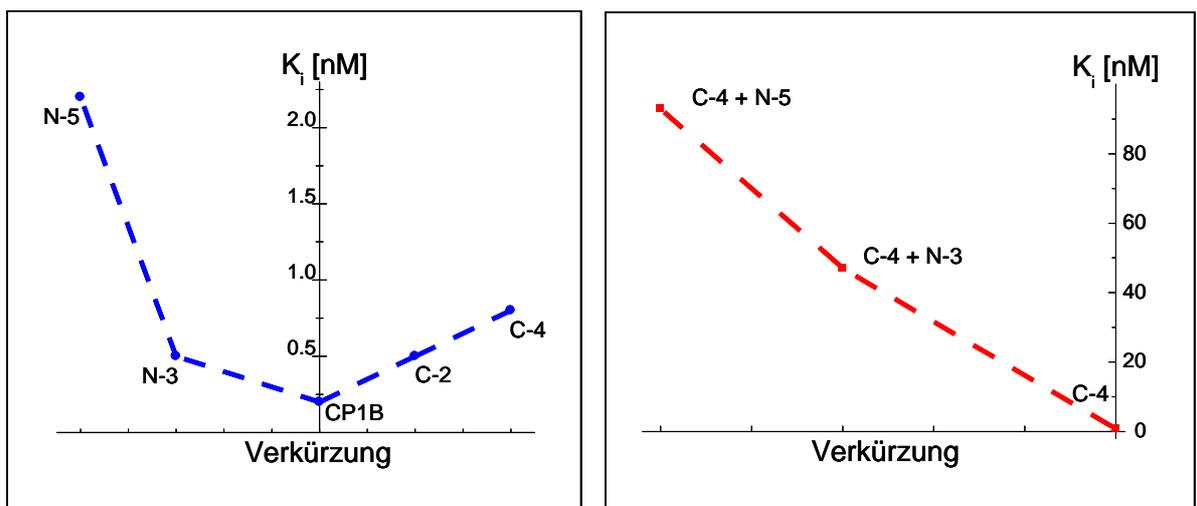
Ac-SSTYIEELGK(Doo)TIPPKYR-NH<sub>2</sub> wurden, ebenso wie im ω-Aminohexansäure-Derivat, die zentralen Aminosäuren Arg<sup>14</sup>, Glu<sup>15</sup> und Val<sup>16</sup> durch 3,6-Dioxa-8-Aminooctansäure ersetzt. Die Seitenketten dieser Aminosäuren zeigten im β-Alanin-Scan<sup>[220]</sup> keinen starken Einfluss auf das Inhibitionspotential. Dennoch wies das Produkt in der kinetischen Untersuchung, ebenso wie zuvor das Aminohexansäure-Derivat, ein dramatisch gesunkenes inhibitorisches Potential auf. Dies könnte zum einen auf die mangelnde Interaktion des ersetzten Peptidrückgrats mit der Oberfläche von Calpain zurückzuführen sein, was jedoch unwahrscheinlich ist, da hier nur eine geringe Anzahl von Wasserstoffbrücken gebildet werden könnte. Im Rahmen der Ergebnisse der NMR-Untersuchung von Isihma et al.<sup>[214]</sup>, und im Licht der im nächsten Abschnitt aufgeführten Erkenntnisse aus den Zyklisierungs-Experimenten scheint hingegen die Schlussfolgerung naheliegend, dass durch den Austausch an dieser Stelle die Flexibilität des Peptids eingeschränkt wurde. Dadurch könnte sicherlich die Interaktion der beiden β-Schleifen, die entscheidende Elemente der Wechselwirkung mit der Protease darstellen, gestört werden (siehe Abschnitt 3.2.2.2).



**Abbildung 31: Vergleich zwischen Tripeptid, 6-Aminohexansäure und 3,6-Dioxa-8-Aminooctansäure.**

Um die Beteiligung der C- und N-terminalen Aminosäuren aufzuklären, wurde die Sequenz von den Termini her beschnitten, um die minimale Länge des Peptides zum Erhalt des inhibitorischen Potentials bestimmen zu können. Die Peptide zeigten sowohl bei C-, als auch N-terminaler Verkürzung einen Rückgang der Affinität in Bezug auf Calpain (siehe Tabelle 11), jedoch konnten einige Aminosäuren entfernt werden, ohne dass ein dramatischer Verlust in Kauf genommen werden musste. Die N-terminale Verkürzung um drei Aminosäuren erhöhte den  $K_i$ -Wert von 0,2 nM auf 0,5 nM, bei weiterer Verkürzung um zwei Aminosäuren stieg der  $K_i$ -Wert auf 2,2 nM.

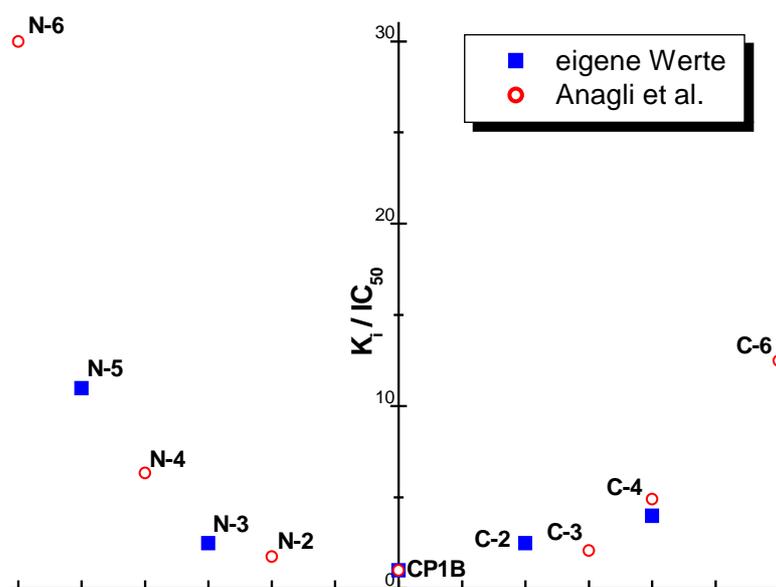
Somit war trotz des Fehlens von fünf Aminosäuren nur eine Verminderung der Hemmwirkung um einen Faktor zehn zu beobachten. Im Fall C-terminaler Verkürzung um zwei, beziehungsweise vier Aminosäuren wurden  $K_i$ -Werte von 0,5 nM, beziehungsweise 0,8 nM erhalten, was in ähnlicher Größenordnung wie die für den N-Terminus ermittelten Werte ist. Dieser Effekt ist in guter Übereinstimmung mit der geringen Änderung der Hemmwirkung, die auch im  $\beta$ -Alanin-Scan<sup>[214]</sup> zu beobachten war. Es zeichnet sich hier bereits ab, dass eine N-terminale Verkürzung einen etwas stärkeren Einfluss auf die Hemmwirkung des Peptids hat. (siehe Abbildung 32, linke Grafik) Alle bisher beschriebenen verkürzten Peptide behalten die ausgezeichnete Selektivität gegenüber Cathepsin L, mit Verhältnissen von jeweils über 1 : 10000. Zudem ist bemerkenswert, dass keine der Verkürzungen einen sprunghaften Anstieg des  $K_i$ -Werts des entsprechenden Derivats im Vergleich zum jeweiligen Vorläufer zur Folge hat.



**Abbildung 32: Graphische Darstellung der Hemmwerte verkürzter CP1B-Peptide.** Links (blaue Kreise) sind jeweils N- oder C-terminal verkürzte Analoga aufgetragen, CP1B ist zum Vergleich auf der Y-Achse aufgetragen. Rechts (rote Quadrate) sind Peptide, die N- und C-terminal verkürzt wurden aufgetragen, das C-terminal um vier Aminosäuren verkürzte Derivat ist zum Vergleich auf der Y-Achse aufgetragen. Die Verkürzung (N-X für N-terminal, beziehungsweise C-X für C-terminal) ist jeweils bei den Werten angegeben.

Bei Beschneidung beider Enden war ein stärkerer Anstieg der Inhibitionskonstanten zu beobachten (siehe Abbildung 32, rechte Grafik). Bei C-terminaler Verkürzung um je vier Aminosäuren wurden die N-terminalen Enden zusätzlich um drei, beziehungsweise fünf Aminosäuren beschnitten. Es ergaben sich noch immer relativ geringe Steigerungen der  $K_i$ -Werte auf Werte von 47 nM, beziehungsweise 93 nM,

wobei die Selektivität jedoch deutlich auf ein Verhältnis von 1 : 300, beziehungsweise 1 : 200 sank. Ein N-terminal um drei und C-terminal um sechs Aminosäuren verkürztes Peptid besaß im Gegensatz dazu eine drastisch verminderte Inhibitionswirkung. Der  $K_i$ -Wert dieser Verbindung von 17  $\mu\text{M}$  bedeutet gegenüber dem -3N/-4C-Derivat einen Anstieg um mehr als das 300-fache, bei einer Selektivität gegenüber Cathepsin L von nur etwa 1 : 7. Vermutlich wird hier bereits die Struktur der zweiten Schleife Pro<sup>20</sup>-Lys<sup>21</sup>-Tyr<sup>22</sup>-Arg<sup>23</sup> gestört (siehe Abschnitt 3.2.2.2).



**Abbildung 33: Vergleich der Hemmwerte verkürzter CP1B-Peptide mit Peptiden aus einer Arbeit von Anagli und Mitarbeitern<sup>[219]</sup>. Peptide aus dieser Arbeit sind mit blauen Quadraten gekennzeichnet, solche aus der Arbeit von Anagli mit roten Kreisen. Die Verkürzung (N- oder C-terminal) ist jeweils bei den Werten angegeben. Die Hemmwerte ( $K_i$  aus dieser Arbeit, beziehungsweise  $IC_{50}$  von Anagli und Mitarbeitern) wurden normiert, um einen direkten Vergleich zu ermöglichen.**

Abbildung 33 zeigt eine Gegenüberstellung der hier vorgestellten Messwerte mit den in einer unabhängigen Studie von Anagli und Mitarbeitern<sup>[219]</sup> gewonnenen Daten. Bei letzteren handelte es sich jedoch um  $IC_{50}$ -Werte, im Gegensatz zu den im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Inhibitionskonstanten. Um dennoch eine Gegenüberstellung zu ermöglichen, wurden alle Messwerte normiert, wobei der jeweilige Wert für CP1B willkürlich auf 1 gesetzt wurde. Im Rahmen der Messgenauigkeit kann eine exzellente Übereinstimmung der beobachteten Trends festgestellt werden. Dieser Vergleich verdeutlicht zudem den bereits vorher vermuteten stärkeren Einfluss der N-terminalen Aminosäuren des Peptids auf die Hemmwirkung von CP1B. Die Steigung der

angedeuteten Kurve ist im N-terminalen Teil des Grafen wesentlich stärker, was einem jeweils größeren Verlust an Affinität zu  $\mu$ -Calpain entspricht. In einer Studie von Uemori et al. zur Findung einer inhibitorischen Sequenz in Calpastatin wurden ebenfalls verkürzte CP1B-Peptide vorgestellt<sup>[213]</sup>. Zwar wurden die Hemmkinetiken graphisch dargestellt, jedoch wurden keine konkreten Zahlenwerte veröffentlicht. Die Peptide zeigten bei einer N-terminalen Verkürzung um fünf Aminosäuren und einer C-terminalen Verkürzung um eine bis vier Aminosäuren einen deutlichen, aber graduellen Verlust der Hemmwirkung durch CP1B-Peptide. Ein krasser Sprung war erst bei weiterer Verkürzung an einem der Enden zu beobachten. Die ungefähre Abschätzung des  $IC_{50}$ -Werts eines N-terminal um fünf und C-terminal um eine Aminosäure verkürzten Peptids ergibt einen Wert von etwa 60 nM. Dies steht in recht guter Übereinstimmung mit den von der Gruppe Anagli gemessenen  $IC_{50}$ -Werten<sup>[219]</sup> für ähnliche Peptide und somit auch mit den im Rahmen dieser Arbeit gemessenen  $K_i$ -Werten (vergleiche Abbildung 33).

Zusammenfassend wurde somit die Struktur auf ihren essentiellen Teil heruntergebrochen, und eine neue Leitstruktur erhalten. Trotz der etwas verminderten Selektivität wurde für die weiteren Experimente das 20-mer Ac-SSTYIEELGKREVTIPPKYR-NH<sub>2</sub> zugrunde gelegt, da der Wegfall der Aminosäure Methionin Synthese und Abspaltung, so wie Handhabung und Lagerung des Peptids vereinfachte. Zudem weist ein Verhältnis von mehr als 1 : 300  $\mu$ -Calpain/Cathepsin L immer noch sehr gute Selektivität für das Peptid aus. Seine Hemmwirkung gegenüber  $\mu$ -Calpain liegt immer noch im niedrigen submikromolaren Bereich. Die C- und N-terminalen Aminosäuren spielen nach den hier ermittelten Daten zu urteilen eine eher untergeordnete Rolle und konnten teilweise sogar ohne größeren Einfluss auf die Inhibitionskraft entfernt werden, was mit den Ergebnissen von Anagli und Mitarbeitern übereinstimmt<sup>[219]</sup>. Vielmehr scheinen die betroffenen Aminosäuren an unspezifischen Wechselwirkungen des Peptids mit der Oberfläche des Proteins beteiligt zu sein.

### 3.2.2.2 Zyklische homodetische CP1B-Peptide

Viele der sogenannten intrinsisch unstrukturierten Proteine (IUPs), zu denen auch Calpastatin gezählt werden muss<sup>[348]</sup>, zeigen sehr wohl Sekundärstrukturelemente, wenn diese auch schwierig zuzuordnen und teilweise zeitlichen Fluktuationen unterworfen sind<sup>[349]</sup>. IUPs dienen meist als Inhibitoren oder Modulatoren der Aktivität anderer Proteine. In dieser Funktion ist ihnen ihre geringe Strukturierung, die einem denaturierten Zustand gleich kommt, von Vorteil, da so eine rasche und flexible Bindung an das Zielprotein ermöglicht wird. Besonders exponierte Stellen in IUPs, die sogenannten *primary contact sites* (PCS), spielen eine Schlüsselrolle bei der Wechselwirkung mit dem jeweiligen Zielprotein. Sie dienen einerseits der molekularen Erkennung und initiieren andererseits die Faltung des IUP<sup>[350]</sup>. Oftmals besitzen solche Stellen einen kurzen strukturierten Abschnitt, der die spezifische Erkennung des Zielproteins überhaupt erst ermöglicht. Tompa und Mitarbeiter identifizierten in Untereinheit B der inhibitorischen Domäne von Calpastatin mittels CD- und NMR-Spektroskopie, wie zu erwarten, mindestens eine solche primäre Kontaktstelle<sup>[348]</sup>. Maki und Mitarbeiter zeigten bereits auf Grundlage von NMR-Experimenten, dass im CP1B-Molekül die Peptidbindungen Ile<sup>18</sup>-Pro<sup>19</sup> und Pro<sup>19</sup>-Pro<sup>20</sup> in *trans*-Stellung vorliegen. Im Bereich von Pro<sup>20</sup>-Lys<sup>21</sup>-Tyr<sup>22</sup>-Arg<sup>23</sup> ermittelten sie eine Typ-I  $\beta$ -Schleife, und fanden Indizien für die Anwesenheit einer weiteren Typ-II  $\beta$ -Schleife<sup>[214]</sup> im Bereich der Aminosäuren Glu<sup>10</sup>-Leu<sup>11</sup>-Gly<sup>12</sup>-Lys<sup>13</sup>. Zusammengenommen mit der von der Gruppe um Anagli gemachten Beobachtung, dass Leu<sup>11</sup> und Ile<sup>18</sup> am stärksten an der Bindung zu Calpain beteiligt sind<sup>[219]</sup>, kommen beide Regionen mit großer Wahrscheinlichkeit als PCS in Betracht. Mit dem folgenden Experiment sollte überprüft werden, ob das in Lösung lineare, größtenteils unstrukturierte CP1B bei der Bindung an  $\mu$ -Calpain Sekundärstrukturmerkmale im Bereich der Sequenz Glu<sup>10</sup>-Leu<sup>11</sup>-Gly<sup>12</sup>-Lys<sup>13</sup> aufweist.

Die Aminosäuren der Position 10 und 13 wurden über ihre Seitenketten verknüpft, so dass homodetische zyklische Peptide erhalten wurden.

**Tabelle 12: Inhibitionskonstanten zyklischer CP1B-Peptide für  $\mu$ -Calpain.**

Peptid	Sequenz	$K_i$ [nM]
JMP065	Ac-SSTYIEELGKREVTIPPKYR-NH <sub>2</sub>	47
JMP106	Ac-SSTYIEELGKREVTIPPKYR-NH <sub>2</sub>	36
JMP107	Ac-SSTYIEELG(Orn)REVTIPPKYR-NH <sub>2</sub>	39
JMP108	Ac-SSTYIEELG(Dab)REVTIPPKYR-NH <sub>2</sub>	27
JMP111	Ac-SSTYIEDLG(Dab)REVTIPPKYR-NH <sub>2</sub>	1400

(Orn) steht für Ornithin, (Dab) für 2,4-Diaminobuttersäure. Der Ring wird also jeweils im Vergleich zum Vorgänger um eine CH<sub>2</sub>-Einheit verkürzt.

Die für die zyklischen Peptide (**JMP106-108, 111**) ermittelten Hemmwerte liefern tatsächlich Indizien für das Vorhandensein einer  $\beta$ -Schleife. Die kovalente Verknüpfung der Seitenketten von Glu<sup>10</sup> und Lys<sup>13</sup> über eine Peptidbindung zu einem 18-gliedrigen Ring hat einen relativ geringen Einfluss auf die Inhibitionskonstante. Das lineare Peptid besitzt in Bezug auf die Hemmung von Calpain einen  $K_i$ -Wert von 47 nM. Beim zyklischen homodetischen Derivat **JMP106** wird dieser Wert sogar auf 36 nM gesenkt, was einer Verbesserung um einen Faktor von 1,3 entspricht. Hieraus lässt sich mit einiger Sicherheit schließen, dass CP1B an dieser Stelle tatsächlich eine  $\beta$ -Schleife ausformt, wie von Isihma et al. postuliert<sup>[214]</sup>. Eine solche Schleife könnte durch die kovalente Verknüpfung zwischen den Positionen 10 und 13 konformationell eingefroren werden. In jedem Fall findet an dieser Stelle eine Umkehr der Orientierung des Peptidrückgrats statt. Auch der Austausch von Lysin durch Ornithin und Diaminobuttersäure, der eine Verengung des Rings um jeweils eine CH<sub>2</sub>-Einheit zur Folge hat, führt nicht zum Verlust der Inhibitionswirkung des Peptids. Sowohl das Ornithin-, als auch das Diaminobuttersäure-Derivat besitzen Bindungskonstanten, die vom Wildtyp-Lysin-Derivat nur unwesentlich abweichen. Tatsächlich verbessert der Übergang von Ornithin zu Diaminobuttersäure die Hemmwirkung von einem  $K_i$ -Wert von 39 nM sogar auf 27 nM, so dass der ursprüngliche Wert des linearen Peptids

sogar um einen Faktor 1,7 verbessert wird. Vermutlich ist in diesen zyklischen Derivaten, speziell in **JMP107** die bereits vorgegebene Ringgeometrie der nativen Konformation von gebundenem CP1B sehr ähnlich. Somit ist bei Bindung an Calpain die Seitenkette des für die Bindung unverzichtbaren Leu<sup>11</sup>[219] bereits korrekt ausgerichtet. Die Unterschiede der Ringgeometrie gegenüber einer Typ-II  $\beta$ -Schleife und somit hervorgerufene Abweichungen der Stellungen einzelner Aminosäure-Seitenketten werden vermutlich durch die Verminderung der Entropieänderung bei der Bindung ausgeglichen. Während das Wildtyp CP1B-Peptid erst in Anwesenheit der Protease Konformationsänderungen im Sinne eines *induced fit* durchlaufen muss, ist zumindest ein Teil dieser strukturellen Umwandlungen im zyklischen Derivat bereits vorgegeben. Der konformationelle Spielraum von Leu<sup>11</sup> wird zudem eingeschränkt, so dass der Entropieterm der Bindung dieses Strukturelements ebenfalls vermindert wird. Offensichtlich besitzt das Peptid auch nach seiner Bindung an die Oberfläche von  $\mu$ -Calpain noch eine gewisse konformationelle Flexibilität. So lässt sich zumindest erklären, dass eine Variation der Ringgröße zwischen einem 18- bis 16- gliedrigen Zyklus keine deutliche Änderung des  $K_i$ -Werts hervorruft (siehe Abbildung 34).

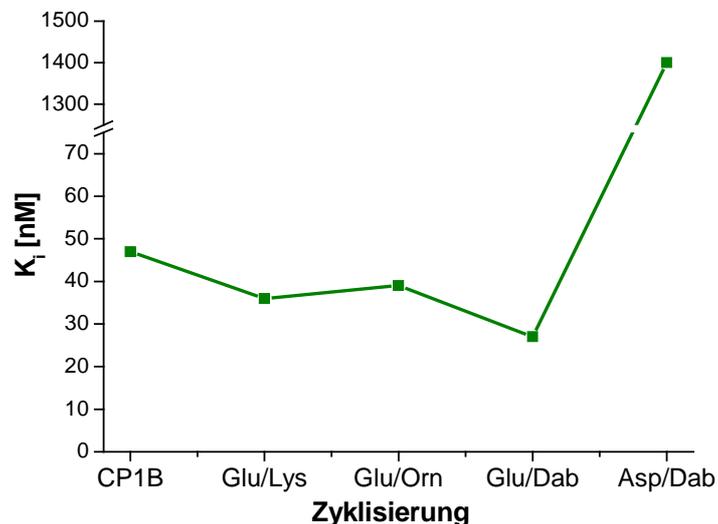
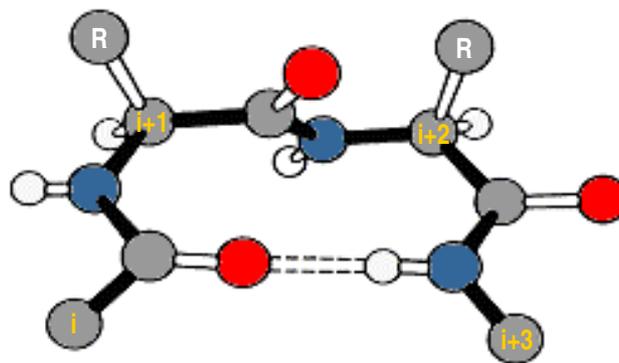


Abbildung 34: Grafische Darstellung der Hemmwerte zyklisierter CP1B-Peptide. Die Aminosäuren über die zyklisiert wurde, sind auf der X-Achse angegeben, von links nach rechts wird der Zyklus um je eine  $\text{CH}_2$ -Einheit verkürzt. Es ist zu beachten, dass die Y-Achse bei einem Wert von 75 unterbrochen ist.

Wird schließlich der Zyklus um eine weitere CH<sub>2</sub>-Einheit durch Austausch von Glu<sup>10</sup> gegen Asparaginsäure verengt, wie in **JMP111** (siehe Tabelle 12), so steigt der K<sub>i</sub>-Wert des Konstrukts im Vergleich zum linearen Peptid drastisch um etwa das Dreißigfache auf 1400 nM. Bereits im Verlauf der Synthese zeigte sich, dass dieser 15-gliedrige Zyklus deutlich gespannt sein muss, da die Kupplungszeiten der Zyklisierung gegenüber den anderen Derivaten um ein Vielfaches verlängert werden mussten. Zudem waren sowohl die Reinheit des Rohprodukts wie auch die Ausbeute deutlich vermindert, was ebenfalls als ein Anzeichen für Spannungen innerhalb des Rings gedeutet werden kann. Es ist anzunehmen, dass aufgrund solcher Spannungen die gesamte Geometrie des Rings verändert wird. Somit wird auch die Seitenkette von Leu<sup>11</sup> aus ihrer ursprünglichen räumlichen Lage heraus bewegt und steht nicht mehr für die Bindung an die vermutete Tasche auf der Oberfläche von Calpain zur Verfügung. In Position i+2 (siehe Abbildung 35) der Schleife Glu<sup>10</sup>-Leu<sup>11</sup>-Gly<sup>12</sup>-Lys<sup>13</sup> befindet sich die Aminosäure Glycin. Diese Aminosäure ist auch in Typ-II β-Schleifen anderer Proteine überdurchschnittlich häufig an dieser Stelle vorzufinden<sup>[351]</sup>, was ein zusätzlicher Anhaltspunkt für die Richtigkeit der Vermutung ist. Überraschenderweise spielen die beiden Aminosäurereste Lys<sup>21</sup> und Tyr<sup>22</sup>, welche in der zweiten vermuteten β-Schleife die Positionen i+1 und i+2 belegen, keine wesentliche Rolle bei der Bindung an Calpain<sup>[219]</sup>, obwohl Aminosäuren in diesen Positionen oft an Interaktionen mit anderen Proteinen beteiligt sind.



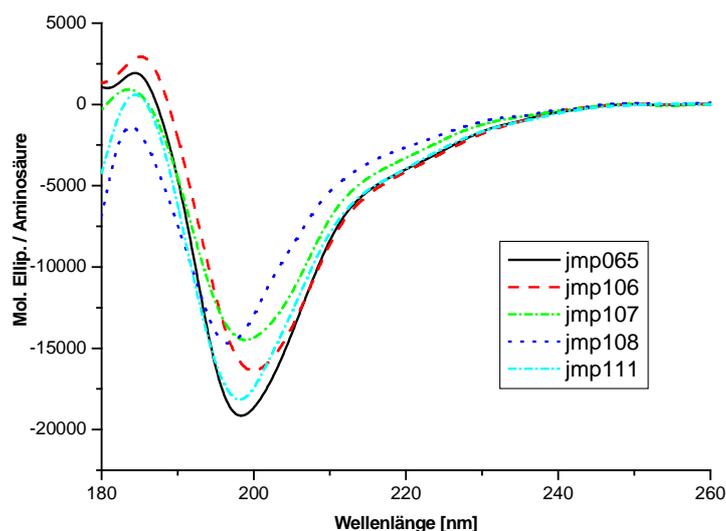
**Abbildung 35:** Schematische Darstellung der Typ-II β-Schleife. Die C<sub>α</sub>-Atome der Aminosäuren i bis i+3 sind entsprechend gekennzeichnet, die Seitenketten der Aminosäuren i+1 und i+2 sind angedeutet und jeweils mit R gekennzeichnet.

Venkatachalam postulierte 1968 zum ersten Mal die Struktur der  $\beta$ -Schleifen<sup>[352]</sup>. Demnach erfolgt die Fixierung dieses Sekundärstrukturelements über eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Carbonylfunktion der Aminosäure in Position  $i$  und der Aminogruppe in Position  $i+3$ . Zwischenzeitlich wurde von Lewis et al.<sup>[353]</sup> die Definition erweitert und die Familie der  $\beta$ -Schleifen um eine Reihe von Mitgliedern erweitert, von denen einige keine solche Wasserstoffbrücke aufweisen. Hutchinson und Thornton<sup>[354]</sup> klassifizierten diese Strukturelemente erneut und beschrieben die zur Zeit allgemein akzeptierten neun Familien (siehe Tabelle 13). Die am häufigsten anzutreffenden Vertreter sind die des Typs I und II.

**Tabelle 13: Familien der  $\beta$ -Schleifen**

Typ	Diederwinkel (°)			
	$\phi_{i+1}$	$\Psi_{i+1}$	$\phi_{i+2}$	$\Psi_{i+2}$
I	-60	-30	-90	0
I'	60	30	90	0
II	-60	120	80	0
II'	60	-120	-80	0
IV	-61	10	-53	17
VIa1	-60	120	-90	0
VIa2	-120	120	-60	0
VIb	-135	135	-75	160
VIII	-60	-30	-120	120

Limitierte Proteolyse der Domäne 1 von Calpastatin mit Chymotrypsin und Trypsin<sup>[348]</sup> zeigt bevorzugte Spaltstellen zwischen Tyr<sup>7</sup>-Ile<sup>8</sup> und Arg<sup>14</sup>-Glu<sup>15</sup> auf (CP1B-Nummerierung, siehe Abbildung 37). Dadurch werden diese Stellungen als besonders exponiert ausgewiesen, zumal beide nicht die ideale Erkennungssequenz für Chymotrypsin beziehungsweise Trypsin tragen. Da sie die Schleife Glu<sup>10</sup>-Leu<sup>11</sup>-Gly<sup>12</sup>-Lys<sup>13</sup> direkt flankieren, tritt dieses Strukturelement als primäre Interaktionsstelle bei der Inhibierung von Calpain durch Calpastatin hervor. Denkbar ist beispielsweise die eine Umkehr der Orientierung des Peptidrückgrats, wodurch die Enden des Peptids in räumlicher Nähe zu liegen kommen. Mittels NMR und CD konnten keine weiteren Kontakte innerhalb der zyklischen Peptide, zumindest in Lösung, nachgewiesen werden.



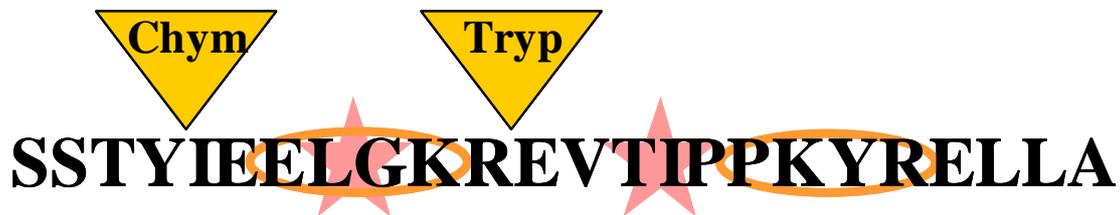
**Abbildung 36: CD-Spektren der zyklischen Peptide JMP106, 107, 108 und 111. Zum Vergleich ist das Spektrum der linearen Verbindung JMP065 ebenfalls gezeigt.**

Die Auswertung der CD-Spektren mit dem Programm CDNN ergab einen  $\beta$ -Schleifen Anteil der Peptide von jeweils etwa 30%, mit Ausnahme des Derivats JMP 108, welches nach dieser Auswertung einen Anteil von etwa 25% besitzt. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die in diesem Programm verwendete Datenbank komplette Proteine zur Abschätzung der Sekundärstruktur zugrundelegt. Daher ist der Fehler eines hieraus für ein kurzes Peptid gewonnenen Ergebnisses mit kritischer Distanz zu betrachten. Zumindest kann ein relativ hoher  $\beta$ -Schleifen Anteil angenommen werden.

Der Ersatz von Leu<sup>11</sup> aus CP1B durch Alanin resultiert nach einer Veröffentlichung von Anagli und Mitarbeitern in einer 3,4-fachen Steigerung des IC<sub>50</sub>-Werts im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz<sup>[220]</sup>. Bei Ersatz der Aminosäure durch  $\beta$ -Alanin steigt der Wert sogar um das 30-fache. Der selbe Trend kann beim Austausch von Ile<sup>18</sup> beobachtet werden. Durch den Einbau von  $\beta$ -Alanin könnte in diesen Fällen die Platzierung der benachbarten Seitenketten gestört werden. Somit wäre der Effekt nicht allein auf den Einfluss der Seitenkette von Leu<sup>11</sup> oder Ile<sup>18</sup> zurückzuführen. Vielmehr ist zudem eine Störung der Sekundärstruktur durch die erhöhte Flexibilität der  $\beta$ -Aminosäure zu vermuten. Mit beiden Varianten ließe sich zumindest der große Unterschied zwischen Alanin und  $\beta$ -Alanin erklären, zumal die absolute Länge des Peptids keine entscheidende Rolle zu spielen scheint, wie der Austausch anderer Aminosäuren durch Alanin oder  $\beta$ -Alanin<sup>[220]</sup> nahe legt.

Trotzdem wurde gezeigt, dass Leu<sup>11</sup> und Ile<sup>18</sup> die beiden Aminosäuren sind, die den größten Beitrag zur Aktivität des Peptids einbringen. Beide liegen im Bereich der vermuteten  $\beta$ -Schleifen, beziehungsweise unmittelbar davor und sind daher Teil zweier für die Inhibition durch das Peptid entscheidender Zentren. Eine genauere Untersuchung der Positionen 11 und 18 ergab, dass kein Austausch von Leu<sup>11</sup> vorgenommen werden kann, ohne die Hemmwirkung des Peptids deutlich zu verringern<sup>[219]</sup>. Saure und basische Aminosäuren an Position 11 führen zu einer dramatischen Steigerung der gefundenen  $K_i$ -Werte, aber auch andere aliphatische Aminosäuren, und sogar  $\beta$ -Homoleucin und D-Leucin bedingen in dieser Position eine erhebliche Verminderung des inhibitorischen Potentials von CP1B. In Position 18 werden dagegen an Stelle von Isoleucin auch andere Aminosäuren mit mindestens zwei Methyleneinheiten und sogar die basische Aminosäure Lysin toleriert. Beide Seitenketten scheinen mit größtenteils hydrophoben Taschen des Enzyms in Wechselwirkung zu treten, deren Größe durch weitere Experimente mit genau eingepassten Aminosäure-Seitenketten vermessen werden könnte. Leider waren die vorgestellten Experimente unvollständig und nicht systematisch, so dass die erhaltenen Informationen nur ein ungenaues Bild der Oberflächenstruktur dieses entscheidenden Bereichs von Calpain ergeben. Dennoch lieferte die Studie interessante Einblicke in die Struktur-Wirkungs-Beziehung zwischen Calpain und Calpastatin. Auch Veränderungen des Peptidrückgrats an in unmittelbarer Nachbarschaft liegenden Aminosäuren riefen einen weitgehenden Verlust des inhibitorischen Potentials von CP1B hervor. Vergleicht man die Sequenzen der B-Untereinheiten 1 bis 4 untereinander und zwischen verschiedenen Spezies, zeigt sich wie erwartet ein hohes Maß an Konservierung im Bereich der in Abbildung 37 angedeuteten Zentren und geringe Homologie an den Termini der Peptide. Bereits in den Anfängen der Forschungstätigkeit im Bereich der Calpaine wurde zunächst in der DNS-Sequenz von Calpastatin die hoch konservierte Sequenz GKREVTIPPKYR identifiziert<sup>[199, 202, 215]</sup>. Diese wurde als Subdomäne B bezeichnet und die Hemmwirkung von Calpastatin auf sie zurückgeführt. Wird die Sequenz aus Domäne I von Calpastatin entfernt, so verliert das verbleibende Polypeptid sein inhibitorisches Potential. Das aus zwölf Aminosäuren bestehende Peptid selbst besitzt jedoch

ebenfalls keine Hemmwirkung. Im Zusammenhang mit den hier vorgestellten Ergebnissen erscheint diese Tatsache offensichtlich, da durch die Wahl der N-terminalen Verkürzung die Schleife Glu<sup>10</sup>-Leu<sup>11</sup>-Gly<sup>12</sup>-Lys<sup>13</sup> zerstört wird. Somit fehlt beiden verbleibenden Peptiden dieses essentielle Strukturelement.



**Abbildung 37: Schematische Darstellung der Zentren besonderer Aktivität von CP1B.  $\beta$ -Schleifen sind mit orangefarbenen Ringen hinterlegt, wichtige Aminosäuren mit roten Sternen, *Chym* und *Tryp* bezeichnen Spaltstellen der Enzyme Chymotrypsin und Trypsin.**

Der Sequenzvergleich der Domänen von Calpastatin (siehe Tabelle 14) zeigt, dass in Domäne I, III und IV die Subdomäne B in allen Spezies jeweils eine Sequenz ELGK besitzt, beziehungsweise KLGE, in der Leucin und Glycin in einer ähnlichen Schleife, wie der hier für die humane Domäne I gefundenen, eingebunden sind. Nur die Domäne I aus Mäusen, sowie Domäne IV aus *Xenopus sp.* bilden hier Ausnahmen, wobei in *Xenopus sp.* der Austausch von Glutaminsäure zu Asparaginsäure sehr konservativ ist. Es ist zu erwarten, dass ein solcher Austausch keinen Verlust der Aktivität zur Folge hat. In Domäne II steht an der selben Stelle die Sequenz ECGK, in der Leucin durch Cystein ersetzt ist. Tatsächlich nimmt die Hemmung von Calpain durch die Peptide, welche die Subdomänen B enthalten, in der Reihenfolge I > IV > III >> II ab<sup>[202]</sup>. Die IC<sub>50</sub>-Werte liegen im Bereich von 0,016  $\mu$ M für Domäne I, 0,12-0,32  $\mu$ M (m- und  $\mu$ -Calpain) für Domäne II bis 8,5  $\mu$ M (m-Calpain) für Domäne III. Das entsprechende Peptid aus Domäne II hemmt  $\mu$ -Calpain nicht. Dieser Umstand ist vermutlich zum Teil auf den Einfluss der veränderten  $\beta$ -Schleife dieser Subdomäne zurückzuführen, was auch in Übereinstimmung mit der von Anagli und Mitarbeitern ermittelten Bedeutung des Leucinrests<sup>[219]</sup> ist.

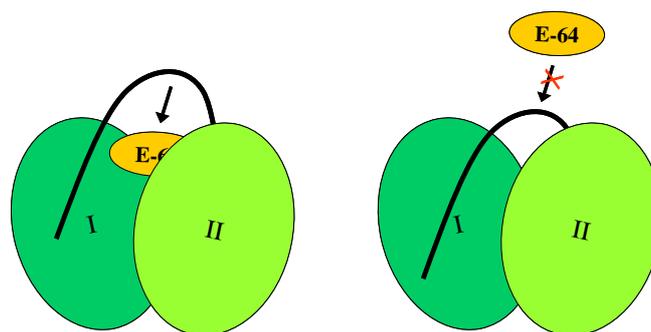
**Tabelle 14: Sequenzvergleich der Unterdomänen B der Domänen I bis IV von Calpastatin aus verschiedenen Spezies. Die in dieser Arbeit untersuchte Schleife ist jeweils fettgedruckt.**

Domäne	Spezies	Sequenz
I	Mensch	<b>ELGK</b> REVTIPPKYR
	Maus	A..IK.G....E..
	Rind	.....S.L....K
	Schwein	.....L.....
	Hase	.....
	Xenopus	....DH....N..
II	Mensch	<b>KCGE</b> DEDTIPSEYR
	Maus	.....V.A...
	Rind	.....V.....
	Schwein	.....V.P...
	Hase	.....V.A...
	Xenopus	EL.KR.H...P...
III	Mensch	<b>EKLGE</b> KEETIPPDYR
	Maus	.....V.....
	Rind	.....
	Schwein	.....
	Hase	.....
	Xenopus	....D.R....R.
IV	Mensch	<b>DKLGE</b> RDDTIPPEYR
	Maus	E.....
	Rind	.....K.Q
	Schwein	.....
	Hase	.....
	Xenopus	....D.....

Anagli und Mitarbeiter postulierten, dass die konzertierte Bindung beider Zentren, Leu<sup>11</sup>-Gly<sup>12</sup> und Thr<sup>17</sup>-Ile<sup>18</sup>-Pro<sup>19</sup>, an Calpain vonnöten ist um eine vollständige Inhibierung der Protease zu erreichen<sup>[219]</sup>. Die hier dargestellte Tatsache, dass keine der beiden Hälften von CP1B allein zur Inhibierung von Calpain in der Lage ist, erhärtet diese These zusätzlich. Es ist verlockend, an dieser Stelle zu spekulieren, dass Leu<sup>11</sup> in der S2-Tasche von Calpain zu liegen kommt und der weitere Teil der Sequenz im ungestrichenen Teil der Protease bindet. Eine Studie von Tompa et al. belegt, dass natürliche Calpain-Substratproteine mit signifikanter Häufung Aminosäuren der Sequenz TIPPEYR im ungestrichenen Bereich tragen<sup>[121]</sup>. Die Bindung von CP1B an Calpain erfolgt nur in Gegenwart von Ca<sup>2+</sup><sup>[207, 215]</sup>. Vermutlich werden die zur Bindung von Leu<sup>11</sup> und Ile<sup>18</sup> benötigten hydrophoben Taschen erst zugänglich, wenn der katalytische Spalt korrekt ausgebildet ist<sup>[218, 219]</sup>.

Es wurde berichtet, Calpastatin sei in der Lage, auch an durch irreversible Inhibitoren blockiertes Calpain zu binden<sup>[110, 202]</sup>. Dies wird oftmals als Indiz für eine Bindung des Proteins außerhalb des katalytischen Spalts angesehen. Tatsächlich wurde berichtet,

dass Calpastatin nicht mit E-64 um das katalytische Zentrum konkurriert<sup>[202]</sup>, jedoch Konkurrenz mit Casein zu beobachten sei<sup>[199, 220]</sup>. In den bisher veröffentlichten Studien zur Konkurrenz von Calpastatin und irreversiblen Inhibitoren wurde Calpain jeweils vorher mit dem Hemmstoff inkubiert. Ein umgekehrt angelegtes Experiment, in dem der Inhibitor zu einer Lösung von Calpain und Calpastatin zugegeben wird, ist bisher nicht literaturbekannt. Tatsächlich erfolgt die Bindung von Calpastatin an Calpain nach einer Blockierung des aktiven Zentrums durch E-64 oder Iodessigsäure jedoch wesentlich langsamer, und die Stärke der Bindung ist um etwa zwei Zehnerpotenzen verringert<sup>[340]</sup>. Daher kann eine gleichzeitige Bindung außerhalb *und* mit Bereichen innerhalb des aktiven Zentrums keinesfalls ausgeschlossen werden. Zudem legen die hohe Konservierung der Subdomänen A, B und C und der Länge der zwischen ihnen liegenden Regionen einen Zusammenhang mit der Geometrie der Bindung von Calpastatin an Calpain nahe. Die maximalen Distanzen der einzelnen Bindungszentren (A, B, C) voneinander betragen 105, beziehungsweise 83 Å, wenn man eine vollständig entfaltete Peptidkette zugrunde legt, in der deren Länge 7,23 Å / 2 Aminosäuren beträgt. Somit erscheint eine gleichzeitige Bindung an Domäne IV, VI und das katalytische Zentrum von Calpain möglich<sup>[105]</sup>. Ein möglicher Bindungsmodus wäre daher, dass Region B das aktive Zentrum von Calpain eher überspannt und es wie eine Art Knebel verschließt, wie in Abbildung 38 skizziert, als in direkte Wechselwirkung mit seiner Oberfläche zu treten.



**Abbildung 38: Hypothetisches Modell der Konkurrenz zwischen E-64 und Calpastatin um das katalytische Zentrum von Calpain. Der katalytische Spalt der Protease ist durch die Domänen I und II (grün) angedeutet, CP1B ist als schwarze Linie dargestellt.**

### 3.3 CP1B Photoaffinitäts-Peptide

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Professor Christian Sommerhoff, München, sollte die Lage des CP1B-Peptids bei Bindung an  $\mu$ -Calpain bestimmt werden. Im Folgenden werden die Synthese der hierzu angefertigten Peptide mit photoreaktiven Gruppen, sowie die Ergebnisse der Photoaffinitäts-Studien vorgestellt.

#### 3.3.1 Synthese von CP1B Photoaffinitäts-Sonden

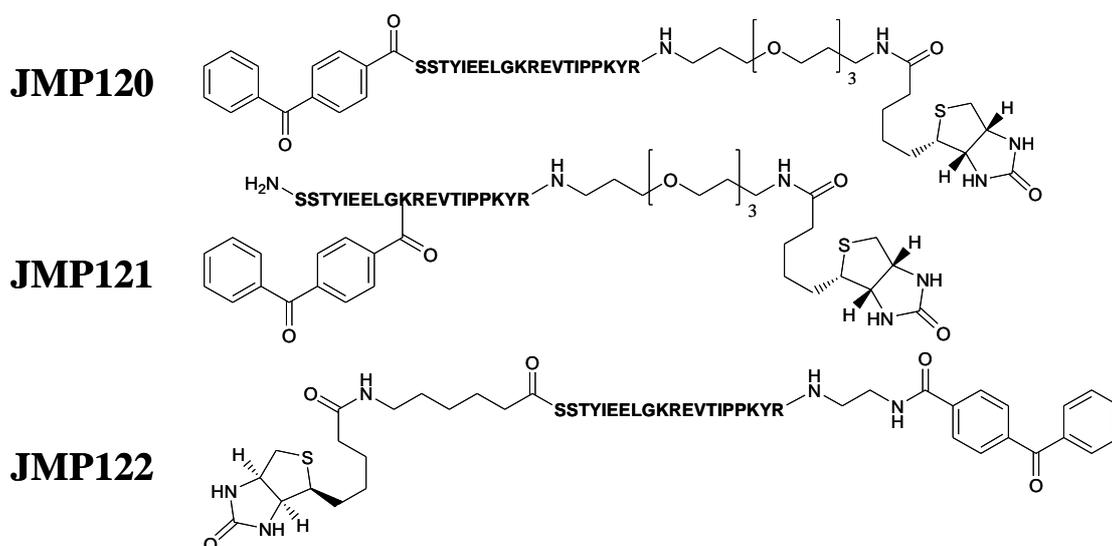


Abbildung 39: Photoaffinitäts-Peptide auf Grundlage des in Abschnitt 3.2.2.1 vorgestellten 20meren verkürzten CP1B-Peptids.

Für die Peptide mit N-terminaler (**JMP120**) und zentraler Benzophenon-Einheit (**JMP121**) wurden zum Einführen einer C-terminalen Biotinylgruppe jeweils 0,1 mmol Biotin-PEG NovaTag™ Harz der Firma Nova Biochem eingesetzt. Die Kupplungen erfolgten jeweils mit zehnfachem Überschuss der Fmoc-Aminosäuren. Die Beladung mit der ersten Aminosäure Arginin erfolgte jeweils von Hand in einer Einzelspritze, unter Verwendung von HATU als Kupplungsreagenz. Die folgenden Aminosäuren wurden am automatisierten Batch-Synthesizer angefügt. Die N-terminalen Aminosäuren SSTYIE... wurden jeweils mit Doppelkupplungen eingeführt, da sich so die Qualität des Rohprodukts erheblich steigern ließ. Im Falle des Peptids **JMP120** mit N-terminaler Benzophenon-Einheit wurde abschließend 4-Benzoyl-benzoesäure mit HOBt und HBTU gekuppelt. Für das Peptid **JMP121**, bei dem die Benzophenon-Gruppe zentral liegt, wurde das zentrale Lys<sup>13</sup> als

Alloc-seitenkettengeschütztes Derivat eingeführt. So konnte nach Synthese und Acetylierung des Peptids die Alloc-Gruppe an fester Phase mit Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub><sup>[345]</sup> und Phenylsilan entfernt und anschließend 4-Benzoyl-benzoesäure gekuppelt werden. Im Falle des Derivats **JMP122** mit C-terminal gebundener Benzophenon-Einheit wurden 0,1 mmol Universal NovaTag™-Harz eingesetzt, welches zwei orthogonale Schutzgruppen, Mmt und Fmoc, besitzt. Hier musste zunächst die äußerst säurelabile Schutzgruppe Mmt mit HOBt entfernt werden, bevor die Kupplung mit 4-Benzoyl-benzoesäure unter Verwendung von HOBt und HBTU erfolgte. Nun konnte wie oben beschrieben mit der Beladung des Harzes und der Synthese des Peptids mit jeweils zehnfachem Überschuss der Fmoc-Aminosäuren fortgefahren werden, bevor abschließend die Biotingruppe angebracht wurde. Hierbei wurde N-(+)-Biotinyl-aminocaprinsäure unter Verwendung von HATU gekuppelt.

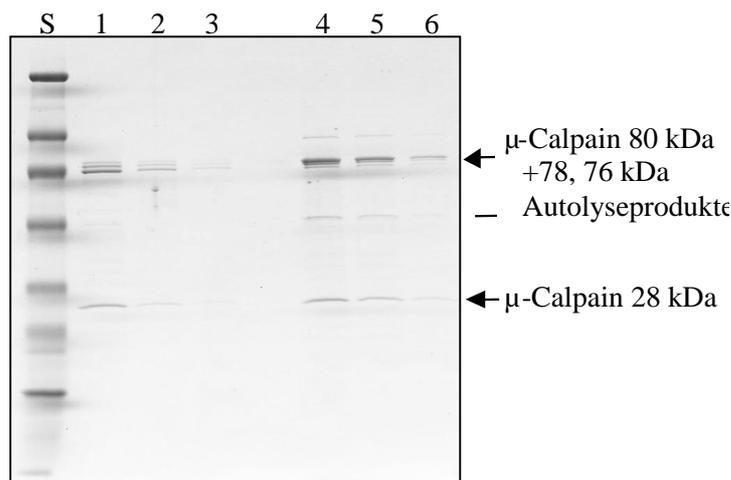
Eine weitere Änderung gegenüber den allgemeinen Synthesevorschriften ergab sich bei der Abspaltung. Die Verwendung des Abfangreagenzes TIPS führte hier aufgrund der Anwesenheit der Benzophenon-Gruppe zu Nebenreaktionen. Mittels Massenspektrometrie konnte nachgewiesen werden, dass es sich dabei um die Reduktion der benzoiden Carbonylfunktion zu einer benzylichen Methylengruppe handelte. Versuche, TIPS durch EDT zu ersetzen, führten ebenfalls zu Misserfolg. Die massenspektrometrische Analyse wies auf die Bildung eines Thioketals hin, wodurch ebenfalls ein erheblicher Anteil des Produkts verloren ging. Es zeigte sich jedoch, dass in Gegenwart sehr kleiner Mengen TIPS oder sogar in Abwesenheit anderer Abfangreagenzien als Wasser, keine nennenswerten Mengen unerwünschter Nebenprodukte auftraten (siehe Tabelle 15). Daher wurde schließlich bei der Abspaltung dieser Peptide gänzlich auf die Verwendung solcher Zusätze verzichtet.

**Tabelle 15: Effekte verschiedener Abspaltbedingungen für Peptide mit Photoaffinitäts-Marker**

Bedingungen	Ergebnis
TFA, Wasser, TIPS (95:2,5;2,5)	>50% Reduktion Benzoyl ⇒ Benzyl
TFA, Wasser, EDT (95:4;1)	>50% Benzoyl ⇒ Thioacetal
TFA, Wasser, TIPS (95:4,9;0,1)	HPLC-rein
TFA, Wasser (95:5)	HPLC-rein

### 3.3.2 Ausgangsmaterial

Das  $\mu$ -Calpain Ausgangsmaterial stammte von Frau Dr. Gabrijelcic-Geiger<sup>[126]</sup>. Wie in Abbildung 40 zu sehen ist, sind zusätzlich zur großen und kleinen Untereinheit durch Autolyse entstandene Fragmente zu erkennen. Im Weiteren wurde Charge 96 verwendet, da in anderen bereits extensive Autolyse erkennbar war. So ist in Charge 93 beispielsweise hauptsächlich die 76 kDa-Form der großen Untereinheit enthalten.



**Abbildung 40:** SDS-PAGE des  $\mu$ -Calpain Ausgangsmaterials. Spalten: **S)** Standard; **1-3)** Charge 93 Konzentration 2, 1, beziehungsweise 0,5  $\mu$ M; **4-6)** Charge 96 Konzentration 2, 1, beziehungsweise 0,5  $\mu$ M. Die Lage der 80 kDa-Bande von intaktem  $\mu$ -Calpain ist markiert.

### 3.3.3 Kinetische Messungen der CP1B Photoaffinitäts-Sonden

Die Hemmung von  $\mu$ -Calpain durch das CP1B-Peptid **JMP120** mit N-terminaler Benzophenon-Gruppe ist mit 2,9 nM deutlich besser als für das CP1B-20mer mit einem Wert von 47 nM. Dies ist auf unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen der Termini des Peptides mit der Protease zurückzuführen, sowie auf einen irreversiblen Anteil, der von durch die Messung aktiviertem Benzophenon herrührt. Die Hemmkinetik von **JMP122** mit C-terminaler Benzophenon-Gruppe wurde nicht ermittelt, da zu erwarten ist, dass in diesem Fall ähnliche Wechselwirkungen wie im Fall von **JMP120** vorhanden sind und somit ein ähnlicher  $K_i$ -Wert erreicht wird. Das Derivat mit zentraler Benzophenon-Gruppe, **JMP121** zeigt mit einem  $K_i$ -Wert von 80 nM eine deutlich schlechtere Hemmung von  $\mu$ -Calpain. Hier zeigt sich bereits die starke Repulsion zwischen dem Benzophenon und der Proteaseoberfläche, was in Anbetracht der großen Raumerfüllung dieser Gruppe nicht erstaunt.

### 3.3.4 CP1B-Photoaffinitäts-Experimente

#### 3.3.4.1 Verlauf der Photoreaktion von JMP120 und 121 mit $\mu$ -Calpain

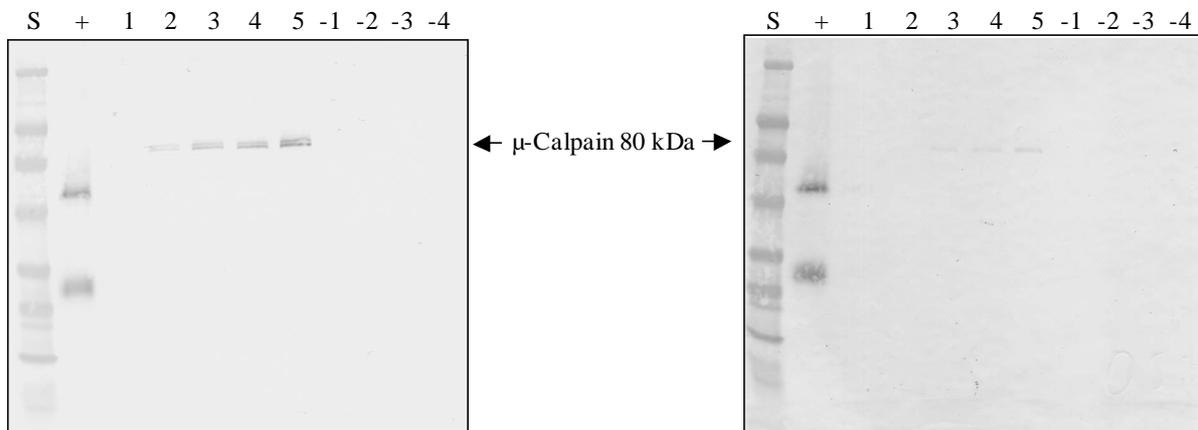


Abbildung 41: Western Blots des zeitlichen Verlaufs der Markierungsreaktion von  $\mu$ -Calpain mit JMP120 (links) und 121 (rechts).

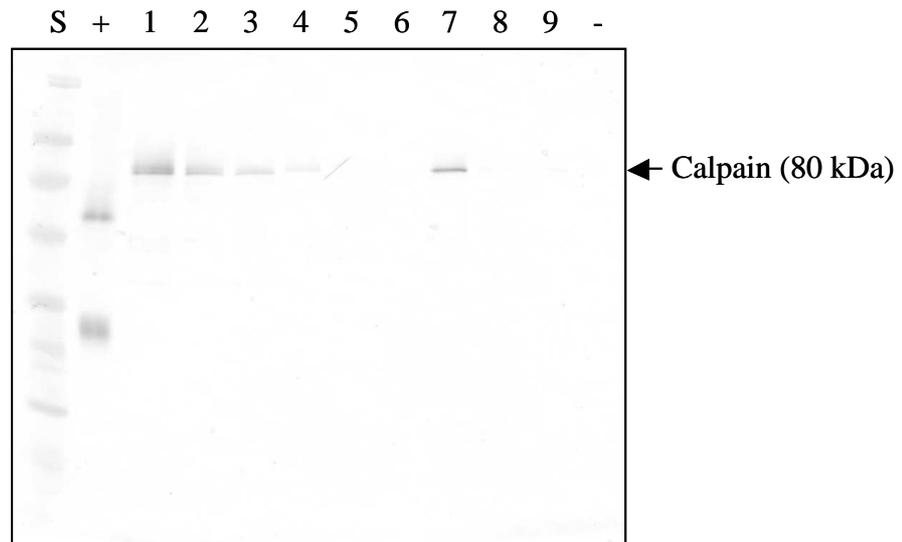
**Spalten:** S) Standard; +) Positivkontrolle (biotinyliertes IgG); 1) Peptid, 0 min; 2) Peptid, 5 min; 3) Peptid, 15 min; 4) Peptid, 30 min; 5) Peptid, 60 min; -1) Negativkontrolle: kein Peptid, 60min; -2) Negativkontrolle: carboxymethyliertes Papain, Peptid, 60 min; -3) Negativkontrolle: kein  $\text{CaCl}_2$ , Peptid, 0 min; -4) Negativkontrolle: kein  $\text{CaCl}_2$ , Peptid, 60 min.

In den Ansätzen 1-5 wurden jeweils  $0,2 \mu\text{M}$   $\mu$ -Calpain und  $4 \mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  eingesetzt. „Peptid“ bezeichnet jeweils  $2 \mu\text{M}$  JMP120, bzw. 121, die Zeitangabe bezieht sich auf die Dauer der Belichtung mit UV-Licht der Wellenlänge 245 nm.

Abbildung 41 zeigt den zeitlichen Verlauf der Photoreaktion der Peptide **JMP120** und **121** mit  $\mu$ -Calpain. In Vorexperimenten hatte sich hier bereits gezeigt, dass für die Belichtung eine Wellenlänge von 245 nm optimal geeignet war. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Reaktion mit **JMP120**, in dem die Benzophenon-Gruppe N-terminal angebracht ist, wesentlich effizienter vonstatten geht, als bei **JMP121** mit zentralem Benzophenon. Hier macht sich die große Raumerfüllung des Benzophenons bemerkbar, wie sich bereits in den Messungen der kinetischen Parameter beider Verbindungen andeutete (siehe Abschnitt 3.3.3). Es zeigte sich zudem in weiteren Experimenten (nicht gezeigt), dass bei Belichtungszeiten über einer Stunde keine höhere Kupplungsausbeute zu beobachten ist. Daher wurde in den folgenden Untersuchungen jeweils eine Belichtungszeit von 60 Minuten gewählt.

In diesem Experiment zeigt sich ebenfalls deutlich, dass die Reaktion der Photoaffinitätspeptide spezifisch ist. Weder in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, noch bei Verwendung der eng verwandten Protease Papain kann eine Markierungsreaktion beobachtet werden.

### 3.3.4.2      **Kompetition von JMP120, 121, 122 mit CP1B**



**Abbildung 42: Western Blot der Kompetition von JMP120, 121 und 122 mit CP1B um das aktive Zentrum von  $\mu$ -Calpain.**

**Spalten:** S) Standard; +) Positivkontrolle (biotinyliertes IgG); 1) 1  $\mu$ M JMP120; 2) je 1  $\mu$ M JMP120 und CP1B; 3) je 0,5  $\mu$ M JMP120 und CP1B; 4) 1  $\mu$ M JMP121; 5) je 1  $\mu$ M JMP121 und CP1B; 6) je 0,5  $\mu$ M JMP121 und CP1B; 7) 1  $\mu$ M JMP122; 8) je 1  $\mu$ M JMP122 und CP1B; 9) je 0,5  $\mu$ M JMP122 und CP1B; -) Negativkontrolle (0,2  $\mu$ M Calpain, 4  $\mu$ M  $\text{Ca}^{+2}$ ).

In den Ansätzen 1-9 wurden jeweils 0,2  $\mu$ M  $\mu$ -Calpain und 4  $\mu$ M  $\text{CaCl}_2$  eingesetzt, nach Zugabe des Photoaffinitätspeptids wurde je eine Stunde bei 25 °C und 245 nm belichtet.

Abbildung 42 zeigt die Ergebnisse der Experimente zur Kompetition der Photoaffinitätspeptide **JMP120**, **121** und **122** mit CP1B um das aktive Zentrum von  $\mu$ -Calpain. In allen Fällen ist deutlich Kompetition zu erkennen, im Fall von **JMP121** und **JMP122** ist die zu  $\mu$ -Calpain gehörende 80 kDa-Bande nur bei alleiniger Anwesenheit des Photoaffinitätspeptids zu erkennen, da CP1B offensichtlich eine wesentlich höhere Affinität als die Photoaffinitätsmarker besitzt.

### 3.3.4.3 Konkurrenz von JMP120 und 122 mit Ep-460

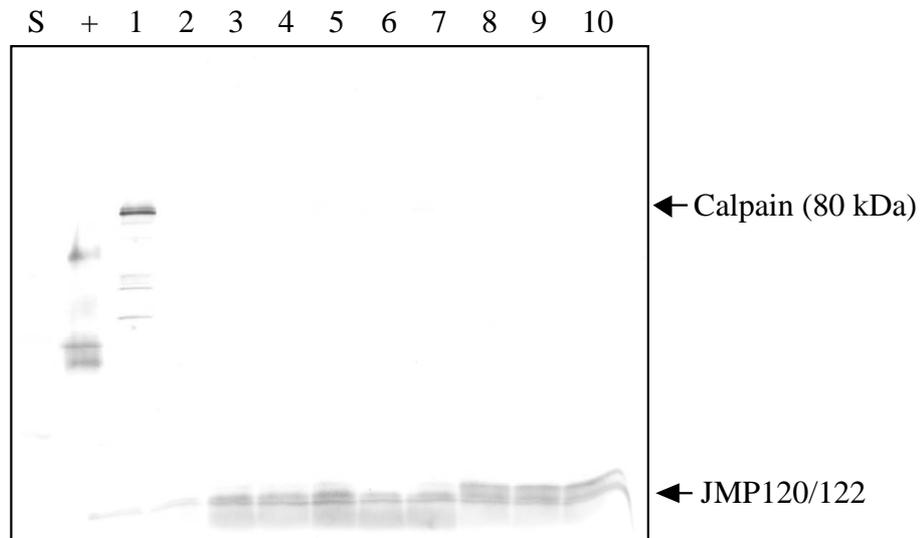


Abbildung 43: Western Blot der Konkurrenz von JMP120 und 122 mit dem irreversiblen Inhibitor Ep-460 um das aktive Zentrum von  $\mu$ -Calpain.

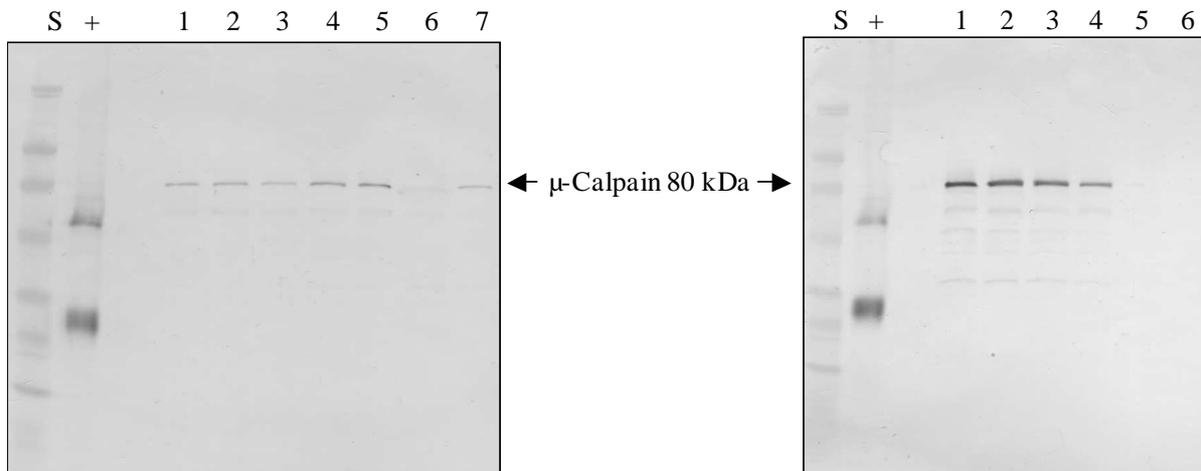
**Spalten:** S) Standard; +) Positivkontrolle (biotinyliertes IgG); 1) 1  $\mu$ M JMP120; 2) je 1  $\mu$ M JMP120 (30 min präinkubiert) und CP1B; 3) 10  $\mu$ M Ep-460 (15 min) und 1  $\mu$ M JMP120; 4) 10  $\mu$ M Ep-460 (30 min) und 1  $\mu$ M JMP120; 5) 5  $\mu$ M Ep-460 (15 min) und 1  $\mu$ M JMP120; 6) 5  $\mu$ M Ep-460 (30 min) und 1  $\mu$ M JMP120; 7) 10  $\mu$ M Ep-460 (15 min) und 1  $\mu$ M JMP122; 8) 10  $\mu$ M Ep-460 (30 min) und 1  $\mu$ M JMP122; 9) 5  $\mu$ M Ep-460 (15 min) und 1  $\mu$ M JMP122; 10) 5  $\mu$ M Ep-460 (30 min) und 1  $\mu$ M JMP122.

In den Ansätzen 1-10 wurden jeweils 0,2  $\mu$ M  $\mu$ -Calpain und 4  $\mu$ M  $\text{CaCl}_2$  eingesetzt. In den Ansätzen 3-10 wurden jeweils mit Ep-460 bei 25 °C präinkubiert (Zeiten siehe oben), nach Zugabe des Photoaffinitätspeptids wurde je eine Stunde bei 25 °C und 245 nm belichtet.

Abbildung 43 zeigt in allen Fällen unzweifelhaft Konkurrenz von Ep-460 mit den Photoaffinitätspeptiden **JMP120** und **122**. In keinem der Experimente ist die 80 kDa-Untereinheit von  $\mu$ -Calpain im Western Blot sichtbar. Das nicht reagierende Photoaffinitätspeptid befindet sich am unteren Ende der jeweiligen Spur. Somit findet offensichtlich keine Reaktion mit blockiertem  $\mu$ -Calpain statt. Daraus folgt unzweifelhaft, dass diese Peptide direkt an den katalytischen Spalt binden.

In Abwesenheit eines Inhibitors, beziehungsweise bei unvollständiger Konkurrenz durch CP1B ist dementsprechend eine schwächere Bande des Photoaffinitätspeptids zu beobachten (Reihe 1 und 2).

### 3.3.4.4 Untersuchung zur Autolyse von $\mu$ -Calpain mit JMP120



**Abbildung 44: Western Blot der Autolyse von mit JMP120 markiertem  $\mu$ -Calpain.**

**Spalten:** S) Standard; +) Positivkontrolle (biotinyliertes IgG).

**Linke Seite;** jeweils 0,2  $\mu$ M  $\mu$ -Calpain: 1) 0,025  $\mu$ M JMP120, 60 min UV; 2) wie 1, dann 15 min Inkubation bei 37°C; 3) wie 1, 30 min Inkubation bei 37 °C; 4) 0,05  $\mu$ M JMP120, 60 min UV; 5) wie 4, dann 15 min Inkubation bei 37°C; 6) 25  $\mu$ L aus 4) + 12,5 $\mu$ L 2 $\mu$ M  $\mu$ -Calpain, 15 min Inkubation bei 37 °C; 7) wie 6, jedoch 60 min Inkubation.

**Rechte Seite;** jeweils 1  $\mu$ M  $\mu$ -Calpain: 1) 0,25  $\mu$ M JMP120, 60 min UV; 2) wie 1, dann 15 min Inkubation bei 37°C; 3) wie 1, 30 min Inkubation bei 37 °C; 4) 25  $\mu$ L aus 1) + 20  $\mu$ L  $\mu$ -Calpain (2 $\mu$ M) + 4 $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>, 60 min Inkubation bei 37°C; 5) 2 $\mu$ M  $\mu$ -Calpain, Präinkubation 15 min bei 37°C, dann Zugabe von JMP120 auf eine Endkonzentration von 1,3 $\mu$ M  $\mu$ -Calpain und 0,3  $\mu$ M JMP120, 60 min UV.

In den Ansätzen 1-7 wurden jeweils 4  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub> eingesetzt. Die Zeitangabe „X min UV“ Bezeichnet jeweils die Dauer der Belichtung bei 245 nm.

Wie aus Abbildung 44 ersichtlich wird, findet eine Bindung von **JMP120** nur an die intakte 80 kDa-Untereinheit von  $\mu$ -Calpain statt. Weder bei vorgelagerter Belichtung, noch bei Präinkubation von Calpain können markierte Autolyse-Bruchstücke gefunden werden. Dies wurde auch in einem Experiment mit Acrylamid-Gelen nach Schägger (nicht gezeigt), in denen gezielt der Bereich niedriger Molekularmassen untersucht wird, bestätigt.

### 3.3.4.5 Untersuchung zum Chymotrypsin-Verdau von $\mu$ -Calpain

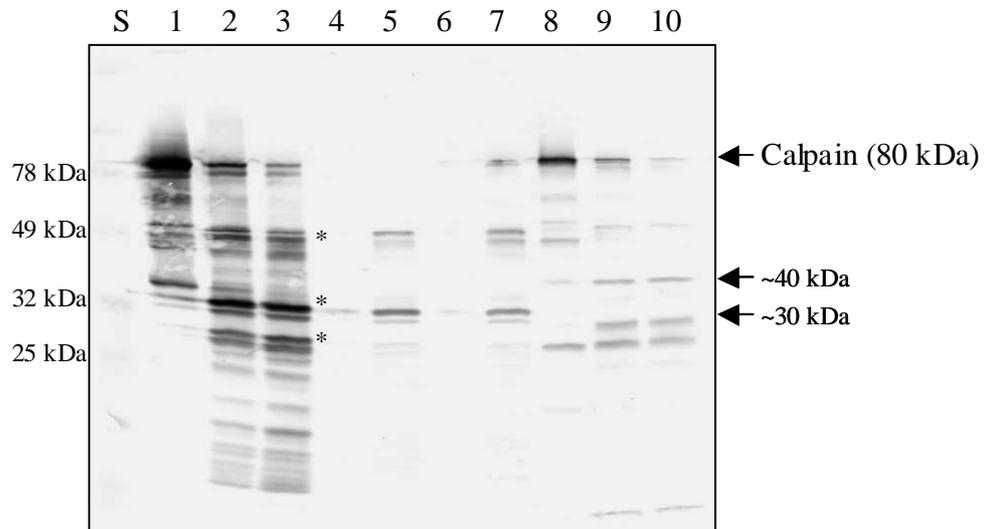


Abbildung 45: Western Blot des Chymotrypsin-Verdau von mit JMP120 und 122 markiertem  $\mu$ -Calpain.

**Spalten:** S) Standard, Molekulargewichte sind am linken Bildrand angegeben; 1) 0,25  $\mu$ M JMP120; 2) 0,25  $\mu$ M JMP120, 0,25  $\mu$ M Chym; 3) 0,25  $\mu$ M JMP120, 0,5  $\mu$ M Chym; 4) 0,25  $\mu$ M Chym; 5) vorinkubiert mit 0,25  $\mu$ M Chym, dann 0,25  $\mu$ M JMP120; 6) 1  $\mu$ M  $\mu$ -Calpain, 1h, 25 °C; 7) 1  $\mu$ M  $\mu$ -Calpain, 1h bei 25 °C vorinkubiert, dann 0,25  $\mu$ M JMP120; 8) 0,25  $\mu$ M JMP122; 9) 0,25  $\mu$ M JMP122, 0,25  $\mu$ M Chym; 10) 0,25  $\mu$ M JMP122, 0,5  $\mu$ M Chym.

In den Ansätzen 1-10 wurde jeweils 1  $\mu$ M  $\mu$ -Calpain und 4  $\mu$ M  $\text{CaCl}_2$  eingesetzt, nach Zugabe des Photoaffinitätspeptids wurde je eine Stunde bei 25 °C und 245 nm belichtet. Nach Zugabe von Chymotrypsin (Chym) wurde jeweils eine Stunde bei 25 °C inkubiert. Es ist zu beachten, dass das verbesserte Färbeprotokoll (siehe Material und Methoden) verwendet wurde.

Fragmente des Chymotrypsin-Abbaus mit JMP120 (~50 kDa, ~34 kDa und ~28 kDa) sind mit \* gekennzeichnet. Die geschätzten Größen der Fragmente des Chymotrypsin-Abbaus mit JMP122 sind am rechten Bildrand angegeben.

Abbildung 45 zeigt die Ergebnisse des Chymotrypsin-Verdau von  $\mu$ -Calpain, das mit **JMP120** und **122** markiert wurde. Es wurde ein verbessertes Färbeprotokoll angewendet, durch das die Empfindlichkeit des Western Blots deutlich erhöht wurde, so dass zunächst die Vielzahl der Banden auffällt. Es zeigt sich, dass auch die im Ausgangsmaterial vorhandenen Autolyseprodukte (siehe Abbildung 40, Seite 101) durch **JMP120** markiert werden, was in den vorhergehenden Experimenten nicht ersichtlich war. Auch die entsprechenden Reihen, in denen  $\mu$ -Calpain extensiver Autolyse unterworfen wird, zeigen markierte Fragmente von etwa 50 und 34 kDa.

Bei mit **JMP120** markiertem  $\mu$ -Calpain entstehen beim Verdau durch Chymotrypsin ebenfalls markierte Fragmente, wie an der Verschiebung der Intensität von der 80 kDa-Bande zu Banden kleinerer Molekülmassen von etwa 50, 34 kDa und 28 kDa

erkennbar ist (anhand der Laufhöhe der Gelbanden abgeschätzt). Die Massen der beiden größeren Fragmente sind in Übereinstimmung mit den von der Gruppe um Goll gefundenen Fragmenten des Chymotrypsin-Verdaus von  $\mu$ -Calpain, deren Molekulargewichte zu 48, 30 und 21 kDa bestimmt wurden<sup>[105]</sup>. Addiert man zu diesen Werten jeweils 3 kDa für das Photoaffinitätspeptid, so zeigt sich die exzellente Übereinstimmung mit den hier ermittelten Werten von geschätzten 50 kDa und 34 kDa. Das dritte gefundene Fragment mit einer Masse von etwa 28 kDa zeigt eine größere Diskrepanz zu dem von Goll und Mitarbeitern gefundenen Fragment von 21 kDa<sup>[105]</sup>. Es ist jedoch zu beachten, dass in dieser Studie  $\mu$ -Calpain aus Rindermuskulatur verwendet wurde, während in der hier vorgestellten Arbeit das humane Protein eingesetzt wurde. Daher ist nicht auszuschließen, dass die Lage der Spaltstellen in beiden Proteasen unterschiedlich ist, und somit Fragmente unterschiedlichen Molekulargewichts zu erwarten sind.

Die Markierung mit **JMP122** zeigt ähnliche Resultate, jedoch wurden offensichtlich andere Fragmente markiert. Dies war zu erwarten, da sich hier die reaktive Benzophenon-Einheit am C-Terminus befindet, so dass die Photoreaktion an einer anderen Stelle auf der Oberfläche der Protease stattfinden muss. Es wurden Fragmente mit Molekulargewichten von etwa 40 und 30 kDa (anhand der Laufhöhe der Gelbanden abgeschätzt) identifiziert. Diese stehen in Kontrast zu den von Goll und Mitarbeitern gefundenen Fragmenten<sup>[105]</sup>. Es ist jedoch unklar, ob dieser Umstand auf Unterschiede zwischen humaner und Rinder-Protease zurückzuführen ist. Möglich ist auch, dass Fragmente erhalten werden, die unter anderen Bedingungen sehr kurzlebig sind und rasch zu Fragmenten kleinerer Molekularmassen abgebaut werden. Aufgrund der Anwesenheit des Photoaffinitäts-Peptids könnten sich solche Fragmente einem weiteren Abbau entziehen und werden somit im Western Blot sichtbar.

### 3.3.4.6 Vergleich mit anderen Studien

In einem vergleichbaren Experiment untersuchten Croall und McGrody die Geometrie der Bindung von Calpastatin an der Oberfläche von m-Calpain<sup>[355]</sup>. Hierzu verknüpften sie das 24-mere Peptid EKLGERDDTIPPEYRELLEKKTGV aus Untereinheit B, Domäne IV von Calpastatin durch Inkubation mit MBS. Mit diesem Reagenz (siehe Abbildung 46) können Amino- und Thiolgruppen von Peptiden auf einfache Weise verknüpft werden<sup>[356]</sup>, eine Technik die häufig in der Immunochemie zur kovalenten Verknüpfung von Proteinkomplexen Verwendung findet.

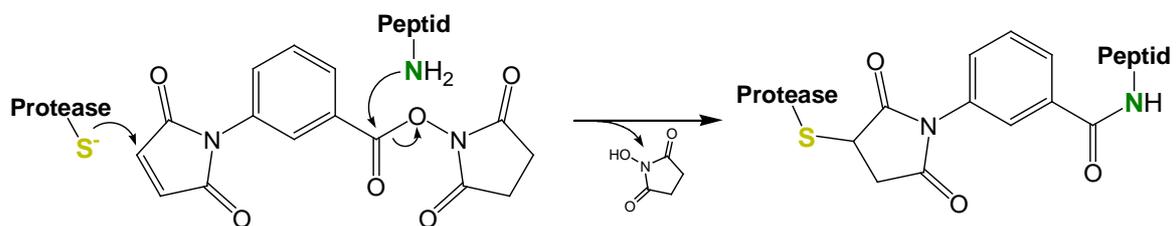


Abbildung 46 Schematische Darstellung der Reaktion von MBS mit den katalytisch aktiven Aminosäuren der Cysteinprotease.

Nach chemischer Spaltung an Cystein-Resten des Proteins mit Natriumcyanid wurde die Größe der erhaltenen Fragmente mittels SDS-PAGE bestimmt. Anhand der Verschiebung einzelner Banden im Vergleich zu einer nicht markierten Kontrolle wurde der Ort der kovalent gebundenen Aminosäure ermittelt. Er lag zwischen Aminosäure 300 und 510, was der C-terminalen Region von Domäne II und der kompletten Domäne III von m-Calpain entspricht. Als wahrscheinlichster Kandidat wurde Cys<sup>498</sup> ermittelt. Da  $\mu$ -Calpain an dieser Stelle kein Cystein besitzt, konnte das Peptid mit dieser Protease keine kovalente Verknüpfung eingehen, obwohl es zur Inhibierung des Enzyms in der Lage war. Die Bindung an Cys<sup>498</sup> erscheint in sofern ungewöhnlich, als diese Aminosäure mindestens 22 Å vom katalytischen Cys<sup>115</sup> in Calpain (Luftlinie!) entfernt ist. Hieraus wurde geschlossen, dass Calpastatin nicht mit dem aktiven Zentrum von Calpain in Wechselwirkung treten kann und eher eine Art allosterischer Hemmung vorliegt. Dies steht im direkten Gegensatz zu den hier gezeigten Ergebnissen, die eine Bindung an das katalytische Zentrum der Cysteinprotease belegen. Zudem belegten kinetische Studien anderer Gruppen, dass Calpastatin Konkurrenz sowohl mit Substraten<sup>[199, 202]</sup>, als auch mit Inhibitoren, die das aktive Zentrum blockieren, zeigt<sup>[202, 340]</sup>. Ferner ist zu bemerken, dass das

verwendete Reagenz viele unspezifische kovalente Verknüpfungen erzeugte, die nicht identifiziert werden konnten, was wiederum die Aussagekraft der Experimente vermindert. Da das Reagenz zum vollständig geschützten Peptid zugegeben wurde, wurden somit alle freien Aminogruppen (N-Terminus, ein N-terminales Lysin, zwei C-terminale Lysine) in einer statistischen Verteilung aktiviert. Der Anknüpfungspunkt ist also ebenso unbekannt wie die Orientierung der Peptidkette. Die Länge des Peptids beträgt in vollkommen ausgestreckter Konformation etwa  $87 \text{ \AA}$ , bei einer angenommenen Ausdehnung von  $7,28 \text{ \AA}$  pro Dipeptid<sup>[357]</sup>. Folglich deckt ein durch das Peptid gezogener Zirkelkreis eine Fläche von etwa  $23.800 \text{ \AA}^2$  ab, was fast der gesamten Oberfläche des Enzyms von grob geschätzten  $28.000 \text{ \AA}^2$  entspricht. Nimmt man all diese Faktoren zusammen, wird ersichtlich, dass auf Grundlage dieser Ergebnisse keine stichhaltige Aussage zur Lage des Peptids auf der Oberfläche von Calpain oder zum Bindungsmodus von Calpastatin getroffen werden kann. Die Bindung des Peptids war, im Gegensatz zu der von Calpastatin, interessanterweise unabhängig von der Kalziumkonzentration, daher ist auch eine in weiten Teilbereichen unspezifische Bindung nicht auszuschließen. Zudem ist die Wahl der Sequenz fraglich, da die für die Hemmwirkung entscheidende Unterdomäne B nicht im Zentrum des Peptids lag. Stattdessen wurde das nur anscheinend wichtige Bindungselement TIPPEYR ins Zentrum gesetzt. Kurze Zeit später veröffentlichten Ma et al. jedoch eine Arbeit, in der ein 13-meres Peptid der Sequenz DPMSSTYIEELLA, dem die oben erwähnte Teilsequenz komplett fehlt. Dennoch besitzt es gegenüber  $\mu$ -Calpain 61% der Hemmwirkung von CP1B bei einer Konzentration von  $0,1 \text{ \mu M}$ , und 19% der ursprünglichen Hemmwirkung bei  $1 \text{ \mu M}$ <sup>[207]</sup>. Dies ist insofern erstaunlich, als die vermuteten Sekundärstrukturelemente und Hot Spots in diesem Peptid nicht vorhanden sind. Allerdings wurden keine Angaben zur Selektivität dieses Peptids für Calpain im Vergleich zu anderen Proteasen gemacht. Somit ist nicht auszuschließen, dass es sich um ein Zufallsprodukt handelt, welches keinen mit CP1B vergleichbaren Bindungsmodus besitzt.

## 4 Zusammenfassung und Ausblick

### 4.1 P'-Bibliotheken

Die in dieser Arbeit erzeugten Bibliotheken dienen der Gewinnung struktureller Informationen über den ungestrichenen Teil des katalytischen Spalts papainähnlicher Cysteinproteasen. Hiermit wurde der erste systematische Ansatz zur Aufklärung der Präferenzen der S1'- und S2'-Bindungstaschen des katalytischen Spalts solcher Proteasen vorgestellt. Die Daten solcher Untersuchungen können zur Feinabstimmung der selektiven Inhibierung einzelner Mitglieder der Proteasefamilie dienen, und gleichzeitig bei der strukturellen Einordnung unbekannter Mitglieder der Proteasefamilie eingesetzt werden. Basierend auf dem bekannten irreversiblen Inhibitor-Motiv Ep-460<sup>[281]</sup> konnten durch die systematische Einbeziehung der gestrichenen Bindungstaschen Inhibitoren zweiter Generation mit deutlich erhöhter Affinität für einzelne Mitglieder der Familien, genauer, Cathepsin L, B und X erzeugt werden. Generell wurde eine starke Bevorzugung hydrophober Aminosäuren der S1'- und S2'-Taschen der untersuchten Proteasen gefunden. Der beste für Cathepsin B gefundene Inhibitor, Z-DAB-Leu-[tEps]-Leu-Trp-OH, weist mit einem  $k_2/K_i$ -Wert von  $2,54 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  die höchste bisher gemessene Inhibitionskonstante eines gegen Cathepsin B gerichteten Moleküls auf. Für Cathepsin L wurde ebenfalls ein exzellenter Inhibitor, Z-DAB-Leu-[tEps]-Leu-Leu-OH, mit einem  $k_2/K_i$ -Wert von  $484.000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  identifiziert, der als Leitstruktur für weitere Optimierungen dienen kann. Das Konzept könnte im zukünftigen Ausblick im Fall von Cathepsin L auf die S3'-Bindungstasche ausgeweitet werden, um so Selektivität gegenüber Cathepsin B zu gewinnen. Da in der letztgenannten Protease der *occluding loop* mit Aminosäuren jenseits von P2' kollidiert, ist zu erwarten, dass durch den Einbau einer P3'-Aminosäure die Präferenz für Cathepsin L gewährleistet wird.

Bei der Untersuchung von  $\mu$ -Calpain ergaben sich nur für die S1'-Tasche klare Präferenzen, die zumindest weitere Einblicke in die strukturelle Beschaffenheit der Protease erbrachten. Es wurde erneut bestätigt, dass für eine wirksame Inhibierung von Calpain die Wechselwirkung mit dem Oxyanionenloch der Protease unerlässlich ist. In Fortsetzung der Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Potempa

(Jagiellonische Universität, Krakau, Polen) wird an der weiteren Aufklärung der P2'-Präferenzen der neu gefundenen Staphopaine gearbeitet.

Azapeptid-Bibliotheken, ähnlich der von Powers und Mitarbeitern vorgestellten Moleküle<sup>[146, 309, 311]</sup>, könnten die Adressierung des Oxyanionenlochs mit einer sauren Seitenkette ermöglichen und somit die Affinität der Inhibitoren deutlich erhöhen. Eine Ausweitung des Konzepts auf nichtnatürliche, sowie D-Aminosäuren könnte eine weitere Feinabstimmung der Inhibitoren ermöglichen, wobei das Hauptaugenmerk sicherlich auf hydrophobe Aminosäuren gerichtet sein muss. Prinzipiell wäre ein Optimierungszyklus in der ungestrichenen Seite unter Berücksichtigung der für die gestrichene Seite ermittelten Präferenzen denkbar. In einigen Fällen ist sicherlich eine weitere Steigerung der Affinität der Hemmstoffe zu erwarten, so beispielsweise für Cathepsin B, welches bereits eine P2-Präferenz für substituierte Aromaten zeigte<sup>[64]</sup>.

Durch einen Austausch der Z-Gruppe mit einer radioaktiv oder fluoreszenzmarkierten Reportergruppe ist die Erzeugung von Sonden zur Verwendung der hier vorgestellten Inhibitoren in zellbasierten Studien denkbar, ähnlich dem von Bogoy und Mitarbeitern entwickelten DCG-System<sup>[300, 301]</sup>. Solche Affinitätsmarker, oder aktivitätsbasierte Sonden erfahren seit einiger Zeit zunehmende Aufmerksamkeit. Verschiedene Klassen von Enzymen wurden hiermit untersucht und eine Reihe von Ansätzen zur gezielten Adressierung bestimmter Proteasen oder Proteasefamilien mit solchen Molekülen entwickelt<sup>[358, 359]</sup>.

Mit dem hier erarbeiteten Konzept sollte eine Feinabstimmung der Inhibitionseigenschaften von Verbindungen auf Basis von Epoxybernsteinsäure für papainähnliche Cysteinproteasen möglich werden. Somit ist nicht nur die detaillierte Aufklärung der räumlichen Struktur des aktiven Zentrums der Proteasen möglich, sondern auch die Erzeugung präziser und spezifischer molekularer Werkzeuge. Speziell auf einzelne Proteasen zugeschnittene Moleküle können zur detaillierten Ermittlung der physiologischen Funktionen von Proteasen ebenso eingesetzt werden, wie zur Aufklärung der Mechanismen pathologischer Fehlfunktionen dieser Enzyme. Somit wird eine Art hochaufgelöster Proteomik zugänglich. Schließlich können die ermittelten Präferenzen der Protease-Bindungstaschen in das Design pharmakologischer Wirkstoffe einfließen.

## 4.2 CP1B-Peptide

Die Beziehung zwischen der Struktur des endogenen Calpain-Inhibitors Calpastatin und seiner Interaktion mit der Protease wurde untersucht. Hierzu wurde das bereits bekannte 27-mer Peptid aus der Sequenz der Unterdomäne B von Domäne I aus humanem Calpastatin (CP1B) zugrunde gelegt. Zunächst wurden verkürzte Fragmente erstellt, um die Beteiligung der C- und N-terminalen Reste an der Gesamtaffinität in kinetischen Messungen mit  $\mu$ -Calpain zu ermitteln. Ein 20-meres Peptid wurde gefunden, welches sich durch nanomolare Affinität und hohe Selektivität für Calpain auszeichnet. Dieses Peptid diente als Leitstruktur für weitere Untersuchungen. Die Anteile beider Termini des Peptides an der Hemmwirkung wurden mit entsprechenden Fragmenten und nicht peptidisch verbrückten Konstrukten untersucht. Wie sich zeigte, ist die konzertierte Interaktion beider Hälften zur effektiven Inhibierung der Protease vonnöten, wobei ein bivalenter Mechanismus der Hemmung vorzuliegen scheint. Ein gleichzeitiger Austausch mehrerer Aminosäuren durch Alanin oder PEG-Aminosäuren könnte hier zur weiteren Aufklärung der essentiellen Strukturelemente des Peptids dienen. Schließlich wurde die Existenz einer  $\beta$ II-Schleife in dem ansonsten unstrukturierten Peptid untersucht, die bereits von Maki und Mitarbeitern aufgrund von NMR-Experimenten postuliert wurde<sup>[214]</sup>, bestätigt. Hierzu wurden über Aminosäure-Seitenketten zyklisierte homodetische Peptide verschiedener Ringgrößen synthetisiert und ihre Affinität zu  $\mu$ -Calpain in kinetischen Messungen bestimmt. Die Ergebnisse der hier vorgestellten Untersuchungen bestätigen das Vorhandensein eines solchen Sekundärstrukturelements. Schließlich wurden Peptide mit Photoaffinitätsgruppen und Biotinmarker an verschiedenen Positionen erzeugt, welche in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Christian Sommerhoff (LMU München) zur Bestimmung des Bindungsmodus des 20-meren Peptids an Calpain dienen sollten. Die Peptide zeigten spezifische Affinität zu Calpain und markiertes Protein konnte in Blots nachgewiesen werden. Es zeigte sich im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Gruppen unzweifelhaft, dass Calpastatin bei der Bindung an Calpain mit dessen katalytischem Zentrum in Wechselwirkung tritt. Zur Zeit laufen die Arbeiten zur Analyse der Bindungsstellen

durch tryptischen Verdau und N-terminale Sequenzierung sowie durch massenspektrometrische Charakterisierung der biotinylierten Bruchstücke.

Das CP1B-Peptid wurde bereits in einer Vielzahl von Experimenten zur Inhibierung der Calpaine verwendet. Auch technische Anwendungen, wie beispielsweise die direkte Reinigung von Calpain mittels einer mit CP1B funktionalisierten Sephadrosegel-Säule aus dem Rohprodukt wurden realisiert<sup>[110]</sup>. Zudem wurde CP1B bereits in zellbasierten Studien eingesetzt, beispielsweise, um die Rolle von Calpain bei der Regulation von PKC $\epsilon$ <sup>[360]</sup>, Bildung von  $\beta$ -Amyloid-Plaques<sup>[361]</sup>, der neurodegenerativen Prozessierung von p35 zu p25<sup>[362]</sup>, ischämischen Prozessen<sup>[363]</sup> oder Tumorinvasivität<sup>[364]</sup> zu klären. In solchen Studien schränkt die geringe Zellgängigkeit die Einsetzbarkeit von CP1B prinzipiell ein. Gil-Parrado demonstrierte jedoch in Zusammenarbeit mit Moroder und Mitarbeitern, dass die Membranpermeabilität durch Konjugation mit dem Peptid Penetratin verbessert werden kann<sup>[365]</sup>. Ein als „Calpstat“ bezeichnetes Konstrukt mit der Signalsequenz des Wachstumsfaktors aus Kaposi-Fibroblasten besitzt ebenfalls erhöhte Membranpermeabilität<sup>[366]</sup>.

Diese Beispiele zeigen, dass Calpastatin-Peptide als molekulare Werkzeuge sowohl für *in vitro* als auch *in vivo* Studien der Aktivität von  $\mu$ - und m-Calpain verwendbar sind. In Ermangelung geeigneter niedermolekularer Inhibitoren, welche die erforderliche Selektivität für Calpain aufweisen, bieten diese Calpastatin-Fragmente bislang die einzige gangbare Alternative. Die weitere Aufklärung des Bindungsmodus von Calpastatin und daraus abgeleiteter Peptide an Calpain wird voraussichtlich verbesserte peptidische Inhibitoren niedrigeren Molekulargewichts hervorbringen. Diese wiederum könnten dann als Vorlage für niedermolekulare, nichtpeptidische Hemmstoffe und schließlich auch pharmakologische Wirkstoffe dienen.

## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Material und Methoden

#### *Lösemittel und Chemikalien*

Alle verwendeten Lösemittel wurden von den Firmen *Sigma-Aldrich* (Deisenhofen, D), *Fluka* (Buchs, CH), *Merck* (Darmstadt, D) und *Riedel-de Haën* (Seelze, D) in p.a. Qualität bezogen. Für die analytische sowie präparative HPLC wurde Acetonitril der Qualität *LiChrosolv* der Firma *Merck* (Darmstadt, D), sowie mittels eines *Super-Q™ Plus* Wasseraufbereitungssystems der Firma *Millipore* (Billerica, USA) deionisiertes Wasser verwendet.

Aminosäurederivate wurden bei den Firmen *Iris Biotech GmbH* (Marktredwitz, D), und *Fluka* (Buchs, CH) bezogen. Beladene 2-Chlorotriethylharze stammten von der Firma *Fluka* (Buchs, CH), Rink-Amid-Harz und NovaTag-Harze von NovaBiochem/Merck Biosciences AG (Darmstadt, D). Alle weiteren Chemikalien wurden von den Firmen *Sigma-Aldrich* (Deisenhofen, D.), *Fluka* (Buchs, CH) und *Merck* (Darmstadt, D) erworben.

#### *Dünnschichtchromatographie*

Für die Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel 60 Fertig-Glasplatten der Firma *Merck* (Darmstadt, D), teilweise mit F<sub>254</sub> Fluoreszenzindikator, verwendet. Die eingesetzten Laufmittelsysteme sind in den jeweiligen Syntheseprotokollen explizit angegeben. Die Detektion erfolgte mittels UV-Absorption bei 254 nm.

Verbindungen, die eine Aminogruppe tragen, wurden durch Chlor/Tolidin-Färbung detektiert. Hierzu wurde die Dünnschichtplatte für 5 min einer Chlorgas-Atmosphäre ausgesetzt, mit Pressluft von überschüssigem Chlorgas befreit und mit einer Lösung von 160 mg o-Tolidin, 30 mL Eisessig und 1 g KI in 500 mL destilliertem Wasser besprüht. Es zeigen sich blau-violette oder gelbe Flecken.

Epoxide wurden durch Besprühen der Dünnschichtplatte mit einer Lösung von 1 g 4-(4-Nitrobenzyl)pyridin in 100 mL Aceton, anschließendem Erhitzen und Besprühen mit 20% TEA in Aceton als rote bis purpurfarbene Flecken nachgewiesen.

### *Automatisierte Peptidsynthese*

Die Synthesen linearer Calpastatin-Peptide und linearer Vorstufen zyklischer Calpastatin-Peptide wurden an polymeren Trägerharzen durchgeführt. Hierbei kam ein Batch-Synthesizer Typ *431A* der Firma *Applied Biosystems* (Foster City, USA) zum Einsatz. Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde das Gerät durch ein Folgemodell vom Typ *433A* mit der Steuerungs-Software *SynthAssist* (Version 3.1) der Firma *Applied Biosystems* (Foster City, USA) und UV/Vis-Detektor *PE Series 200* der Firma *Perkin Elmer* (Überlingen, D) zur Überwachung der Fmoc-Abspaltung ersetzt. Zur Vorhersage schwierig zu synthetisierender Sequenzteile wurde die Software *Peptide Companion*, Version 1.24 der Firma *CoshiSoft/PeptiSearch* (Tuscon, USA) eingesetzt.

### *Manuelle Peptidsynthese*

Die Abspaltung der zur Fmoc/tBu-Strategie orthogonalen Schutzgruppen, Zyklisierungen, Kupplungen mit besonders wertvollen Aminosäuren und Beladungen von Wang- oder Chlorotriyl-Harzen erfolgte in Einmal-Plastikspritzen *Discardit II* (2; 5 oder 10 mL) der Firma *Becton Dickinson* (Franklin Lakes, USA) mit Polyethylen-Fritten, mittlere Porenweite 35 µm und Polyethylen-Verschlussstopfen. Die Durchmischung der Reaktionsansätze wurde mit einem Laborschüttler *KS 130 basic* der Firma *IKA* (Staufen, D) bewerkstelligt.

Bei der Beladung größerer Harzmengen kam ein Glasreaktor mit einem Druckluftbetriebenen KPG-Rührer, zwei Einfüllstutzen und Glasfritte, über welche die Lösemittel abgesaugt wurden, zum Einsatz.

Die Synthese der Epoxypeptid-Bibliotheken erfolgte in einem Laborschüttler *KS 130 basic* der Firma *IKA* (Staufen, D) mit einem 24-fach PTFE-Reaktor-Aufsatz der Firma *Advanced Chemtech*.

### *Gefriertrocknung*

Es wurde eine Gefriertrocknungsanlage Modell *Alpha 2-4* der Firma *Christ* (Osterode, D) benutzt. Als Lösemittel wurden Wasser, 1% HOAc in Wasser, oder *t*-BuOH/H<sub>2</sub>O (4:1 v/v) verwendet, die Trocknung erfolgte bei 0,05 mbar und -45°C.

### *UV/Vis-Spektroskopie*

UV/Vis-Spektren wurden an einem Zweistrahl-Spektrometer Lambda 19 der Firma *Perkin Elmer* (Überlingen, D) aufgenommen und mit der Software *UV WinLab* (Version 2.7) der Firma *Perkin Elmer* (Überlingen, D) ausgewertet. Die Peptidkonzentrationen wurden dabei so gewählt, dass die gemessene Absorption zwischen 0,1 und 1,0 Absorptionseinheiten lag. Zur Aufnahme der Spektren wurden Quarz *Suprasil*<sup>®</sup> Küvetten 282 QS der Firma *Hellma* (Mühlheim, D) mit einer Schichtdicke von 10 mm verwendet. Sämtliche Proben wurden bei RT vermessen.

### *Fluoreszenz-Spektroskopie*

Die Messungen wurden an einem Lumineszenz-Spektrometer *PE LS50B* der Firma *Perkin Elmer* (Überlingen, D) aufgenommen und mit der Software *FL WinLab* (Version 3.00) der Firma *Perkin Elmer* (Überlingen, D) prozessiert. Zur Aufnahme der Spektren wurden Quarz *Suprasil*<sup>®</sup> Küvetten 105.251- QS der Firma *Hellma* (Mühlheim, D) mit einer Schichtdicke von 3 mm verwendet. Alle Proben wurden bei 20°C vermessen.

### *CD-Spektroskopie*

Die CD-Spektren wurden an einem Spektrapolarimeter mit temperierbaren Küvettenhalter des Typs J-715 der Firma *Jasco* (Groß-Umstadt, D) bei 20 °C aufgenommen. Die Prozessierung und Auswertung der Spektren erfolgte mit der Software *Spectra-Manager* (Version 1.53.04) der Firma *Jasco* (Groß-Umstadt, D). Zur Aufnahme der Spektren wurden Quarz *Suprasil*<sup>®</sup> Küvetten 110 QS der Firma *Hellma* (Mühlheim, D) mit einer Schichtdicke von 1 mm verwendet. Je zwei Scans wurden pro Probe durchlaufen und additiv kumuliert. Die resultierenden Spektren sind in Elliptizität pro Aminosäurerest gezeigt, welche nach der Formel  $[\theta]_R = [\theta]/n$  [ $\text{deg} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ ] aus den Rohdaten berechnet wurden, wobei  $[\theta]_R$  die molare Elliptizität pro Aminosäure und n die Anzahl der Aminosäuren des Peptids bezeichnen.

Zur Berechnung des  $\beta$ -Schleifen-Anteils der Peptide wurde das Programm *CD Spectra Deconvolution* (Version 2.1) für Win95 von Gerald Böhm<sup>[367]</sup> verwendet.

### *Massenspektrometrie*

LC-MS-Massenspektrometrie wurde an einem *PE Sciex API 165* ESI-Massenspektrometer der Firma *Applied Biosystems* (Forster City, USA) durchgeführt. Als HPLC-System wurde ein Microgradient-System 140 C der Firma *Applied Biosystems* (Forster City, USA) mit einem Diodenarray-Detektor *1100 Series, Modell G1315B* der Firma *Agilent* (Palo Alto, USA), einem *Series 200* Autosampler und einem *Nelson 200* Interface der Firma *Perkin Elmer* (Überlingen, D) eingesetzt. Als Trennsäule wurde eine *Nucleosil 100-5 C<sub>8</sub>* RP-Säule der Firma *Macherey-Nagel* (Düren, D) mit einem linearen Gradienten von 5% nach 95% MeCN in H<sub>2</sub>O (je 0,1% TFA) bei einer Flussrate von 200 µL/min verwendet. Zum Erstellen und Prozessieren der Spektren wurde die Software *BioMultiView* (Version 1.3.1) der Firma *PE Sciex* (Ontario, CAN) unter *MacOS 9* eingesetzt.

### *Präparative Säulenchromatographie*

Für die präparative Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 (230-400 mesh ASTM) der Firma *Merck* (Darmstadt, D) verwendet. Die verwendeten Laufmittelsysteme sind in den entsprechenden Syntheseprotokollen vermerkt.

### *Analytische HPLC*

Es wurde eine HPLC-Anlage „*Alliance*“ 2690 der Firma *Waters* (Eschborn, D) mit Detektor *PDA 996* und der Software *Millenium*<sup>32</sup> Zur Steuerung und Datenverarbeitung verwendet. Bei diesem System wurde eine *Chromolith Performance RP-18e 100* 4,6 mm Säule der Firma *Merck* (Darmstadt, D) verwendet. Es wurde innerhalb einer Zeit von 7 Minuten ein linearer Gradient von 5% MeCN / 95% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (2% in H<sub>2</sub>O) nach 90% MeCN / 10% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (2% in H<sub>2</sub>O) bei einer Flussrate von 3 mL/min durchlaufen. Die Retentionszeiten der Verbindungen sind bei den jeweiligen Syntheseprotokollen angegeben.

### *Präparative HPLC*

In allen hier verwendeten Systemen kam eine *Nucleosil 100-5 C18* Trennsäule der Firma *Macherey-Nagel* (Düren, D) zum Einsatz. Als Eluenten wurden jeweils die Puffer 1 (0,1% TFA in H<sub>2</sub>O) und 2 (0,08% TFA in MeCN) bei einer Flussrate von 10 mL/min verwendet. Die Trennungen wurden mit folgenden Systemen durchgeführt:

Präparatives System A: Es wurden zwei HPLC-Pumpen Modell 305 und ein Dynamic Mixer 811B, sowie ein Fraktionssammler Model 201 der Firma *Abimed* (Langenfeld, D) benutzt. Als Detektor diente ein UV-Detektor Modell *SPD6-A* der Firma *Shimadzu* (Tokio, J), zum Aufzeichnen der Chromatogramme wurde ein xt-Schreiber SE 120 der Firma *BBC Goertz Metrawatt* (Nürnberg, D) verwendet.

Präparatives System B: Präparative HPLC-Anlage der Firma *Abimed* (Langenfeld, D), bestehend aus den Teilsystemen Pump 321, Detektor UV-VIS 152, Interface 506 C und einem Fraktionssammler Model 202 der Firma *Gilson* (Middleton, USA). Zur Steuerung und Datenverarbeitung wurde Software des Typs *UniPoint* (Version 3.11) der Firma *Gilson* (Middleton, USA) eingesetzt.

Präparatives System C: Präparatives HPLC-System *1100 Series* der Firma *Agilent* (Palo Alto, USA), bestehend folgenden Teilsystemen: Zwei HPLC-Pumpen Modell *G1361A*, einem *G1365B* MWD, sowie einem Fraktionssammler *G1364B*. Als Steuerungs- und Analysesoftware wurde *ChemStation* (Rev. B.01.01 [164]) benutzt.

### *Aminosäureanalyse und Peptidgehaltbestimmung*

Der Peptidgehalt wurde über Messung der Absorption bei 280 nm und Vergleich des gefundenen Werts mit der Absorption von Tyrosin ( $\epsilon_{280} = 1197$ ) bestimmt. Alternativ wurde eine Probe von 50-100 nmol des Peptides in 1 mL 6 N HCl für 48 h bei 110 °C hydrolysiert. Die Aminosäurenverhältnisse wurden mittels eines *LC 6001* Aminosäureanalysators der Firma *Biotronik* (Maintal, D) bestimmt und daraus der Peptidgehalt der Probe errechnet. Alle angegebenen Ausbeuten wurden unter Berücksichtigung des Peptidgehaltes berechnet.

### *Bestimmung der Inhibitions-Konstanten*

Im Fall von humanem Cathepsin B, L und  $\mu$ -Calpain wurde die Freisetzung von AMC mittels eines *SFM-25* Fluorimeters der Firma *Biotek Kontron* bei 380 nm Anregungsfrequenz und 460 nm Emissionsfrequenz in nM/min kontinuierlich verfolgt. Es wurden je vier Küvetten parallel vermessen und digital mit einer selbstprogrammierten Software<sup>[368]</sup> der Gruppe um Machleidt bearbeitet.

Cathepsin B (ungefähr 25 pM) und Cathepsin L (ungefähr 5 pM) wurden in 250 mM Natriumacetat, 2 mM EDTA, 0,015% Brij-35 und 1 mM DTT (direkt vor der Messung zugegeben) bei pH 5,5 mit Z-Phe-Arg-AMC als fluorogenem Substrat (10  $\mu$ M, beziehungsweise 4  $\mu$ M) bei Temperaturen von 30 °C, beziehungsweise 22 °C vermessen.  $\mu$ -Calpain (ungefähr 1-3 nM) wurde in 50 mM Tris/HCl; pH 7,5; 100 mM NaCl und 0,015% Brij-35 vermessen. Direkt vor Beginn der Messung wurde 1 mM DTT zugegeben und Calpain durch Zugabe von 150  $\mu$ M  $\text{CaCl}_2$  aktiviert, als fluorogenes Substrat diente SLY-AMC (500  $\mu$ M). Die Messung erfolgte bei verminderter Temperatur von 12 °C, um die Inaktivierung durch Autolyse zu verlangsamen. Das Gesamtvolumen der Assays betrug je 500  $\mu$ l mit einer Endkonzentration von 1% DMSO.

Nach Präaktivierung der Enzyme wurden die Inhibitoren vorverdünnt in DMSO (Epoxide), beziehungsweise Testpuffer (Calpastatin-Peptide) in 1-5  $\mu$ l bis zu einer Endkonzentration zwischen 1 nM und 100  $\mu$ M entsprechend ihrer Affinität zugegeben. Der Verlauf der Inhibition wurde für weitere 15-60 Minuten verfolgt.

Die Inhibitionskonstanten pseudo-erster Ordnung  $k_{obs}$  wurden für irreversible Epoxid-Inhibitoren und reversible peptidische Inhibitoren durch Anpassung der presteady-state-Daten (prästationärer Zustand) mittels nichtlinearer Regressionsanalyse an die integrierte Form der Morrison-Gleichung<sup>[369]</sup> bestimmt. Für irreversible Epoxid-Inhibitoren wurden die Geschwindigkeitskonstanten pseudo-zweiter Ordnung als  $k_2/K_i = k_{obs}/(60 \times I_t)$  und im Falle reversibler Inhibitoren Geschwindigkeitskonstanten als  $k_{off} = (k_{obs} \times v_s)/v_o$  und  $k_{on} = (k_{obs} - k_{off})/(60 \times I_t)$  und  $K_i = k_{off}/k_{on}$  berechnet. Für schnelle Reaktionen wurden die  $K_i$ -Werte aus den stationären Raten wie für klassische Inhibition bestimmt, falls das Verhältnis Inhibitor / Enzym  $\geq 100$  war. Für den Fall,

dass keine Inhibition beobachtet werden konnte, wurde als  $K_i$ -Wert ein Wert von  $\geq 10$  mal so hoch wie der größten benutzte Inhibitor-Konzentration des Assays entsprechend angenommen. Kinetische Konstanten für Cathepsin L wurden für Substratkompetition zu  $K_i = K_{iapp}/(1+S/K_M)$  um den Faktor 2,38 korrigiert. Im Fall von Cathepsin B und  $\mu$ -Calpain war die Substratkonzentration größer als  $K_M$ . Jede kinetische Konstante wurde aus dem Mittelwert von 5-10 Messungen bei einer Standardabweichung von  $(SD_{n-1}) \leq 10\%$  errechnet.

Die Bestimmung der Konstanten in Bezug auf Cathepsin X wurde an einem Fluorimeter *Safire 2* der Firma *Tecan* durchgeführt. Humanes rekombinantes Cathepsin X wurde mit einer Endkonzentration von 2 nM eingesetzt. Als fluorogenes Substrat diente Abz-FRY(NO<sub>2</sub>) in einer Endkonzentration von 3  $\mu$ M. Die Messungen wurden in folgendem Puffer durchgeführt: 50 mM Natriumcitrat, 200 mM Natriumchlorid, 1 mM EDTA, 2 mM DTT und 3% DMSO bei pH 5.0. Folgende Inhibitorkonzentrationen wurden eingesetzt: 2; 3; 5; 10; 20 und 50  $\mu$ M, im Fall der Valin-, Leucin- und Isoleucinderivate wurden Konzentrationen von 0,2; 0,3; 0,5; 1; 2 und 5  $\mu$ M verwendet.

Die Inhibitionskonstanten in Bezug auf Staphopain A (ScpA) und Staphopain B (SspB) wurden an einem *Smectramax* Fluorimeter der Firma *Molecular Devices* bestimmt. Im Fall von ScpA wurde eine Enzymkonzentration von 50 nM, im Fall von SspB 80 nM eingesetzt. Die Enzyme wurden mit verschiedenen Inhibitorkonzentrationen für jeweils 30 min bei 37 °C inkubiert. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 100  $\mu$ L Azocoll<sup>®</sup>-Suspension (15 mg/mL). Die Färbungsreaktion wurde 30 min bei 37 °C unter Schütteln entwickelt, und anschließend durch Zentrifugation (1 min bei 13200 g, 4 °C) gestoppt. Die Absorption des Überstands wurde bei einer Wellenlänge von 520 nm gemessen und daraus die Inhibitionskonstanten berechnet.

## *Proteinchemische Arbeiten*

Humanes  $\mu$ -Calpain wurde von Frau Dr. Gabrijelcic-Geiger bereitgestellt<sup>[126]</sup>. TLCK-behandeltes Chymotrypsin (C- 3142 Lot 123K7660) wurde von *Sigma* bezogen. Der Gehalt wurde mit 148,2  $\mu$ M angegeben, die Masse mit 25 kDa. Zur Durchmischung der Proben diente ein *Eppendorff Thermomixer comfort*. Proben mit Photoaffinitätspeptiden wurden im offenen *Eppendorff-Reaktionsgefäß* mit einer UV-Lampe Modell *TL-9000* der Firma *CAMAG* bei 245 nm bestrahlt.

PBS-Puffer *instamed PBS Dulbecco w/o Ca<sup>2+</sup> Mg<sup>2+</sup>* wurde als Fertigmischung der *Biochrom AG* verwendet und nach Herstelleranweisung bereitet. *Tricine<sup>®</sup>*, sowie Brij 35 (30% w/w Fertiglösung) wurde von *Sigma diagnostics* bezogen.

Für die Gelelektrophorese wurden Fertiggele *ProGel-Tris-Glycin-Gel 4-20%* der Firma *Anamed* mit einem kontinuierlichen Gradienten von 4-20% Polyacrylamid eingesetzt. Als Spannungsmodul diente das Modell *Blue Power 500* der Firma *Serva*.

Als Molekulargewichtsmarker diente *Blue Ranger<sup>®</sup> Prestained Protein Molecular Weight Marker Mix* (LOT GB 0004 - Myosin 219 kDa, PhosphorylaseB 112 kDa, Rinderserumalbumin 78 kDa, Ovalbumin 49 kDa, Carbonic Anhydrase 32 kDa, Trypsininhibitor 25 kDa, Lysozym 17,5 kDa) der Firma *Pierce*. Gele nach Schagger wurden in einer Proteingelkammer *SE245* der Firma *Hoefler (USA)* prozessiert. Als Molekulargewichtsmarker diente *low Phosphorylase B102* (BSA 78 kDa, Ovalbumin 49,5 kDa, Carbonic Anhydrase 34,2 kDa, Trypsin Inhibitor 28,3 kDa, Lysozym 19,9 kDa) der Firma *Biorad*. Die Färbung von Polyacrylamid-Gelen wurde mit der Färbelösung *Gel Code<sup>®</sup> Blue Stain Reagent* der Firma *Pierce* nach Herstellerangabe in einem *orbital shaker KS 250* der Firma *Janke und Kunkel* bewerkstelligt.

Für die Western Blot-Analyse wurde ein Spannungsmodul, Modell *Blue Power 500* zusammen mit einer Laufkammer *Xcell II Blot Module* und einem *Xcell sure lock* der Firma *Serva* verwendet. Wattman Papier und *blotting pads* wurden, ebenso wie der Transferpuffer von *Invitrogen* bezogen. Der Farbstoff *Fast Green<sup>TM</sup>* zum Anfärben der Nitrozellulosemembranen wurde von der Firma *Sigma* bezogen. *Vectastain ABC Kit* zur Detektion biotinylierter Peptide stammte von der Firma *Vector Laboratories Inc.* Als Positivkontrolle wurde im Western Blot biotyniliertes Anti-Schaf IgG (*H+L*) BA-6000 Lot 1107 1 mg/L der Firma *Vector Laboratories inc.* eingesetzt.

## 5.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften

### 5.2.1 Vorschriften zur Peptidsynthese

Alle Peptidsynthesen erfolgten nach der Fmoc/*t*Bu Schutzgruppenstrategie. Als zu dieser Strategie orthogonale Schutzgruppen kamen außerdem allylische Funktionen zum Einsatz. Das in dieser Arbeit verwendete Standardprotokoll zur Peptidsynthese ist in Tabelle 16 angegeben. Genaue Angaben, wie die Ansatzgrößen, das verwendete Harz und vom Standard abweichende Kupplungsbedingungen sind bei den jeweiligen Syntheseprotokollen angegeben.

**Tabelle 16: Protokoll der Peptidsynthese am polymeren Träger.**

Syntheseschritt	Reagenzien und Lösemittel	Reaktionszeit
Fmoc-Spaltung	20% Piperidin/NMP(v/v)	2 x 5 min und 1 x 10 min
Kupplung	4 Äq. Fmoc-Xaa-OH; 4 Äq. HBTU; 4 Äq. HOBt; 8 Äq. DIEA in DMF in der Reihenfolge der gewünschten Peptidsequenz	2 x 60 min
Abspaltung von Alloc/OAll-Gruppen	1% Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> ; 5 Äq. PhSiH <sub>3</sub> wasserfreies DCM unter Argon-Atmosphäre	3 x 15 min
Seitenketten-Zyklisierung	5 Äq. PyBop; 5 Äq. HOBt; 10 Äq. DIEA	2 x 120 min
N-terminale Acetylierung „Capping“	5% Ac <sub>2</sub> O; 6% 2,6-Lutidin in DMF	2 x 20 min
Abspaltung vom Träger, Entfernen der Seitenketten- Schutzgruppen	TFA/H <sub>2</sub> O/TIPS (90:2,5:2,5 v/v/v)	2 h

Als Seitenketten-Schutzgruppen wurden Trt für Histidin, Asparagin und Glutamin, OtBu für Glutaminsäure und Asparaginsäure, *t*Bu für Serin, Threonin und Tyrosin, Boc für Lysin und Tryptophan und Pbf für Arginin verwendet. Im Falle der Epoxy-peptid-Bibliotheken wurde Arginin als ( $\omega$ ,  $\omega'$ )-Boc geschütztes Derivat verwendet, da sich die terminale Z-Funktion als recht säurelabil erwies und modifizierte Abspaltbedingungen erforderte. Als orthogonale Seitenketten-

Schutzgruppen für die Zyklisierungen wurden Alloc im Fall von Lys, Orn und Dab beziehungsweise OAll im Fall von Glu und Asp verwendet.

Die Aufarbeitung der abgespalteten Peptide erfolgte durch Fällung mit MTB/Hexan (2:1 v/v) und anschließender Zentrifugation, wonach der Überstand verworfen wurde. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels HPLC gereinigt und abschließend lyophilisiert

### *Kaiser-Test*

Die Vollständigkeit von Aminosäurekupplungen primärer Amine kann mit Hilfe des Tests nach Kaiser<sup>[346]</sup> überprüft werden. Zur Durchführung des Kaiser-Tests werden einige Harzkugeln in ein kleines Reagenzglas gegeben und mit jeweils 20 µL folgender Lösungen versetzt:

Lösung I: 1,0 g Ninhydrin in 20 mL Ethanol

Lösung II: 80 g Phenol in 20 mL Ethanol

Lösung III: 0,4 mL 1 mM wässrige KCN-Lösung in 19,6 mL Pyridin

Die Mischung wird in einem Thermostaten für 5 min auf 95 °C erwärmt. Blaufärbung zeigt eine unvollständige Kupplung an, wogegen eine schwach gelbliche Lösung einen vollständigen Kupplungsschritt bestätigt. Gegebenfalls ist die Kupplung zu wiederholen, bis keine Blaufärbung mehr beobachtbar ist.

### *Aufarbeitsverfahren*

Das wässrige Aufarbeiten eines Reaktionsansatzes bezeichnet die Extraktion einer Lösung des Rohproduktes in einem hydrophoben Lösemittel (EE, Diethylether) mit je dreimal 5%iger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung, und/oder 5%iger KHSO<sub>4</sub>-Lösung (im Syntheseprotokoll angegeben), gesättigter Kochsalzlösung und entionisiertem Wasser. Die organische Phase wird anschließend über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, das Trockenmittel abfiltriert und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt.

### *Beladung von Wang-Harzen*

Das Harz wird 10 min in trockenem DCM/DMF (9:1 v/v) gequollen, wonach 4 Äq. Fmoc-Aminosäure und 4 Äq. HOBt in der kleinstmöglichen Menge wasserfreiem DCM/DMF (9:1 v/v) gelöst und zugegeben werden. Nach fünf Minuten werden 4 Äq. DIC und schließlich 0,1 Äq. DMAP in wasserfreiem DMF zugegeben. Die Mischung wird für zwei Stunden bei RT gerührt und die komplette Prozedur einmal wiederholt. Nach mehrmaligem Waschen des Harzes mit DCM/DMF (9:1 v/v) und Trocknen im Vakuum wird die Harzbeladung bestimmt.

### *Bestimmung der Harzbeladung*

Die effektive Beladung des Harzes mit Fmoc-geschützten Aminosäuren kann UV-spektroskopisch bestimmt werden. Hierfür wird eine definierte Menge des zuvor im Vakuum über KOH getrockneten Harzes in einen 10 mL Maßkolben gegeben und mit 1 mL einer frisch bereiteten Mischung aus 20% Piperidin in DMF (v/v) versetzt. Nach 30 min Reaktionszeit wird der Maßkolben mit MeOH auf 10 mL aufgefüllt ( $V_{\text{Maßkolben}}$ ) und die Absorption des bei der Reaktion entstandenen Dibenzofulven-Piperidin-Adduktes ( $\epsilon = 7800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) bei 301 nm ( $A_{301\text{nm}}$ ) bestimmt. Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen-Gesetzes errechnet sich daraus die Beladung des Harzes nach folgender Formel:

$$\text{Beladung} \left[ \frac{\text{mmol}}{\text{g}} \right] = \frac{A_{301\text{nm}}}{7800 \cdot \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1} \cdot D[\text{cm}]} \cdot \frac{V_{\text{Maßkolben}}[\text{ml}]}{m_{\text{Harz}}[\text{g}]}$$

$A_{301\text{nm}}$  = gemessene Absorption bei 301 nm,  $V_{\text{Maßkolben}}$  [mL] = 10 mL;  $m_{\text{Harz}}$  [g] = Menge an eingewogenem Harz;  $7800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} = \epsilon$  des Dibenzofulven-Piperidin-Adduktes;  $D$  [cm] = Schichtdicke der verwendeten Küvette.

## 5.2.2 Proteinchemische Arbeiten mit Photoaffinitätspeptiden

Wasser bezeichnet im Folgenden jeweils Reinstwasser in Millipore-Qualität. Für Experimente mit  $\mu$ -Calpain wurde folgender Puffer verwendet: 20 mM Tris, pH 7,5; 2 mM EDTA; 0,02% Brij 35.  $\text{CaCl}_2$  wurde jeweils direkt vor der Reaktion mit dem entsprechenden Inhibitorpeptid zugegeben. Die Peptide wurden als 25  $\mu\text{M}$  wässrige Stammlösung vorgehalten und auf die Endkonzentration mit Calpain-Puffer verdünnt.

### *Polyacrylamid-Gelelektrophorese*

Es wurden Gele mit kontinuierlichem Gradienten von 4-20% Polyacrylamid verwendet.

Laufpuffer (10x): 30,2 g Tris; 188 g Glycin; 100 mL 10% SDS in Wasser; auf 1 L mit Wasser aufgefüllt. Als Größenstandard wurde *Blue Ranger*<sup>®</sup> der Firma *Pierce* eingesetzt (Myosin 219 kDa, PhosphorylaseB 112 kDa, Rinderserumalbumin 85 kDa, Ovalbumin 49 kDa, Carbonic Anhydrase 32 kDa, Trypsininhibitor 25 kDa, Lysozym 17,5 kDa). Die Laufzeit betrug eine Stunde bei 125 V, 60 mA. Nach der Trennung wurde das Gel dreimal 15 min mit Wasser gewaschen, worauf die Färbung mit *Gel Code*<sup>®</sup> *Blue Stain Reagent* der Firma *Pierce* nach Vorschrift des Herstellers erfolgte. Anschließend wurde mit 200 mL Wasser für 10 min inkubiert.

### *Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Schägger*

Die Trennung von Peptiden kleiner Molekularmassen wurde nach der von Schägger beschriebenen Methode durchgeführt.

Sammelgel: 1,02 mL 30% Acrylamid; 2 mL 3 M Tris/HCl, pH 8,45; 4,82 mL  $\text{H}_2\text{O}$ ; 60  $\mu\text{L}$  10% SDS; 50  $\mu\text{L}$  APS; 10  $\mu\text{L}$  TEMED. Trenngel: 8,25 mL 30% Acrylamid, 5 mL 3M Tris/HCl, pH 8,45; 440  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ ; 150  $\mu\text{L}$  10% SDS; 1,25 mL Glycerol; 50  $\mu\text{L}$  APS; 10  $\mu\text{L}$  TEMED. Anodenpuffer: 0,2 M Tris/HCl, pH 8,9 in Wasser. Kathodenpuffer: 0,1 M Tris/HCl, pH 8,25; 0,1 M Tricine, 0,1% SDS in Wasser. Die Laufzeit betrug 4 h bei 100-120 V. Die Färbung erfolgte analog der für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese beschriebenen Methode

### *Western Blot Analyse*

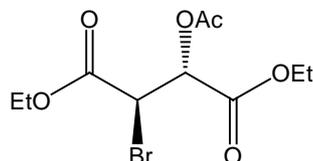
Transferpuffer (25x) 300 mM Tris; 2,4 M Glycin; pH 8,3; 20% MeOH in Wasser. Der Transfer erfolgte innerhalb von 90 min bei einer Spannung von 35 V. Zur Detektion sämtlicher membrangebundener Proteine wurde mit einer Lösung von 0,1% *Fast green* (g/v) in 1% Essigsäure (v/v) 5 min inkubiert, wonach zum Entfärben des Hintergrundes 5 min mit H<sub>2</sub>O gewaschen wurde. Nach der Detektion der Proteinbanden mittels UV-Licht wurde die Membran mit 0,2 M NaOH innerhalb von 5 min entfärbt.

Für die Immunfärbung wurde nach erfolgtem Proteintransfer mit einer Lösung von 5% Magermilchpulver in PBS eine Stunde bei RT inkubiert, um unbelegte Bereiche der Membran abzusättigen. Hiernach wurde mit *Vectastain ABC Kit* (je 2 Tropfen Reagenz A und B auf 10 mL PBS, 0,1% Tween 20 (w/v)) eine Stunde bei RT inkubiert, wonach 2 x 10 min mit PBS gewaschen wurde. Detektionslösung: 200 µL Stammlösung (18,75 mg/mL NBT; 9,4 mg/mL BCIP in 67% DMSO (v/v)) zu 10 ml einer Lösung von 0,1 M Tris in Carbonatpuffer, pH 9,5. Die Membran wurde mit oben angegebener NBT/BCIP-Lösung 15 min bei RT inkubiert, wonach die Färbereaktion durch mehrmaliges Waschen der Membran mit Wasser gestoppt wurde.

## 5.3 Synthesevorschriften

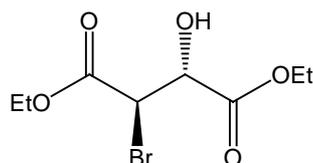
### 5.3.1 Synthese des Ankerbausteins Ep-460

(2R,3R)-2-Acetoxy-3-brombernsteinsäure-diethylester<sup>[333]</sup> (JMP 080)



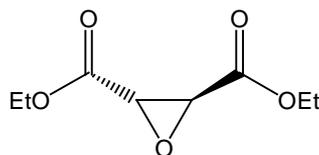
In einem 2 L Rundkolben wurde D-(-)-Weinsäurediethylester (232 g; 1,13 mol) vorgelegt und unter Rühren bei 0 °C 5,7 M HBr in HOAc (590 mL; entspr. 3,38 mol) zutropft. Das Reaktionsgemisch wurde weitere vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend auf 2 kg Eis gegossen. Diese Lösung wurde fünfmal mit MTB extrahiert und die organische Phase fünfmal mit Wasser gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase und Entfernen des MTB wurde HOAc mittels eines HV-Rotationsverdampfers abgetrennt. Um Reste von HOAc zu entfernen, wurden dreimal 100 mL Hexan zugegeben und am Rotationsverdampfer wieder abgetrennt. Ausbeute: 280,2 g (0,90 mol; 79,9%); farbl. Öl – ohne Reinigung weiterverarbeitet.

(2R,3R)-2-Bromo-3-hydroxybernsteinsäure-diethylester<sup>[333]</sup> (JMP 081)



In einem 2 L Rundkolben wurde (2S,3R)-(+)-2-Acetoxy-3-brombernsteinsäure-diethylester (210 g; 672 mmol) in 1,7 L EtOH gelöst. Bei RT wurden 60 mL HBr in HOAc (33%) zugegeben. Nach fünf Stunden Reaktionszeit unter Rühren wurde die Reaktionslösung am Rotationsverdampfer eingengt, überschüssige HOAc am HV-Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt anschließend im Hochvakuum über eine 50 cm Vigreuxkolonne mit silberspiegeltem Vakuum-Mantel destilliert. Ausbeute: 158 g (587 mmol; 87,3%); farbloses Öl; Kp108-115 °C bei 0,18-0,30 mbar; ESI-MS:  $m/z = 269,0$  [M+H<sup>+</sup>];  $M_r = 267,99$  berechnet für C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>O<sub>5</sub><sup>79</sup>Br;  $m/z = 271,0$  [M+H<sup>+</sup>];  $M_r = 269,99$  berechnet für C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>O<sub>5</sub><sup>81</sup>Br.

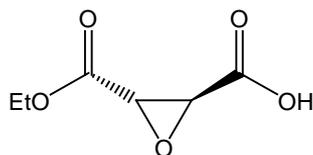
(2S,3S)-Epoxybernsteinsäure-diethylester<sup>[333]</sup> (JMP 082)



Zu (2S,3R)-(+)-2-Hydroxy-3-brombernsteinsäure-diethylester (90,0 g; 0,334 mol) wurden in einem 3 L Dreihalskolben mit KPG-Rührer 1,8 L Aceton und portionsweise  $K_2CO_3$  (277 g; 2,01 mol) gegeben. Bei RT wurde die Mischung fünf Stunden gerührt, anschließend filtriert und am Rotationsverdampfer eingengt. Die erhaltene Flüssigkeit wurde in Essigester aufgenommen und dreimal mit Wasser extrahiert. Die organische Phase wurde getrocknet und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach Kieselgel-Chromatographie mit einem Gradienten PE/EE 8:1  $\rightarrow$  3:1 konnte ein reines Produkt erhalten werden.

Ausbeute: 52,0 g (0,28 mol; 82,6%); blassgelbe Flüssigkeit; homogen in der DC (PE/EE 8:1 [v/v],  $R_f = 0,29$ ); ESI-MS:  $m/z = 189,2 [M+H^+]$ ,  $143,2 [M-EtOH]^+$ ,  $115,2 [M-EtOH, -C\equiv O]^+$ ;  $M_r = 188,18$  berechnet für  $C_8H_{12}O_5$ .

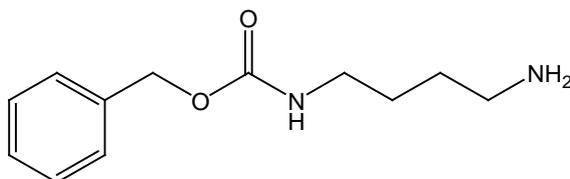
(2S,3S)-2-Epoxybernsteinsäure-monoethylester (JMP 049)



Epoxybernsteinsäure-diethylester (20,1 g; 107 mmol) wurde in einem 2 L Dreihalskolben mit KPG-Rührer in 750 mL EtOH vorgelegt. Bei 0 °C wurden 6,6 g KOH in 50 mL EtOH zugetropft und danach für weitere zwei Stunden gerührt. Hierbei verfärbte sich die Reaktionslösung leicht rosafarben und wurde gelartig. Nach Entfernen des Lösemittels am Rotationsverdampfer wurde das erhaltene Pulver im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 21,17 g Kaliumsalz (107 mmol; quant); blassrosa Pulver; homogen in der DC (*n*BuOH/HOAc/H<sub>2</sub>O/EE 3:1:1:5 [v/v], R<sub>f</sub> = 0,48); ESI-MS: *m/z* = 161,2 [M+H<sup>+</sup>], 321,2 [2M+H<sup>+</sup>]; M<sub>r</sub> = 160,13 berechnet für C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>5</sub> (freie Säure); 198,22 berechnet für C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>O<sub>5</sub>K (Kaliumsalz).

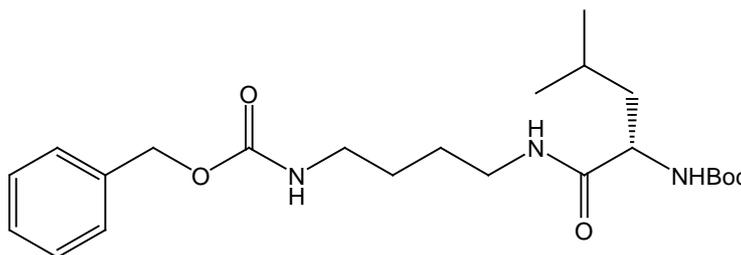
*N*-Benzyloxycarbonyl-1,4-diaminobutan<sup>[334]</sup> (**JMP079**)



In einem 5 L Kolben wurden zu einer Lösung von 1,4-Diaminobutan (139 g; 1,58 mol) in 750 mL Wasser und einigen Tropfen einer Bromkresol-Lösung in EtOH 205 mL Methansulfonsäure (3,16 mmol) bis zum Farbumschlag von Blau nach Gelb und anschließend 2,1 L EtOH zugegeben. Bei RT wurde anschließend Z-Chlorid (200 mL; 1,42 mmol) in 750 mL Dimethoxyethan zugetropft. Hierbei wurde durch wechselweises Zutropfen einer 50%igen Lösung von KOAc in H<sub>2</sub>O der pH konstant gehalten, wobei ein Farbumschlag nach blau unbedingt zu vermeiden war. Nach Zugabe von ca. drei Vierteln der Z-Chlorid Lösung setzte eine Präzipitation des Produkts ein. Die Produktmischung wurde nach Beendigung der Reaktion zunächst filtriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und dreimal mit Benzol extrahiert. Die wässrige Phase wurde daraufhin mit dem vorher gewonnenen Filterkuchen vereinigt, mit NaOH auf pH 12 eingestellt und erneut dreimal mit Benzol extrahiert. Nach Entfernen des Lösemittels am Rotationsverdampfer konnte ein weißes Pulver erhalten werden.

Ausbeute: 178,8 g (0,80 mol; 50,9%); weißes Pulver; homogen in der DC (H<sub>2</sub>O/HOAc/*n*-BuOH/EE 1:1:3:5 [v/v], R<sub>f</sub> = 0,44) und in der analytischen RP-HPLC (t<sub>R</sub> = 1,4 min); ESI-MS: *m/z* = 223,4 [M+H<sup>+</sup>]; M<sub>r</sub> = 222,29 berechnet für C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

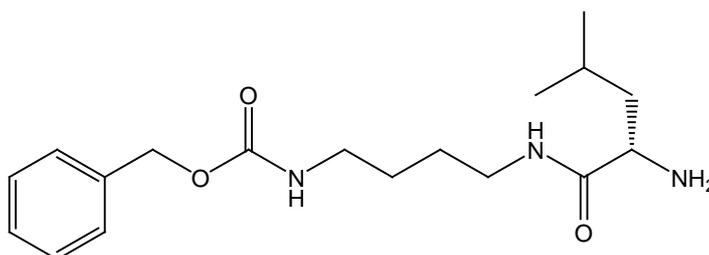
*N*-Benzyloxycarbonyl-*N'*-(*tert*-buthoxycabonyl-leucyl)-1,4-diaminobutan (**JMP050**)



In einem 5 L Kolben wurde zu N-Benzyloxycarbonyl-1,4-Diaminobutan (179 g; 804 mmol) in 3 L Chloroform Boc-Leu-OSu (264 g; 804 mmol) getropft und bei RT vier Stunden gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurden 1-(2-Aminoethyl)-piperazin (27,8 mL; 322 mmol) zugegeben und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Anschließend wurde der Rückstand in EE aufgenommen und es erfolgte eine Extraktion mit wässriger KHSO<sub>4</sub>. Die organische Phase wurde getrocknet und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt, so dass ein gelbes Öl erhalten wurde. Über Nacht konnten aus einer konzentrierten Lösung in EE Kristalle gewonnen werden, die mit PE gewaschen und im Vakuum getrocknet wurden.

Ausbeute: 289 g (663 mmol; 82,5%); weißes Pulver; homogen in der DC (H<sub>2</sub>O/HOAc/*n*-BuOH/EE 1:1:3:5 [v/v], R<sub>f</sub> = 0,94) und in der analytischen RP-HPLC (t<sub>R</sub> = 3,9 min); ESI-MS: *m/z* = 436,4 [M+H<sup>+</sup>], 871,6 [M+2H<sup>+</sup>], 336,4 [-Boc], 380,2 [-CO<sub>2</sub>] M<sub>r</sub> = 435,57 berechnet für C<sub>23</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>.

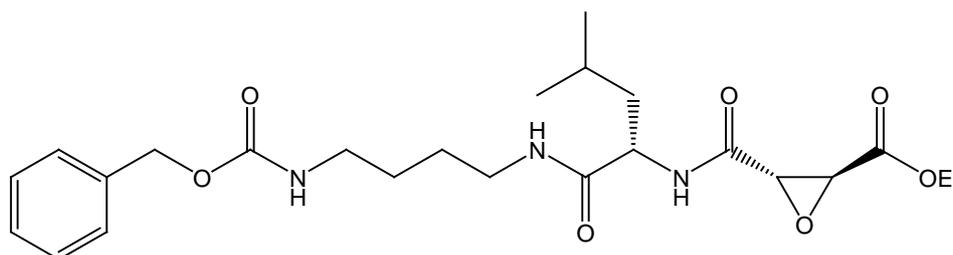
*N*-Benzyloxycarbonyl-*N'*-leucyl-1,4-diaminobutan (JMP052)



In einem 500 mL Kolben wurde *N*-Benzyloxycarbonyl-*N'*-(tert-butoxycabonyl-leucyl)-1,4-Diaminobutan (15,0 g; 34,4 mmol) in 200 mL TFA/H<sub>2</sub>O/TIPS (95:2,5:2,5 v/v) gelöst und bei RT eine Stunde gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung am Rotationsverdampfer eingengt und zweimal hintereinander in 50 mL Toluol aufgenommen und erneut eingengt, um Spuren von Wasser und TFA zu entfernen. Das erhaltene Öl wurde in Essigester gelöst und dreimal mit 10%iger NaOH extrahiert. Die organische Phase wurde getrocknet und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt, wobei ein gelbes Öl erhalten wurde. Nach Lösen in MeOH und Zugabe von DBSI (10,2 g; 34,4 mmol) wurde mit PE/MTB (1:1 v/v) gefällt und das weiße Pulver vom Lösemittel durch Filtration getrennt und zweimal mit PE nachgewaschen.

Ausbeute: 16,09 g (25,4 mmol; 73,8%); weiße Flocken; homogen in der DC (H<sub>2</sub>O/HOAc/*n*-BuOH/EE 1:1:3:5 [v/v], R<sub>f</sub> = 0,31) und in der analytischen RP-HPLC (t<sub>R</sub> = 2,2 min); ESI-MS: *m/z* = 336,2 [M+H<sup>+</sup>]; M<sub>r</sub> = 335,45 berechnet für C<sub>18</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>.

Z-HN-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NH-Leu-[tEps]-OEt (JMP054)

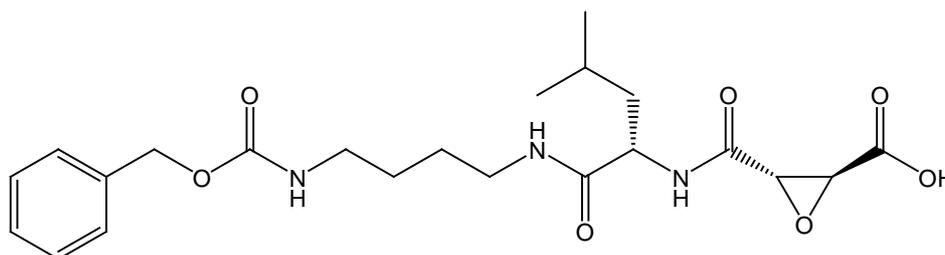


In einem 500 mL Kolben wurden zu einer Lösung von N-Benzylloxycarbonyl-N'-leucyl-1,4-diaminobutan (12,3 g; 76,9 mmol) in 300 mL NMP PyBop (40,0 g; 76,9 mmol) und DIEA (39,5 mL; 230,6 mmol) gegeben. Anschließend wurde unter Rühren bei Raumtemperatur (2*S*,3*S*)-2-Epoxybernsteinsäure-monoethylester (25,8 g; 76,9 mmol) hinzugefügt. Nach 3,5 h (Reaktionskontrolle mittels DC) wurde die Reaktionsmischung am Hochvakuum-Rotationsverdampfer eingeeengt, der Rückstand in Essigester aufgenommen und je dreimal mit KHSO<sub>4</sub>- und NaHCO<sub>3</sub>-Lösung extrahiert. Die organische Phase wurde getrocknet und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt, wobei ein gelbes Öl erhalten wurde. Nach Kieselgel-Chromatographie mit einem Gradienten 3:1 → 4:1 EE/PE (v/v) wurde zunächst ein gelbes Pulver erhalten, das durch Umkristallisieren aus CHCl<sub>3</sub>/MeOH weiter gereinigt wurde.

Ausbeute: 12,23 g (53,7 mmol; 69,8%); weiße Flocken; homogen in der DC (PE/EE 1:1 [v/v], R<sub>f</sub> = 0,26) und in der analytischen RP-HPLC (t<sub>R</sub> = 3,3 min); ESI-MS: *m/z* = 478,2 [M+H<sup>+</sup>]; M<sub>r</sub> = 477,56 berechnet für C<sub>24</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>;

<sup>1</sup>H NMR (D<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ 0,83 (d, *J* = 6,5 Hz, 3H); δ 0,87 (d, *J* = 6,5 Hz, 3H); δ 1,22 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H); δ 1,33-1,40 (m, 4H); δ 1,41-1,48 (m, 2H); δ 1,48-1,59 (m, 1H); δ 2,94-3,09 (m, 4H); δ 3,58 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H); δ 3,71 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H); δ 4,13-4,22 (m, 2H); δ 4,26-4,33 (m, 1H); δ 4,99 (s, 2H); δ 7,21 (t, *J* = 5,4 Hz, 1H); δ 7,26-7,38 (m, 5H); δ 8,04 (t, *J* = 5,5 Hz, 1H); δ 8,56 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H).

Z-HN-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NH-Leu-[tEps]-OH (JMP061 = EP460)

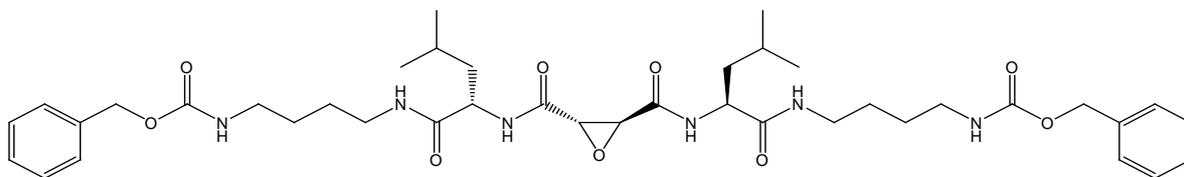


In einem 1 L Kolben wurde Z-HN-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NH-Leu-[tEps]-OEt (12,0 g; 25,13 mmol) in 500 mL Dioxan gelöst und KOH (11,41 g; 25,13 mmol) in 250 mL Wasser bei RT unter Rühren zugetropft. Nach 2,5 Stunden wurde das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt und das erhaltene Pulver im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 12,25 g Kaliumsalz (25,13 mmol; quant); weißes Pulver; homogen in der DC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/HOAc 8:8:1 [v/v], R<sub>f</sub> = 0,74) und in der analytischen RP-HPLC (t<sub>R</sub> = 2,8 min); ESI-MS: m/z = 450,2 [M+H<sup>+</sup>], 899,4 [M+2H<sup>+</sup>]; M<sub>r</sub> = 449,51 berechnet für C<sub>22</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub> (freie Säure); 487,50 berechnet für C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>K (Kaliumsalz);

<sup>1</sup>H NMR (D<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ 0,83 (d, J = 6,7 Hz, 3H); δ 0,87 (d, J = 6,7 Hz, 3H); δ 1,33-1,40 (m, 4H); δ 1,40-1,48 (m, 2H); δ 1,49-1,59 (m, 1H); δ 2,90-3,07 (m, 4H); δ 3,03 (d, J = 1,6 Hz, 1H); δ 3,35 (d, J = 1,6 Hz, 1H); δ 4,25-4,32 (m, 1H); δ 4,99 (s, 2H); δ 7,21 (t, J = 5,6 Hz, 1H); δ 7,26-7,38 (m, 5H); δ 8,04 (t, J = 5,6 Hz, 1H); δ 8,50 (d, J = 8,3 Hz, 1H).

Z-HN-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NH-Leu-[tEps]-Leu-HN-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NH-Z (JMP112)

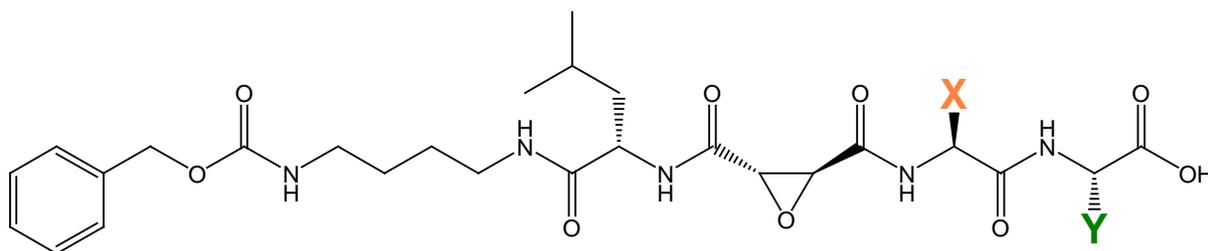


In einem 5 mL Kolben wurden Z-HN-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NH-Leu-[tEps]-OH, Kaliumsalz (363 mg; 0,75 mmol) und N-Benzyloxycarbonyl-N'-leucyl-1,4-diaminobutan (250 mg; 0,75 mmol) in 15 mL DMF/DCM 9:1 (v/v) gelöst, worauf HOBt (100 mg; 0,75 mmol) und HBTU (281 mg; 0,75 mmol) zugegeben wurden. Nach 2 Stunden bei RT unter Rühren wurde das Lösemittel am HV-Rotationsverdampfer entfernt und das erhaltene Öl in Essigester aufgenommen und je dreimal mit KHSO<sub>4</sub>-Lösung extrahiert. Die organische Phase wurde getrocknet und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt, wobei ein weißes Gel erhalten wurde, dass im Vakuum getrocknet wurde.

Ausbeute: 422 mg (0,55 mmol; 73,4%); weißes Pulver; homogen in der DC (H<sub>2</sub>O/HOAc/n-BuOH/EE 1:1:3:5 [v/v], R<sub>f</sub> = 0,95); ESI-MS: *m/z* = 767,6 [M+H<sup>+</sup>]; M<sub>r</sub> = 766,43, berechnet für C<sub>40</sub>H<sub>58</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub>.

### 5.3.2 Synthesen der P'-Bibliotheken

#### Bibliotheken für Cathepsine und Calpain - P1'- Sonden



Zur Beladung mit der Aminosäure Y wurde Wang-Harz (10 g, 8,9 mmol; 0,89 mmol/g) im 250 mL Rührreaktor bei Raumtemperatur in 120 mL wasserfreiem Lösemittel DMF/DCM 9:1 (v/v) suspendiert und unter Rühren 10 min gequollen. Anschließend wurden eine isokinetischen Mischung von Fmoc-Aminosäuren (15,69 g, 35,6 mmol, siehe Tabelle 17) und HOBt (35,6 mmol; 4,81 g) in der kleinstmöglichen Menge DMF/DCM gelöst und zum suspendierten Harz gegeben. Nach fünf Minuten wurden DIC (5,5 mL; 35,6 mmol) und DMAP (109 mg; 0,89 mmol) in 1 mL DMF/DCM zugegeben und die gesamte Mischung für drei Stunden gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde drei mal für je 10 min mit 100 mL einer DMF/DCM Mischung 9:1 (v/v), dann drei mal 10 min mit 100 mL DCM und abschließend 5 min mit 100 mL *i*PrOH, 5 min mit 100 mL Et<sub>2</sub>O gewaschen und das Harz im Vakuum getrocknet. Im Anschluss wurden nicht beladene OH-Gruppen des Harzes drei mal für je 15 min mit 100 mL einer Mischung von 5% Ac<sub>2</sub>O und 6% 2,6-Lutidin in DMF (v/v) blockiert (*capping*). Nach erneutem Waschen und trocknen des Harzes im Vakuum wurde die Beladung bestimmt (siehe allgemeine Arbeitsvorschriften), wobei ein Wert von 0,28 mmol/g ermittelt wurde.

Zur Kupplung der Aminosäure X wurden je 265 mg (entsprechend 75 μmol) des im ersten Schritt mit isokinetischer Aminosäuremischung beladenen Harzes in 5 mL-Einmalspritzen mit Fritte eingewogen, mit 2,5 mL DMF für 10 min gequollen und das Lösemittel im Anschluss entfernt. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppen erfolgte analog der allgemeinen Arbeitsvorschriften. Daraufhin wurden je 0,3 mmol (Einwaage siehe Tabelle 17) Fmoc-Aminosäure, HOBt (46 mg; 0,3 mmol), HBTU (114 mg; 0,3 mmol) und DIEA (51 μL; 0,3 mmol) in 2 mL DMF zugegeben und die Reaktionsmischung für 2 Stunden gerührt. Nach Entfernen der Mischung und

Waschen des Harzes (einmal 5 min mit DMF) wurde die Kupplungsprozedur noch einmal wiederholt. Abschließend wurde das Harz je drei mal für 10 min mit je 2,5 mL DMF, dann DCM, dann je einmal für 5 min mit je 2,5 mL *i*PrOH und Et<sub>2</sub>O gewaschen und im Wasserstrahlvakuum getrocknet. Die Vollständigkeit der Kupplung wurde mittels Kaiser-Test ermittelt. Im Falle unvollständiger Kupplung wurde die oben beschriebene Prozedur wiederholt.

**Tabelle 17: Isokinetische Mischung und Einwaagen für die Harzsynthese der P'-Bibliotheken**

Aminosäure	Molmasse [g/mol]	mol% für isokin. Mischung	Einwaage [mg]	
			für 35,6 mmol isokinetische Mischung	0,3 mmol pro Einzelkupplung
Fmoc-Ala-OH • H <sub>2</sub> O	329,3	3,4	399	98,79
Fmoc-Arg(Boc) <sub>2</sub> -OH	596,7	6,5	1381	179,01
Fmoc-Asn(Trt)-OH	596,7	5,3	1125	179,01
Fmoc-Asp(O <i>t</i> Bu)-OH	411,5	3,5	513	123,45
Fmoc-Glu(O <i>t</i> Bu)-OH	425,5	3,6	545	127,65
Fmoc-Gln(Trt)-OH	610,7	5,3	1153	183,21
Fmoc-Gly-OH	297,3	2,9	306	89,19
Fmoc-His(Trt)-OH	619,7	3,5	773	185,91
Fmoc-Ile-OH	353,4	17,4	2189	106,02
Fmoc-Leu-OH	353,4	4,9	616	106,02
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468,5	6,2	1032	140,55
Fmoc-Nle-OH	353,3	3,8	477	105,99
Fmoc-Phe-OH	387,4	2,5	345	116,22
Fmoc-Pro-OH	337,4	4,3	516	101,22
Fmoc-Ser( <i>t</i> Bu)-OH	383,4	2,8	381	115,02
Fmoc-Thr( <i>t</i> Bu)-OH	397,5	4,8	680	119,25
Fmoc-Trp(Boc)-OH	526,6	3,8	712	157,98
Fmoc-Tyr( <i>t</i> Bu)-OH	459,6	4,1	669	137,88
Fmoc-Val-OH	339,4	11,3	1367	101,82

Zur abschließenden Kupplung des Anker-Bausteins wurden die je 265 mg (entsprechend 75 µmol) Harz aus dem zweiten Kupplungsschritt mit 2,5 mL DMF für 10 min gequollen und das Lösemittel im Anschluss entfernt. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppen erfolgte analog der allgemeinen Arbeitsvorschriften. Daraufhin wurde jeweils das Kaliumsalz des Anker-Bausteins **JMP061** (je 73 mg; 150 µmol), HOBt (23 mg; 150 µmol) und HBTU (57 mg; 150 µmol) zugegeben und die Reaktionsmischung für 2 Stunden gerührt. Nach Entfernen der

Mischung und Waschen des Harzes (einmal 5 min mit DMF) wurde die Kupplungsprozedur noch einmal wiederholt. Abschließend wurde das Harz je drei mal für 10 min mit je 2,5 mL DMF, dann DCM, dann je einmal für 5 min mit je 2,5 mL *i*PrOH und Et<sub>2</sub>O gewaschen und im Wasserstrahlvakuum getrocknet. Die Vollständigkeit der Kupplung wurde mittels Kaiser-Test überprüft. Im Falle unvollständiger Kupplung wurde die oben beschriebene Prozedur wiederholt.

Die Abspaltung der Peptidbibliotheken vom Harz wurde mit einer Lösung von 20% TFA in DCM mit einer Zugabe von je 2,5% doppelt deionisiertem Wasser und TIPS bewerkstelligt. Die Abspaltzeit betrug 2 Stunden, wonach das Lösemittel aus den erhaltenen Lösungen am Vakuum entfernt wurde. Je zweimal wurde der Rückstand mit Toluol und Hexan aufgeschlämmt und das Lösemittel erneut am Vakuum entfernt. Schließlich wurde das erhaltene Rohprodukt in möglichst wenig *i*PrOH aufgenommen und zur Fällung in eine eiskalte Mischung von 50 mL PE/MTB 2:1 (v/v) eingetrofft. Die erhaltenen Produkte wurden in *t*BuOH/H<sub>2</sub>O 4:1 (v/v) aufgenommen und mittels einer Gefriertrocknungsanlage getrocknet.

Beladung des Harzes mit isokinetischer Mischung: 0,28 mmol/g

Ausbeute: Durchschnittlich 25 mg (36,4 µmol; 49%, bezogen auf die Harzbeladung bei einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 686 g/mol je Peptid; weißes Pulver)

### Bibliotheken für Cathepsine und Calpain – P2'-Sonden

Es wurden siebzehn Portionen zu je 75  $\mu\text{mol}$  TCP-Harz (jeweils mit Aminosäure Y vorbeladen; 0,6 - 0,82 mmol/g) in Einmalspritzen mit Fritten eingewogen. Im Fall von Prolin wurden 75  $\mu\text{mol}$  eines vorbeladenen 2-Chlorotrityl-Harzes eingesetzt, für Norleucin wurde ein Wang-Harz analog der für die P1'-Bibliotheken beschriebenen Vorschrift mit Fmoc-Nle-OH beladen. Nach Quellen mit je 2,5 mL DMF für 10 min und Entfernen des Lösemittels wurde Fmoc abgespalten. Je nach Bibliothek folgte die Kupplung der Aminosäure X = Glycin, Leucin, Norleucin oder Alanin für alle neunzehn Portionen analog zu der für die P1'-Bibliotheken angewendeten Prozedur. Die abschließende Kupplung des Anker-Bausteins wurde ebenso wie Abspaltung und Trocknung analog der für die P1'-Bibliotheken beschriebenen Prozedur durchgeführt. Für die besonders hydrophoben Peptide (Y = Leu, Ala, Phe, Gly, Ile, Trp, Nle, Pro) erfolgte die Fällung der Produkte direkt aus der Spalllösung ohne weitere Zwischenschritte. Die Mehrzahl der Produkte konnte ohne Aufreinigung verwendet werden, einige Peptide mussten mittels präparativer RP-HPLC gereinigt werden.

**Tabelle 18: Molekülmassen der P2'-Bibliotheken. Molekülstruktur siehe Seite 136.**

<b>X</b>	<b>Y</b>	Molmasse gemessen [M+H <sup>+</sup> ]	Molmasse berechnet
<b>Gly</b>	Ala	578,4	577,62
	Arg	663,4	662,73
	Asn	621,4	620,65
	Asp	622,4	621,63
	Gln	635,4	634,67
	Glu	636,4	635,66
	Gly	564,6	563,6
	His	644,6	643,68
	Ile	620,6	619,7
	Leu	620,6	619,7
	Lys	635,4	634,72
	Nle	620,6	619,7
	Phe	654,6	653,72
	Pro	604,4	603,66
	Ser	594,4	593,62
	Thr	608,4	607,65
	Trp	693,6	692,76
Tyr	670,6	669,72	
Val	606,4	605,68	

**Tabelle 19: Molekülmassen der P2'-Bibliotheken. Molekülstruktur siehe Seite 136.**

<b>X</b>	<b>Y</b>	Molmasse gemessen [M+H <sup>+</sup> ]	Molmasse berechnet
<b>Ala</b>	Ala	592,2	591,64
	Arg	677,6	676,75
	Asn	635,4	634,67
	Asp	636,4	635,65
	Gln	649,6	648,69
	Glu	650,6	649,68
	Gly	578,4	577,62
	His	658,4	657,7
	Ile	634,6	633,72
	Leu	634,6	633,72
	Lys	649,6	648,74
	Nle	634,6	633,72
	Phe	668,6	667,74
	Pro	618,4	617,68
	Ser	608,4	607,64
	Thr	622,6	621,67
	Trp	707,6	706,78
Tyr	684,4	683,74	
Val	620,6	619,7	

**Tabelle 20: Molekülmassen der P2'-Bibliotheken. Molekülstruktur siehe Seite 136.**

<b>X</b>	<b>Y</b>	Molmasse gemessen [M+H <sup>+</sup> ]	Molmasse berechnet
<b>Leu</b>	Ala	634,4	633,72
	Arg	719,6	718,83
	Asn	677,4	676,75
	Asp	678,4	677,73
	Gln	691,4	690,77
	Glu	692,4	691,76
	Gly	620,4	619,7
	His	700,6	699,78
	Ile	676,4	675,8
	Leu	676,4	675,8
	Lys	691,6	690,82
	Nle	676,4	675,8
	Phe	710,4	709,82
	Pro	660,4	659,76
	Ser	650,4	649,72
	Thr	664,4	663,75
	Trp	749,6	748,86
Tyr	726,4	725,82	
Val	662,4	661,78	

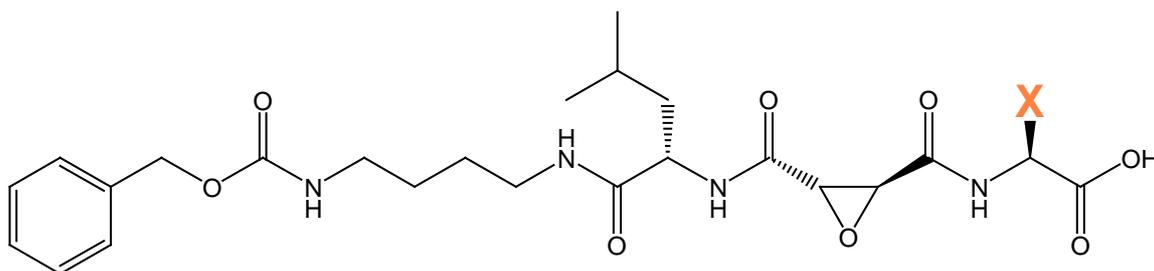
**Tabelle 21: Molekülmassen der P2'-Bibliotheken. Molekülstruktur siehe Seite 136.**

<b>X</b>	<b>Y</b>	Molmasse gemessen [M+H <sup>+</sup> ]	Molmasse berechnet
<b>Nle</b>	Ala	634,6	633,72
	Arg	719,6	718,83
	Asn	677,6	676,75
	Asp	678,4	677,73
	Gln	691,6	690,77
	Glu	692,6	691,76
	Gly	620,6	619,7
	His	700,6	699,78
	Ile	676,6	675,8
	Leu	676,6	675,8
	Lys	691,6	690,82
	Nle	676,4	675,8
	Phe	710,6	709,82
	Pro	660,4	659,76
	Ser	650,6	649,72
	Thr	664,4	663,75
	Trp	749,8	748,86
Tyr	726,6	725,82	
Val	662,6	661,78	

**Tabelle 22: Inhibitionskonstanten zweiter Ordnung für die P2'-Bibliotheken. Werte sind als  $k_2/K_i$  [ $M^{-1}s^{-1}$ ] angegeben. Zum Vergleich sind jeweils die Werte für die Ankerfunktion, sowie die entsprechende P1'-Bibliothek aufgeführt.**

	<b><math>\mu</math>-Calpain P1' = Ala</b>	<b>Cathepsin B P1' = Ala</b>	<b>Cathepsin B P1' = Leu</b>	<b>Cathepsin L P1' = Leu</b>
Anker	10570 $\pm$ 703	108600 $\pm$ 9100	108600 $\pm$ 9100	39806 $\pm$ 4233
P1'-Bib	1160 $\pm$ 103	1,52 $\cdot$ 10 <sup>6</sup> $\pm$ 1,64 $\cdot$ 10 <sup>5</sup>	1,15 $\cdot$ 10 <sup>7</sup> $\pm$ 3,90 $\cdot$ 10 <sup>5</sup>	75906 $\pm$ 7420
Ala	26,9 $\pm$ 1,53	13900 $\pm$ 1270	1,75 $\cdot$ 10 <sup>7</sup> $\pm$ 2,43 $\cdot$ 10 <sup>6</sup>	9490 $\pm$ 678
Arg	3,4 $\pm$ 0,64	18400 $\pm$ 375	663000 $\pm$ 21800	10380 $\pm$ 528
Asn	36,8 $\pm$ 0,93	77900 $\pm$ 6420	2,6 $\cdot$ 10 <sup>6</sup> $\pm$ 1,03 $\cdot$ 10 <sup>5</sup>	12880 $\pm$ 1170
Asp	30,6 $\pm$ 0,49	103000 $\pm$ 21300	6,39 $\cdot$ 10 <sup>6</sup> $\pm$ 3,49 $\cdot$ 10 <sup>5</sup>	2360 $\pm$ 141
Gln	21 $\pm$ 2,2	168000 $\pm$ 2610	8380 $\pm$ 547	6,85 $\cdot$ 10 <sup>6</sup> $\pm$ 4,66 $\cdot$ 10 <sup>5</sup>
Glu	19 $\pm$ 1,6	101000 $\pm$ 10700	3,17 $\cdot$ 10 <sup>6</sup> $\pm$ 2,76 $\cdot$ 10 <sup>5</sup>	7660 $\pm$ 766
Gly	20,8 $\pm$ 2,5	71000 $\pm$ 7220	2,89 $\cdot$ 10 <sup>6</sup> $\pm$ 2,01 $\cdot$ 10 <sup>5</sup>	3960 $\pm$ 369
His	10,4 $\pm$ 0,89	12660 $\pm$ 469	1,09 $\cdot$ 10 <sup>6</sup> $\pm$ 1,90 $\cdot$ 10 <sup>5</sup>	2720 $\pm$ 331
Leu	14,9 $\pm$ 1,5	226000 $\pm$ 25400	6,42 $\cdot$ 10 <sup>6</sup> $\pm$ 6,00 $\cdot$ 10 <sup>5</sup>	484000 $\pm$ 76300
Lys	47,3 $\pm$ 4,5	85900 $\pm$ 10500	1,53 $\cdot$ 10 <sup>6</sup> $\pm$ 1,24 $\cdot$ 10 <sup>5</sup>	81600 $\pm$ 9900
Ile	23,8 $\pm$ 2,7	4,47 $\cdot$ 10 <sup>6</sup> $\pm$ 3,27 $\cdot$ 10 <sup>5</sup>	2,17 $\cdot$ 10 <sup>7</sup> $\pm$ 2,75 $\cdot$ 10 <sup>6</sup>	242000 $\pm$ 20400
Nle	4 $\pm$ 0,28	699000 $\pm$ 6350	1,58 $\cdot$ 10 <sup>7</sup> $\pm$ 2,79 $\cdot$ 10 <sup>6</sup>	88600 $\pm$ 9650
Phe	42,2 $\pm$ 2	1,93 $\cdot$ 10 <sup>6</sup> $\pm$ 1,34 $\cdot$ 10 <sup>5</sup>	1,93 $\cdot$ 10 <sup>7</sup> $\pm$ 1,72 $\cdot$ 10 <sup>6</sup>	29300 $\pm$ 1540
Pro	17,1 $\pm$ 1,34	480000 $\pm$ 35300	4380 $\pm$ 357	5,22 $\cdot$ 10 <sup>6</sup> $\pm$ 7,93 $\cdot$ 10 <sup>5</sup>
Ser	0,38 $\pm$ 0,02	412000 $\pm$ 50000	1,33 $\cdot$ 10 <sup>7</sup> $\pm$ 1,81 $\cdot$ 10 <sup>6</sup>	5130 $\pm$ 473
Thr	85,4 $\pm$ 8,6	1,06 $\cdot$ 10 <sup>6</sup> $\pm$ 1,70 $\cdot$ 10 <sup>5</sup>	7,2 $\cdot$ 10 <sup>6</sup> $\pm$ 7,16 $\cdot$ 10 <sup>5</sup>	11900 $\pm$ 434
Trp	92,2 $\pm$ 9,1	1,13 $\cdot$ 10 <sup>7</sup> $\pm$ 2,94 $\cdot$ 10 <sup>6</sup>	2,54 $\cdot$ 10 <sup>7</sup> $\pm$ 6,97 $\cdot$ 10 <sup>6</sup>	8650 $\pm$ 686
Tyr	31,1 $\pm$ 3,9	4,11 $\cdot$ 10 <sup>6</sup> $\pm$ 4,46 $\cdot$ 10 <sup>5</sup>	1,92 $\cdot$ 10 <sup>7</sup> $\pm$ 4,4 $\cdot$ 10 <sup>6</sup>	8920 $\pm$ 690
Val	16,5 $\pm$ 1,5	1,7 $\cdot$ 10 <sup>6</sup> $\pm$ 1,36 $\cdot$ 10 <sup>5</sup>	2,1 $\cdot$ 10 <sup>7</sup> $\pm$ 5,02 $\cdot$ 10 <sup>6</sup>	119000 $\pm$ 8020

### P1'-Bibliothek für Cathepsin X



Es wurden sechzehn Portionen zu je 75  $\mu\text{mol}$  TCP-Harz (mit der jeweiligen Aminosäure Y vorbeladen; 0,6 - 0,82 mmol/g) in Einmalspritzen mit Fritten eingewogen. Im Fall der Aminosäure Prolin wurden 75  $\mu\text{mol}$  eines vorbeladenen 2-Chlorotrityl-Harzes eingesetzt, für Norleucin wurde ein Wang-Harz analog der für die P1'-Bibliotheken beschriebenen Vorschrift mit Fmoc-Nle-OH beladen. Für Arginin wurde in Ermangelung eines geeigneten vorbeladenen Harzes und aufgrund von Schwierigkeiten bei der Abspaltung eines mit Arginin beladenen Wang-Harzes ein 2-Chlorotrityl-Harz beladen. Hierzu wurden das Harz (200 mg; entsprechend 0,18 mmol bei einer Beladung von 0,9 mmol/g) in 10 mL wasserfreiem Lösemittel DMF/DCM - 9:1 (v/v) suspendiert und bei Raumtemperatur unter Schutzgasatmosphäre unter Rühren 10 min quellen lassen. Anschließend wurden Fmoc-Arg(Boc)<sub>2</sub>-OH (161 mg; 0,27 mmol) und DIEA (77  $\mu\text{L}$ ; 0,45 mmol) in der kleinstmöglichen Menge DMF/DCM gelöst und zum suspendierten Harz gegeben. Nach zwei Stunden wurde drei mal für je 10 min mit 10 mL einer DMF/DCM Mischung 9:1 (v/v), dann drei mal 10 min mit 10 mL DCM und abschließend 5 min mit 10 mL *i*PrOH, 5 min mit 10 mL Et<sub>2</sub>O gewaschen und das Harz im Vakuum getrocknet. Im Anschluss wurden nicht beladene OH-Gruppen des Harzes mit 1 mL MeOH und 0,2 mL DIEA in 10 mL DMF bei einer Reaktionszeit von 30 min abgesättigt (*capping*). Nach erneutem Waschen und trocknen des Harzes im Vakuum wurde die Beladung bestimmt (siehe allgemeine Arbeitsvorschriften), wobei ein Wert von 0,43 mmol/g ermittelt wurde.

Nach Quellen mit je 2,5 mL DMF für 10 min und Entfernen des Lösemittels wurden die Fmoc-Schutzgruppen analog der allgemeinen Arbeitsvorschriften abgespalten. Die abschließende Kupplung des Anker-Bausteins wurde ebenso wie die Abspaltung und Trocknung der Produkte analog der für die P1'-Bibliotheken beschriebenen Prozedur

durchgeführt. Für die besonders hydrophoben Peptide (X = Leu, Ala, Phe, Gly, Ile, Trp, Nle, Pro) erfolgte die Fällung der Produkte direkt aus der Spatlösung ohne weitere Zwischenschritte. Die Mehrzahl der Produkte konnte ohne weitere Aufreinigung verwendet werden, einige der Peptide mussten jedoch zuvor mittels präparativer RP-HPLC gereinigt werden.

**Tabelle 23: Molekülmassen der P1'-Bibliotheken für Cathepsin X.**

<b>X</b>	Molmasse gemessen [M+H <sup>+</sup> ]	Molmasse berechnet
Ala	521,4	520,57
Arg	606,4	605,68
Asn	564,4	563,6
Asp	565,4	564,58
Gln	578,4	577,62
Glu	579,4	578,61
Gly	507,4	506,55
His	587,4	586,63
Ile	563,6	562,65
Leu	563,6	562,65
Lys	578,4	577,67
Nle	563,6	562,65
Phe	597,4	596,67
Pro	547,4	546,61
Ser	537,4	536,57
Thr	551,4	550,6
Trp	636,4	635,71
Tyr	613,4	612,67
Val	549,4	548,63

### 5.3.3 Synthesen der CP1B-Peptide:

Die Peptide wurden den allgemeinen Arbeitsvorschriften folgend dargestellt. Im Weiteren sind detaillierte Syntheseprotokolle der CP1B-Derivate angegeben:

Die Peptide wurden sämtlich am automatisierten Peptidsynthesizer hergestellt. Hierzu wurden jeweils 0,1 mmol Rink-Amid-Harz eingewogen. Die abschließende Acetylierung wurde in einer Einmal-Spritze mit einer Lösung von 5% Ac<sub>2</sub>O und 6% 2,4-Lutidin in DMF durchgeführt. Die Abspaltung und Fällung wurde unter den im allgemeinen Syntheseteil angegebenen Bedingungen vorgenommen. Abschließend wurden die Peptide mittels analytischer RP-HPLC gereinigt und gefriergetrocknet.

Im Fall des retro-inverso-Peptids wurden ausnahmslos D-Aminosäuren eingesetzt.

#### Lineare verkürzte CP1B Peptide

**retro-inverso = Ac-ALLERYKPPITVERKGGLEEIYTSSMPD-NH<sub>2</sub>**

Ausbeute: 98 mg (48 μmol; 48%); weißes Pulver; homogen in der analytischen RP-HPLC (t<sub>R</sub> = 2,3 min); ESI-MS: m/z = 1205,0 [M+2H<sup>+</sup>], 803,6 [M+3H<sup>+</sup>], 603,0 [M+4H<sup>+</sup>]; M<sub>r</sub> = 2407,77 berechnet für C<sub>108</sub>H<sub>175</sub>N<sub>29</sub>O<sub>33</sub>.

**N-Term = Ac-DPMSSTYIEELGK-NH<sub>2</sub>**

Ausbeute: 109 mg (72 μmol; 72%); weißes Pulver; homogen in der analytischen RP-HPLC (t<sub>R</sub> = 2,0 min); ESI-MS: m/z = 1511,8 [M+H<sup>+</sup>], 756,2 [M+2H<sup>+</sup>]; M<sub>r</sub> = 1510,7 berechnet für C<sub>65</sub>H<sub>103</sub>N<sub>15</sub>O<sub>24</sub>.

**C-Term = Ac-REVTIPPKYRELLA-NH<sub>2</sub>**

Ausbeute: 134 mg (78 μmol; 78%); weißes Pulver; homogen in der analytischen RP-HPLC (t<sub>R</sub> = 1,8 min); ESI-MS: m/z = 1727,4 [M+H<sup>+</sup>], 864,0 [M+2H<sup>+</sup>], 576,2,0 [M+3H<sup>+</sup>]; M<sub>r</sub> = 1726,07 berechnet für C<sub>79</sub>H<sub>132</sub>N<sub>22</sub>O<sub>21</sub>.

**N-5 = Ac-TYIEELGKREVTIPPKYRELLA-NH<sub>2</sub>**

Ausbeute: 183 mg (69 μmol; 69%); weißes Pulver; homogen in der analytischen RP-HPLC (t<sub>R</sub> = 2,1 min); ESI-MS: m/z = 1330,8 [M+2H<sup>+</sup>], 887,4 [M+3H<sup>+</sup>], 666,0 [M+4H<sup>+</sup>]; M<sub>r</sub> = 2660,13 berechnet für C<sub>122</sub>H<sub>199</sub>N<sub>31</sub>O<sub>35</sub>.

**N-3 = Ac-SSTYIEELGKREVTIPPKYRELLA-NH<sub>2</sub>**

Ausbeute: 164 mg (58 µmol; 58%); weißes Pulver; homogen in der analytischen RP-HPLC ( $t_R = 2,1$  min); ESI-MS:  $m/z = 1418,0$  [M+2H<sup>+</sup>], 945,8 [M+3H<sup>+</sup>], 709,4 [M+4H<sup>+</sup>];  $M_r = 2834,29$  berechnet für C<sub>128</sub>H<sub>209</sub>N<sub>33</sub>O<sub>39</sub>.

**C-2 = Ac-DPMSSTYIEELGKREVTIPPKYREL-NH<sub>2</sub>**

Ausbeute: 197 mg (66 µmol; 66%); weißes Pulver; homogen in der analytischen RP-HPLC ( $t_R = 2,0$  min); ESI-MS:  $m/z = 1498,0$  [M+2H<sup>+</sup>], 998,4 [M+3H<sup>+</sup>], 748,8 [M+4H<sup>+</sup>];  $M_r = 2993,39$  berechnet für C<sub>133</sub>H<sub>214</sub>N<sub>34</sub>O<sub>42</sub>S.

**C-4 = Ac-DPMSSTYIEELGKREVTIPPKYR-NH<sub>2</sub>**

Ausbeute: 195 mg (71 µmol; 71%); weißes Pulver; homogen in der analytischen RP-HPLC ( $t_R = 1,9$  min); ESI-MS:  $m/z = 1376,4$  [M+2H<sup>+</sup>], 918,0 [M+3H<sup>+</sup>], 688,6 [M+4H<sup>+</sup>];  $M_r = 2751,18$  berechnet für C<sub>122</sub>H<sub>196</sub>N<sub>32</sub>O<sub>38</sub>S.

**N-5, C-4 = Ac-TYIEELGKREVTIPPKYR-NH<sub>2</sub>**

Ausbeute: 148 mg (66 µmol; 66%); weißes Pulver; homogen in der analytischen RP-HPLC ( $t_R = 1,8$  min); ESI-MS:  $m/z = 1117,6$  [M+2H<sup>+</sup>], 745,4 [M+3H<sup>+</sup>], 559,4 [M+4H<sup>+</sup>];  $M_r = 2233,62$  berechnet für C<sub>102</sub>H<sub>165</sub>N<sub>27</sub>O<sub>29</sub>.

**N-3, C-4 = Ac-SSTYIEELGKREVTIPPKYR-NH<sub>2</sub>**

Ausbeute: 180 mg (75 µmol; 75%); weißes Pulver; homogen in der analytischen RP-HPLC ( $t_R = 1,8$  min); ESI-MS:  $m/z = 1204,8$  [M+2H<sup>+</sup>], 803,4 [M+3H<sup>+</sup>], 603,0 [M+4H<sup>+</sup>];  $M_r = 2407,77$  berechnet für C<sub>108</sub>H<sub>175</sub>N<sub>29</sub>O<sub>33</sub>.

**N-3, C-6 = Ac-SSTYIEELGKREVTIPPK-NH<sub>2</sub>**

Ausbeute: 153 mg (73 µmol; 73%); weißes Pulver; homogen in der analytischen RP-HPLC ( $t_R = 1,8$  min); ESI-MS:  $m/z = 1044,8$  [M+2H<sup>+</sup>], 697,0 [M+3H<sup>+</sup>];  $M_r = 2089,39$  berechnet für C<sub>138</sub>H<sub>221</sub>N<sub>33</sub>O<sub>37</sub>S.

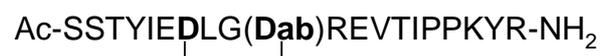
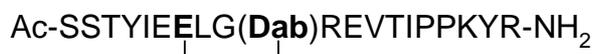
**ω-AHS-AS = Ac-SSTYIEELGK-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>C(O)-TIPPKYR-NH<sub>2</sub>**

Ausbeute: 117 mg (56 µmol; 56%); weißes Pulver; homogen in der analytischen RP-HPLC ( $t_R = 1,7$  min); ESI-MS:  $m/z = 1048,2$  [M+2H<sup>+</sup>], 699,2 [M+3H<sup>+</sup>], 524,6 [M+4H<sup>+</sup>];  $M_r = 2095,43$  berechnet für C<sub>96</sub>H<sub>155</sub>N<sub>23</sub>O<sub>29</sub>.

**PEG-AS = Ac-SSTYIEELGK-(Doo)-TIPPKYR-NH<sub>2</sub>**

Ausbeute: 95 mg (44 µmol; 44%); weißes Pulver; homogen in der analytischen RP-HPLC ( $t_R = 1,8$  min); ESI-MS:  $m/z = 1084,8$  [M+2H<sup>+</sup>], 723,8 [M+3H<sup>+</sup>];  $M_r = 2168,45$  berechnet für C<sub>98</sub>H<sub>158</sub>N<sub>24</sub>O<sub>31</sub>.

JMP106, 107,108,111 - zyklische homodetische Peptide



0,1 mmol mit Fmoc(Pbf)-Arginin vorbeladenes TCP-Harz wurden in einen PTFE-Reaktor eingebracht. Die Kupplungen der Sequenz REVTIPPKY erfolgten am automatischen Synthesizer, wie im allgemeinen Protokoll beschrieben (siehe Abschnitt 5.2.1). Die Kupplung der Aminosäuren der Sequenz XLGY (X = Asp, Glu; X = Lys, Orn, Dab) wurde von Hand mit jeweils 4 Äq. der betreffenden Fmoc-Aminosäure, 4 Äq. HOBt, 4 Äq. HBTU und 4 Äq. DIEA in 3 mL DMF durchgeführt. Asparaginsäure beziehungsweise Glutaminsäure wurden als Seitenketten-OAll-Derivat, Lysin, Ornithin und Diaminobuttersäure als Seitenketten-Alloc-Derivat eingeführt. Die Reaktionszeit betrug jeweils zwei mal eine Stunde, nach jedem Kupplungsschritt wurde mehrmals mit DMF, DCM und *i*PrOH gewaschen. Die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe der Sequenz XLGYREVTIPPKYR wurde bis nach Beendigung der Zyklisierung belassen. Die allylischen Seitenketten-Schutzgruppen wurden unter einer Argonatmosphäre in wasserfreiem DCM mit 1% Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> und 5 Äq. PhSiH<sub>3</sub> bei einer Reaktionszeit von drei mal 15 min entfernt. Zwischen den einzelnen Schritten wurde zwei mal mit wasserfreiem DCM gewaschen. Nach dem letzten Reaktionsschritt wurde mit wasserfreiem DCM gewaschen, bis keine Färbung in der Waschlösung mehr zu beobachten war. Anschließend erfolgten abwechselnd je drei weitere Waschschrte mit DMF und DCM und abschließend mit *i*PrOH, wonach das Harz mittels Wasserstrahlvakuum getrocknet wurde. Die nun folgende Zyklisierung wurde mit 5 Äq. PyBop, 5 Äq. HOBt und 10 Äq. DIEA bei einer Reaktionszeit von zwei mal 120 min durchgeführt. Im Falle des kleinsten Zyklus (Asp-Dab) musste noch ein dritter Reaktionszyklus über Nacht erfolgen, um eine vollständige Zyklisierung zu erreichen. Die Kupplung der verbleibenden Aminosäuren erfolgte am Synthesizer mit Doppelkupplungen, die Acetylgruppe

wurde wie im allgemeinen Protokoll beschrieben von Hand aufgebracht.

Die Abspaltung und Fällung erfolgte unter den im allgemeinen Syntheseteil angegebenen Bedingungen, abschließend wurden die Peptide mittels analytischer RP-HPLC gereinigt und gefriergetrocknet. Das über Asp und Dab zyklisierte Derivat musste hierbei ein zweites Mal gereinigt werden, da nach dem ersten Durchlauf noch etwa 5% Verunreinigungen enthalten waren.

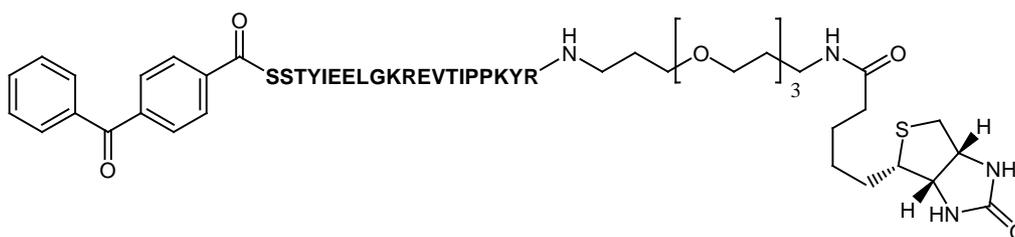
**JMP106:** Ausbeute: 115 mg (48  $\mu\text{mol}$ ; 48%); weißes Pulver; homogen in der analytischen RP-HPLC ( $t_R = 2,0$  min); ESI-MS:  $m/z = 797,6$   $[\text{M}+3\text{H}^+]$ ; 1195,6  $[\text{M}+2\text{H}^+]$ ;  $M_r = 2389,75$  berechnet für  $\text{C}_{108}\text{H}_{173}\text{N}_{29}\text{O}_{32}$ .

**JMP107:** Ausbeute: 99 mg (42  $\mu\text{mol}$ ; 42%); weißes Pulver; homogen in der analytischen RP-HPLC ( $t_R = 2,6$  min); ESI-MS:  $m/z = 792,8$   $[\text{M}+3\text{H}^+]$ ; 1188,4  $[\text{M}+2\text{H}^+]$ ;  $M_r = 2375,74$  berechnet für  $\text{C}_{107}\text{H}_{171}\text{N}_{29}\text{O}_{32}$ .

**JMP108:** Ausbeute: 116 mg (49  $\mu\text{mol}$ ; 49%); weißes Pulver; homogen in der analytischen RP-HPLC ( $t_R = 2,3$  min); ESI-MS:  $m/z = 788,4$   $[\text{M}+3\text{H}^+]$ ; 1181,8  $[\text{M}+2\text{H}^+]$ ;  $M_r = 2361,73$  berechnet für  $\text{C}_{106}\text{H}_{169}\text{N}_{29}\text{O}_{32}$ .

**JMP111:** Ausbeute: 65 mg (28  $\mu\text{mol}$ ; 28%); weißes Pulver; homogen in der analytischen RP-HPLC ( $t_R = 1,7$  min); ESI-MS:  $m/z = 784,0$   $[\text{M}+3\text{H}^+]$ ; 1175,2  $[\text{M}+2\text{H}^+]$ ;  $M_r = 2348,66$  berechnet für  $\text{C}_{105}\text{H}_{167}\text{N}_{29}\text{O}_{32}$ .

### JMP120 Photoaffinitäts-Peptid – Benzophenon N-terminal

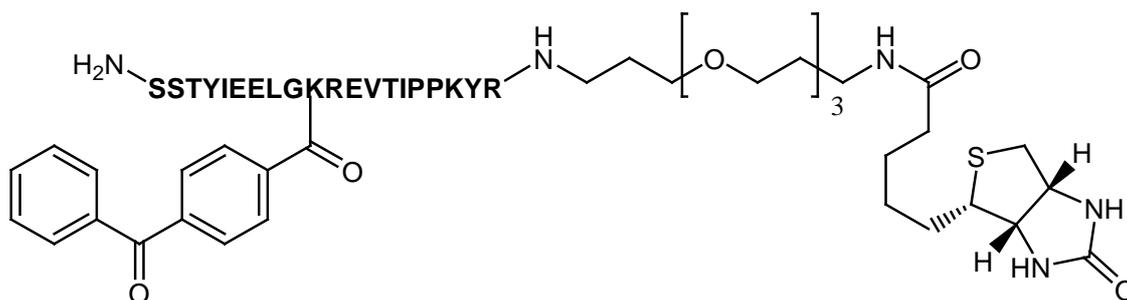


Zur Beladung wurden 0,1 mmol Biotin-PEG NovaTag™ Harz in einer Einmalspritze eingewogen. Nach Entfernen der Fmoc-Schutzgruppe mit 20% Piperidin in NMP wurde mit 2,5 Äq. Fmoc-Arg(Pbf)-OH, 2,5 Äq. HATU und 5 Äq. DIEA in 2,5 mL NMP für eine Stunde unter kräftigem Schütteln beladen. Hierauf wurde das Harz mit NMP gewaschen und die Prozedur wiederholt. Abschließend wurde das Harz je fünfmal abwechselnd eine Minute mit DMF und DCM gewaschen, mit *i*PrOH geschrumpft und im Wasserstrahlvakuum getrocknet. Die Synthese des Peptids erfolgte am automatisierten Batch-Synthesizer, mit Doppelkupplung der Aminosäuren SSTYIE..., wonach das Harz erneut gewaschen und getrocknet wurde.

Zum Einführen der Benzophenon-Gruppe wurden 4 Äq. 4-Benzoyl-benzoesäure, 4 Äq. HOBt, 4 Äq. HBTU und 4 Äq. DIEA in 2,5 mL DMSO gelöst und zum Harz gegeben und in einer Einmalspritze im Laborschüttler über vier Stunden gekuppelt. Nach erfolgter Kupplung wurde das Harz erneut wie oben angegeben gewaschen. Die Abspaltung und Fällung wurde unter den im allgemeinen Syntheseteil angegebenen Bedingungen vorgenommen, jedoch wurde auf TIPS verzichtet, um Nebenreaktionen mit der Benzophenon-Gruppe zu vermeiden. Abschließend wurde das Peptid mittels analytischen RP-HPLC gereinigt und gefriergetrocknet.

Ausbeute: 144 mg (48  $\mu$ mol; 48%); weißes Pulver; homogen in der analytischen RP-HPLC ( $t_R = 3,1$  min); ESI-MS:  $m/z = 1502,4$   $[M+2H^+]$ , 1001,8  $[M+3H^+]$ , 751,8  $[M+4H^+]$ ;  $M_r = 3003,52$  berechnet für  $C_{140}H_{216}N_{32}O_{37}S$ .

### JMP121 Photoaffinitäts-Peptid – Benzophenon zentral

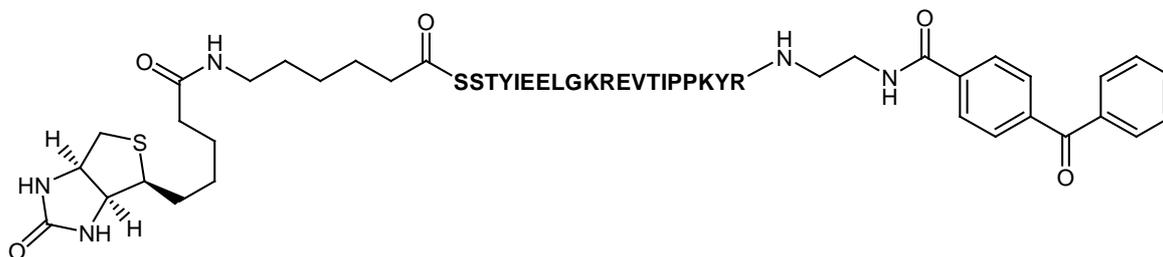


Zur Beladung wurden 0,1 mmol Biotin-PEG NovaTag™ Harz in einer Einmalspritze eingewogen. Nach Entfernen der Fmoc Schutzgruppe mit 20% Piperidin in NMP wurde mit 2,5 Äq. Fmoc-Arg(Pbf)-OH, 2,5 Äq. HATU und 5 Äq. DIEA in 2,5 mL NMP für eine Stunde unter kräftigem Schütteln beladen. Hierauf wurde das Harz mit NMP gewaschen und die Prozedur wiederholt. Abschließend wurde das Harz je fünfmal abwechselnd eine Minute mit DMF und DCM gewaschen, mit *i*PrOH geschrumpft und im Wasserstrahlvakuum getrocknet. Die Synthese des Peptids erfolgte am automatisierten Batch-Synthesizer, mit Doppelkupplung der Aminosäuren SSTYIE..., wobei das zentrale Lysin als Seitenketten-Alloc-Derivat eingesetzt wurde. Der N-Terminus wurde mit einer Lösung von 5% Ac<sub>2</sub>O und 6% 2,6-Lutidin in DMF (v/v) zwei mal 15 min acetyliert, wonach das Harz erneut gewaschen und getrocknet wurde. Die Abspaltung der Alloc-Gruppe wurde wie im allgemeinen Syntheseteil beschrieben vorgenommen, gefolgt von Waschstritten.

Zum Einführen der Benzophenon-Gruppe wurden 4 Äq. 4-Benzoyl-benzoesäure, 4 Äq. HOBt, 4 Äq. HBTU und 4 Äq. DIEA in 2,5 mL DMSO gelöst und zum Harz gegeben und in einer Einmalspritze im Laborschüttler über vier Stunden gekuppelt. Nach erfolgter Kupplung wurde das Harz erneut wie oben angegeben gewaschen. Die Abspaltung und Fällung wurde unter den im allgemeinen Syntheseteil angegebenen Bedingungen vorgenommen, jedoch wurde auf TIPS verzichtet, um Nebenreaktionen mit der Benzophenon-Gruppe zu vermeiden. Abschließend wurde das Peptid mittels analytischen RP-HPLC gereinigt und gefriergetrocknet.

Ausbeute: 121 mg (40 µmol; 40%); weißes Pulver; homogen in der analytischen RP-HPLC ( $t_R = 3,2$  min); ESI-MS:  $m/z = 1523,8$  [M+2H<sup>+</sup>], 1016,2 [M+3H<sup>+</sup>], 762,8 [M+4H<sup>+</sup>];  $M_r = 3045,55$  berechnet für C<sub>142</sub>H<sub>218</sub>N<sub>32</sub>O<sub>40</sub>S.

### JMP122 Photoaffinitäts-Peptid – Benzophenon C-terminal



Zur Beladung wurden 0,1 mmol Universal NovaTag™ Harz in einer Einmalspritze eingewogen. Die Mmt-Schutzgruppe wurde durch Einwirkung einer Lösung von 1 M HOBt in DCM/TFE 1:1 (v/v) für zwei mal 30 min und einmal 1 h entfernt, wonach keine Rotfärbung der Lösung mehr beobachtet wurde. Hierauf wurde die Benzophenon-Gruppe eingeführt, wofür 4 Äq. 4-Benzoyl-benzoesäure, 4 Äq. HOBt, 4 Äq. HBTU und 4 Äq. DIEA in 2,5 mL DMSO gelöst und zum Harz gegeben wurden. Nach vier Stunden wurde das Harz je fünfmal abwechselnd eine Minute mit DMF und DCM gewaschen, mit *i*PrOH geschrumpft und im Wasserstrahlvakuum getrocknet. Nach Entfernen der Fmoc Schutzgruppe mit 20% Piperidin in NMP wurde mit 2,5 Äq. Fmoc-Arg(Pbf)-OH, 2,5 Äq. HATU und 5 Äq. DIEA in 2,5 mL NMP für eine Stunde unter kräftigem Schütteln beladen. Nach Waschen wurde die Prozedur wiederholt. Die Synthese des Peptids wurde am automatisierten Batch-Synthesizer fortgesetzt, für die Sequenz SSTYIE... wurden Doppelkupplungen verwendet. Das Harz wurde erneut gewaschen und getrocknet. Zum Anbringen des Biotin-Labels wurden 1,2 Äq. N-(+)-Biotinyl-aminocaprinsäure, 1,2 Äq. HOAT, 1,2 Äq. HATU und 2,4 Äq. DIEA in 3,5 mL DMF gelöst in einer Einmalspritze zum Harz gegeben und für drei Stunden geschüttelt. Die Abspaltung und Fällung wurde unter den im allgemeinen Syntheseteil angegebenen Bedingungen vorgenommen, jedoch wurde auf TIPS verzichtet, um Nebenreaktionen mit der Benzophenon-Gruppe zu vermeiden. Abschließend wurde das Peptid mittels analytischen RP-HPLC gereinigt und gefriergetrocknet.

Ausbeute: 88 mg (29 mmol; 29%); weißes Pulver; homogen in der analytischen RP-HPLC ( $t_R = 3,0$  min); ESI-MS:  $m/z = 1110,4$  [ $M+3H^+$ ];  $M_r = 3027,50$  berechnet für  $C_{142}H_{218}N_{32}O_{38}S$ .

## 6 Abkürzungsverzeichnis

In der vorliegenden Arbeit wurden zusätzlich zu den gebräuchlichen Abkürzungen der SI-Einheiten Standardabkürzungen nach *ACS Style Guide: A manual for Authors and Editors*<sup>[370]</sup> verwendet. Zur Nomenklatur und gebräuchlichen biochemischen Abkürzungen sei außerdem auf die *IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature* verwiesen<sup>[371]</sup>. Einige der verwendeten Abkürzungen sind im Folgenden angegeben:

Å	Angström
ABP	Aktivitätsbasierte Sonde ( <i>Activity Based Probe</i> )
Abz	Aminobenzoesäure
Ac	Acetyl
Ac <sub>2</sub> O	Essigsäureanhydrid
Alloc	Allyloxycarbonyl
AMC	7-Amino-4-methyl-cumarin
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
Äq.	Äquivalente
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat, Toluidinsalz
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Bu	<i>n</i> -Butyl
CaR	<i>calcium sensing receptor</i>
CD	Circulardichroismus
Cl/T	Chlor/Tolidin-Färbung
CP1B	27meres Peptid aus Exon 1B von humanem Calpastatin
Dab	2,4-Diaminobuttersäure
Dansyl	1-Sulfonyl-5-dimethylaminonaphthalin
DBSI	Dibenzosulfonimid
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
Dde	1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-yliden)-ethyl
DEAE	Diethylaminoethyl
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIEA	Diisopropylethylamin
DMAP	2,4-Dimethylaminopyridin

DMF	<i>N, N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dnp	2,4-Dinitrophenyl
DNS	Deoxyribonukleinsäure
Doo	3,6-Dioxa-8-Aminooctansäure
DTNB	Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure)
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid
EDDnp	N-(2,4-Dinitrophenyl)-etyhlendiamin
EDT	1,2-Ethandithiol
EE	Essigsäureethylester
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor ( <i>Epidermal Growth Factor</i> )
EGTA	Ethylenglykol-O,O'-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immuno sorbent assay</i>
ESI	Elektro-Spray-Ionisierung
Et	Ethyl
Et <sub>2</sub> O	Diethylether
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
Gas2	<i>Growth arrest-specific protein 2</i>
HATU	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl-O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-uronium hexafluorophosphat
HBTU	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl-O-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphat
HOAc	Essigsäure
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HOSu	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HV	Hochvakuum
IC <sub>50</sub>	benötigte Konzentration für 50%ige Inhibition eines Enzyms
IgG	Immunglobulin G
iPr	<i>iso</i> -Propyl
IUP	intrinsisch unstrukturiertes Protein
Kp	Siedepunkt

KPG	Kerngezogenes Präzisions-Glasgerät
LC-MS	Flüssigchromatografie-gekoppelte Massenspektrometrie
M	molar
mI-II	m-Minicalpain (Konstrukt aus Domäne I und II von m-Calpain)
MAP	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Multi-Antigen-Peptid (Dendrimer)
MBS	m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidester
MD	<i>Molecular Dynamics</i> (Kalkulationen)
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
min	Minute(n)
mM	millimolar
Mmt	4-Methoxytrityl
M <sub>r</sub>	Molgewicht
MS	Massenspektrometrie
MTB	Methyl- <i>tert</i> -butyl-ether
MWD	Multi-Wellenlängen-Detektor
μI-II	μ-Minicalpain (Konstrukt aus Domäne I und II von μ-Calpain)
NBT	Nitroblue <sup>®</sup> Tetrazolchlorid
NMM	N-Methylmorpholin
NMP	<i>N</i> -Methyl-pyrrolidon
NMR	Kernspinresonanz ( <i>nuclear magnetic resonance</i> )
Npys	3-Nitro-2-pyridinsulfenyl
OAl	O-Allyl
Orn	Ornithin
p.a.	<i>pro analysi</i> - analysenrein
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCS	Primäre Kontaktstelle ( <i>primary contact site</i> )
PDA	Photodioden-Array
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PE	Petrolether
PEST	Pro, Glu(Asp), Ser/Thr-reiche Region eines Proteins
Ph	Phenyl
PhSiH <sub>3</sub>	Phenylsilan

Pip	Piperidin
Pip <sub>n</sub>	Phosphatidylinositol-Polyphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PPase	Phosphoprotein-Phosphatase
PS-SCL	<i>positional scanning synthetic combinatorial libraries</i>
PTH	Parathyroid-Hormon
PyBOP	Benzotriazolyl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium-hexafluorophosphat
quant	quantitativ
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor in der Dünnschichtchromatographie
RP-HPLC	Reversed-Phase High Pressure Liquid Chromatographie
RT	Raumtemperatur
ScpA	Staphopain A
SAR	Struktur/Aktivitäts Beziehung ( <i>structure activity relationship</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfonat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfonat-Polyacrylamid Gelelektrophorese
SLY-AMC	Succinyl-Leu-Tyr-AMC (s. oberhalb)
SspB	Staphopain B
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
TEA	Triethylamin
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl-ethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
<i>t</i> EPS	<i>trans</i> -Epoxybernsteinsäure / -succinimid (= Oxiran-2,3-dicarbonsäure)
TFE	Trifluorethanol
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Triisopropylsilan
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrosefaktor $\alpha$
t <sub>R</sub>	Retentionszeit in der analytischen HPLC
Tricine	N-Tris-(hydroxymethyl)-methylglycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trt	Trityl
UV/Vis	Ultraviolett/Visible (sichtbares Licht)
Xaa	Platzhalter für beliebige Aminosäure
Z	Benzyloxycarbonyl

## 7 Literaturverzeichnis

1. Payen, A. and J.F. Persoz, *Annales de Chimie (Physiologie)*, 1833. **53**: p. 73.
2. Kuehne, W., *Ueber das Verhalten verschiedener organisierter und sog. ungeformter Fermente*. Verhandlungen des Naturhistorisch-Medizinischen Vereins zu Heidelberg, 1877. **1**: p. 190-193.
3. Kuehne, W., *Ueber das Trypsin (Enzym des Pankreas)*. Verhandlungen des Naturhistorisch-Medizinischen Vereins zu Heidelberg, 1877. **1**: p. 194-198.
4. Barrett, A.J., *Protein degradation in health and disease. Introduction: the classification of proteinases*. Ciba Foundation symposium, 1979(75): p. 1-13.
5. Lopez-Otin, C. and C.M. Overall, *Protease degradomics: A new challenge for proteomics*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2002. **3**(7): p. 509-519.
6. Yabuki, Y., et al., *Identification of a glutamine residue essential for catalytic activity of aspergilloglutamic peptidase by site-directed mutagenesis*. FEBS letters, 2004. **569**(1-3): p. 161-4.
7. Barrett, A.J. and N.D. Rawlings, *Evolutionary lines of cysteine peptidases*. Biological Chemistry, 2001. **382**(5): p. 727-733.
8. Barrett, A.J., et al., *Handbook of Proteolytic Enzymes, Second Edition, Volume 1: Aspartic and Metallo Peptidases*. 2004. 1047 pp.
9. Barrett, A.J., et al., *Handbook of Proteolytic Enzymes, Second Edition, Volume 2: Cysteine, Serine and Threonine Peptidases*. 2004. 1089 pp.
10. Rawlings, N.D. and A.J. Barrett, *Evolutionary families of peptidases*. Biochemical journal, 1993. **290** ( Pt 1): p. 205-18.
11. Rawlings, N.D., Morton, F.R. & Barrett, A.J., *MEROPS - the Peptidase Database*. Nucleic Acids Research, 2006. **34**: p. D270-D272.
12. Kamphuis, I.G., et al., *Structure of papain refined at 1.65 Å resolution*. JMB, 1984. **179**(2): p. 233-56.
13. Lecaille, F., J. Kaleta, and D. Broemme, *Human and Parasitic Papain-Like Cysteine Proteases: Their Role in Physiology and Pathology and Recent Developments in Inhibitor Design*. Chemical Reviews (Washington, DC, United States), 2002. **102**(12): p. 4459-4488.
14. Turk, B., D. Turk, and V. Turk, *Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers*. Biochimica et Biophysica Acta, Protein Structure and Molecular Enzymology, 2000. **1477**(1-2): p. 98-111.
15. Turk, B.E., et al., *Determination of protease cleavage site motifs using mixture-based oriented peptide libraries*. Nature Biotechnology, 2001. **19**(7): p. 661-667.
16. Dolenc, I., et al., *Oligomeric structure and substrate induced inhibition of human cathepsin C*. JBC, 1995. **270**(37): p. 21626-31.
17. Guay, J., et al., *Potency and selectivity of inhibition of cathepsin K, L and S by their respective propeptides*. European Journal of Biochemistry, 2000. **267**(20): p. 6311-6318.
18. Fox, T., et al., *Potent slow-binding inhibition of cathepsin B by its propeptide*. Biochemistry, 1992. **31**(50): p. 12571-6.
19. Carmona, E., et al., *Potency and selectivity of the cathepsin L propeptide as an inhibitor of cysteine proteases*. Biochemistry, 1996. **35**(25): p. 8149-57.
20. Guo, Y.L., et al., *The a1/2 helical backbone of the prodomains defines the intrinsic inhibitory specificity in the cathepsin L-like cysteine protease subfamily*. FEBS Letters, 2000. **469**(2,3): p. 203-207.
21. Billington, C.J., et al., *The Slow-Binding Inhibition of Cathepsin K by Its Propeptide*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000. **276**(3): p. 924-929.
22. Maubach, G., et al., *The inhibition of cathepsin S by its propeptide. Specificity and mechanism of action*. European Journal of Biochemistry, 1997. **250**(3): p. 745-750.

23. Schilling, K., et al., *Folding incompetence of cathepsin L-like cysteine proteases may be compensated by the highly conserved, domain-building N-terminal extension of the proregion*. *Biological Chemistry*, 2001. **382**(5): p. 859-865.
24. Broemme, D., et al., *Potent and selective inactivation of cysteine proteinases with N-peptidyl-O-acyl hydroxylamines*. *Biochemical Journal*, 1989. **263**(3): p. 861-6.
25. Yamamoto, Y., et al., *Proregion of Bombyx mori cysteine proteinase functions as an intramolecular chaperone to promote proper folding of the mature enzyme*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 1999. **42**(3): p. 167-178.
26. Chapman, R.L., S.E. Kane, and A.H. Erickson, *Abnormal glycosylation of procathepsin L due to N-terminal point mutations correlates with failure to sort to lysosomes*. *JBC*, 1997. **272**(13): p. 8808-8816.
27. Nissler, K., et al., *Sorting of non-glycosylated human procathepsin S in mammalian cells*. *Biological Chemistry*, 1998. **379**(2): p. 219-224.
28. Pandey, K.C., et al., *The Plasmodium falciparum cysteine protease falcipain-2 captures its substrate, hemoglobin, via a unique motif*. *PNAS*, 2005. **102**(26): p. 9138-9143.
29. McGrath, M.E., *The lysosomal cysteine proteases*. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 1999. **28**: p. 181-204.
30. Pinitglang, S., et al., *A classical enzyme active center motif lacks catalytic competence until modulated electrostatically*. *Biochemistry*, 1997. **36**(33): p. 9968-82.
31. Turk, D., et al., *Revised definition of substrate binding sites of papain-like cysteine proteases*. *Biological Chemistry*, 1998. **379**(2): p. 137-147.
32. Turk, D. and G. Guncar, *Lysosomal cysteine proteases (cathepsins): promising drug targets*. *Acta Crystallographica, Section D: Biological Crystallography*, 2003. **D59**(2): p. 203-213.
33. Karrer, K.M., S.L. Peiffer, and M.E. DiTomas, *Two distinct gene subfamilies within the family of cysteine protease genes*. *PNAS*, 1993. **90**(7): p. 3063-7.
34. Wex, T., et al., *Human Cathepsins F and W: A New Subgroup of Cathepsins*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999. **259**(2): p. 401-407.
35. Musil, D., et al., *The refined 2.16 Å x-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity*. *EMBO Journal*, 1991. **10**(9): p. 2321-30.
36. Polgar, L. and C. Csoma, *Dissociation of ionizing groups in the binding cleft inversely controls the endo- and exopeptidase activities of cathepsin B*. *JBC*, 1987. **262**(30): p. 14448-53.
37. Khouri, H.E., et al., *A model to explain the pH-dependent specificity of cathepsin B-catalyzed hydrolysis*. *Biochemical Journal*, 1991. **275**(3): p. 751-7.
38. Nagler, D.K., et al., *Major increase in endopeptidase activity of human cathepsin B upon removal of occluding loop contacts*. *Biochemistry*, 1997. **36**(41): p. 12608-15.
39. Quraishi, O., et al., *The Occluding Loop in Cathepsin B Defines the pH Dependence of Inhibition by Its Propeptide*. *Biochemistry*, 1999. **38**(16): p. 5017-5023.
40. Cathers, B.E., et al., *pH Dependence of inhibitors targeting the occluding loop of cathepsin B*. *Bioorganic Chemistry*, 2002. **30**(4): p. 264-275.
41. Stoka, V., B. Turk, and V. Turk, *Lysosomal Cysteine Proteases: Structural Features and their Role in Apoptosis*. *IUBMB Life*, 2005. **57**(4-5): p. 347-353.
42. Nagler, D.K. and R. Menard, *Human cathepsin X: A novel cysteine protease of the papain family with a very short proregion and unique insertions*. *FEBS Letters*, 1998. **434**(1,2): p. 135-139.
43. Sivaraman, J., et al., *Crystal structure of human procathepsin X: a cysteine protease with the proregion covalently linked to the active site cysteine*. *JMB*, 2000. **295**(4): p. 939-51.
44. Turk, D., B. Turk, and V. Turk, *Papain-like lysosomal cysteine proteases and their inhibitors: Drug discovery targets?* *Biochemical Society Symposia*, 2003. **70**: p. 15-30.
45. Erickson, A.H., *Biosynthesis of lysosomal endopeptidases*. *Journal of Cellular Biochemistry*, 1989. **40**(1): p. 31-41.
46. Gupta, D.K., et al., *Processing and transport of lysosomal enzymes in human monocyte line U937*. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur physiologische Chemie*, 1984. **365**(8): p. 867-76.

47. Nishimura, Y., T. Kawabata, and K. Kato, *Identification of latent procathepsins B and L in microsomal lumen: characterization of enzymic activation and proteolytic processing in vitro*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1988. **261**(1): p. 64-71.
48. Matsueda, R., et al., *Design and synthesis of cathepsin B inhibitors by an affinity labeling approach*. Chemistry Letters, 1988(11): p. 1857-60.
49. Barrett, A.J. and H. Kirschke, *Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L*. Methods in Enzymology, 1981. **80**(Proteolytic Enzymes, Pt. C): p. 535-61.
50. Chapman, H.A., R.J. Riese, and G.-P. Shi, *Emerging roles for cysteine proteases in human biology*. Annual Review of Physiology, 1997. **59**: p. 63-88.
51. Honey, K. and A.Y. Rudensky, *Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation*. Nature Reviews Immunology, 2003. **3**(6): p. 472-482.
52. Nakagawa, T., et al., *Cathepsin L: critical role in Ii degradation and CD4 T cell selection in the thymus*. Science (Washington, D. C.), 1998. **280**(5362): p. 450-453.
53. Shi, G.-P., et al., *Role for cathepsin F in invariant chain processing and major histocompatibility complex class II peptide loading by macrophages*. Journal of Experimental Medicine, 2000. **191**(7): p. 1177-1185.
54. Roth, W., et al., *Cathepsin L deficiency as molecular defect of furless: hyperproliferation of keratinocytes and perturbation of hair follicle cycling*. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2000. **14**(13): p. 2075-86.
55. Saftig, P., et al., *Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice*. PNAS, 1998. **95**(23): p. 13453-13458.
56. Linnevers, C.J., et al., *Expression of human cathepsin K in Pichia pastoris and preliminary crystallographic studies of an inhibitor complex*. Protein science : a publication of the Protein Society, 1997. **6**(4): p. 919-21.
57. Pham, C.T.N. and T.J. Ley, *Dipeptidyl peptidase I is required for the processing and activation of granzymes A and B in vivo*. PNAS, 1999. **96**(15): p. 8627-8632.
58. Wolters, P.J., et al., *Dipeptidyl peptidase I is essential for activation of mast cell chymases, but not tryptases, in mice*. JBC, 2001. **276**(21): p. 18551-18556.
59. Kirschke, H., I. Schmidt, and B. Wiederanders, *Cathepsin S. The cysteine proteinase from bovine lymphoid tissue is distinct from cathepsin L (E.C. 3.4.22.15)*. Biochemical Journal, 1986. **240**(2): p. 455-9.
60. Turk, B., et al., *Kinetics of the pH-induced inactivation of human cathepsin L*. Biochemistry, 1993. **32**(1): p. 375-80.
61. Eakin, A.E., et al., *The sequence, organization, and expression of the major cysteine protease (cruzain) from Trypanosoma cruzi*. JBC, 1992. **267**(11): p. 7411-20.
62. Sajid, M. and J.H. McKerrow, *Cysteine proteases of parasitic organisms*. Molecular and Biochemical Parasitology, 2002. **120**(1): p. 1-21.
63. Turk, B.E. and L.C. Cantley, *Use of peptide library in method for determining protease cleavage site motifs and preparation of protease inhibitors*. 2002, (Beth Israel Deaconess Medical Center, Inc., USA). Application: WO. p. 126 pp.
64. Schaschke, N., et al., *E-64 analogs as inhibitors of cathepsin B. On the role of the absolute configuration of the epoxysuccinyl group*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1997. **5**(9): p. 1789-1797.
65. Jaeattelae, M., *Multiple cell death pathways as regulators of tumor initiation and progression*. Oncogene, 2004. **23**(16): p. 2746-2756.
66. Fehrenbacher, N., et al., *Sensitization to the lysosomal cell death pathway upon immortalization and transformation*. Cancer research, 2004. **64**(15): p. 5301-10.
67. Li, W., et al., *Induction of cell death by the lysosomotropic detergent MSDH*. FEBS Letters, 2000. **470**(1): p. 35-39.
68. Cirman, T., et al., *Selective Disruption of Lysosomes in HeLa Cells Triggers Apoptosis Mediated by Cleavage of Bid by Multiple Papain-like Lysosomal Cathepsins*. JBC, 2004. **279**(5): p. 3578-3587.

69. Reiners, J.J., Jr., et al., *Release of cytochrome c and activation of pro-caspase-9 following lysosomal photodamage involves bid cleavage*. Cell Death and Differentiation, 2002. **9**(9): p. 934-944.
70. Boya, P., et al., *Lysosomal membrane permeabilization induces cell death in a mitochondrion-dependent fashion*. Journal of Experimental Medicine, 2003. **197**(10): p. 1323-1334.
71. Kagedal, K., et al., *Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases*. Biochemical Journal, 2001. **359**(2): p. 335-343.
72. Katunuma, N., et al., *New apoptosis cascade mediated by lysosomal enzyme and its protection by epigallo-catechin gallate*. Advances in Enzyme Regulation, 2004. **44**: p. 1-10.
73. Liu, J., et al., *Lysosomal Cysteine Proteases in Atherosclerosis*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2004. **24**(8): p. 1359-1366.
74. Erdal, H., et al., *Induction of lysosomal membrane permeabilization by compounds that activate p53-independent apoptosis*. PNAS, 2005. **102**(1): p. 192-197.
75. Guicciardi, M.E., et al., *Cathepsin B contributes to TNF- $\alpha$ -mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c*. Journal of Clinical Investigation, 2000. **106**(9): p. 1127-1137.
76. Foghsgaard, L., et al., *Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor*. The Journal of cell biology, 2001. **153**(5): p. 999-1010.
77. Liu, N., et al., *NF- $\kappa$ B protects from the lysosomal pathway of cell death*. EMBO Journal, 2003. **22**(19): p. 5313-5322.
78. Tardy, C., et al., *Mannose 6-Phosphorylated Proteins Are Required for Tumor Necrosis Factor-induced Apoptosis: defective response in I-cell disease fibroblasts*. JBC, 2004. **279**(51): p. 52914-52923.
79. Stoka, V., et al., *Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of Bid, not procaspases, is the most likely route*. JBC, 2001. **276**(5): p. 3149-3157.
80. Gelb, B.D., et al., *Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency*. Science (Washington, D. C.), 1996. **273**(5279): p. 1236-1238.
81. Toomes, C., et al., *Loss-of-function mutations in the cathepsin C gene result in periodontal disease and palmoplantar keratosis*. Nature Genetics, 1999. **23**(4): p. 421-424.
82. Kirschke, H., A.J. Barrett, and N.D. Rawlings, *Proteinases 1: Lysosomal cysteine proteinases*. Protein Profile, 1995. **2**(14): p. 1587-643, 3 plates.
83. Delaisse, J.M., P. Ledent, and G. Vaes, *Collagenolytic cysteine proteinases of bone tissue. Cathepsin B, (pro)cathepsin L and a cathepsin L-like 70 kDa proteinase*. Biochemical Journal, 1991. **279**(1): p. 167-74.
84. Baici, A., et al., *Cathepsin B in osteoarthritis: cytochemical and histochemical analysis of human femoral head cartilage*. Annals of the rheumatic diseases, 1995. **54**(4): p. 289-97.
85. Baici, A., et al., *Cathepsin B in osteoarthritis: zonal variation of enzyme activity in human femoral head cartilage*. Annals of the rheumatic diseases, 1995. **54**(4): p. 281-8.
86. Sohar, N., H. Hammer, and I. Sohar, *Lysosomal peptidases and glycosidases in rheumatoid arthritis*. Biological Chemistry, 2002. **383**(5): p. 865-869.
87. Mort, J.S., A.D. Recklies, and A.R. Poole, *Extracellular presence of the lysosomal proteinase cathepsin B in rheumatoid synovium and its activity at neutral pH*. Arthritis and rheumatism, 1984. **27**(5): p. 509-15.
88. Cataldo, A.M., et al., *Lysosomal hydrolases of different classes are abnormally distributed in brains of patients with Alzheimer disease*. PNAS, 1991. **88**(24): p. 10998-1002.
89. Yan, S., M. Sameni, and B.F. Sloane, *Cathepsin B and human tumor progression*. Biological Chemistry, 1998. **379**(2): p. 113-123.
90. Koblinski, J.E., M. Ahram, and B.F. Sloane, *Unraveling the role of proteases in cancer*. Clinica Chimica Acta, 2000. **291**(2): p. 113-135.
91. Sloane, B.F., K. Moin, and T.T. Lah, *Regulation of lysosomal endopeptidases in malignant neoplasia*. Biochemical and Molecular Aspects of Selected Cancers, 1994. **2**: p. 411-66.

92. Burleigh, M.C., A.J. Barrett, and G.S. Lazarus, *Cathepsin B1. A lysosomal enzyme that degrades native collagen*. *Biochemical Journal*, 1974. **137**(2): p. 387-98.
93. Barrett, A.J., et al., *L-trans-Epoxysuccinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogs as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H, and L*. *Biochemical Journal*, 1982. **201**(1): p. 189-98.
94. Nguyen, Q., J.S. Mort, and P.J. Roughley, *Cartilage proteoglycan aggregate is degraded more extensively by cathepsin L than by cathepsin B*. *Biochemical Journal*, 1990. **266**(2): p. 569-73.
95. Hou, W.-S., et al., *Cleavage site specificity of cathepsin K toward cartilage proteoglycans and protease complex formation*. *Biological chemistry*, 2003. **384**(6): p. 891-7.
96. Buck, M.R., et al., *Degradation of extracellular-matrix proteins by human cathepsin B from normal and tumor tissues*. *Biochemical Journal*, 1992. **282**(1): p. 273-8.
97. Kobayashi, H., et al., *Cathepsin B efficiently activates the soluble and the tumor cell receptor-bound form of the proenzyme urokinase-type plasminogen activator (pro-uPA)*. *JBC*, 1991. **266**(8): p. 5147-52.
98. Joyce, J.A., et al., *Cathepsin cysteine proteases are effectors of invasive growth and angiogenesis during multistage tumorigenesis*. *Cancer Cell*, 2004. **5**(5): p. 443-453.
99. Lakka, S.S., et al., *Inhibition of cathepsin B and MMP-9 gene expression in glioblastoma cell line via RNA interference reduces tumor cell invasion, tumor growth and angiogenesis*. *Oncogene*, 2004. **23**(27): p. 4681-4689.
100. Konduri, S., et al., *Elevated levels of cathepsin B in human glioblastoma cell lines*. *International journal of oncology*, 2001. **19**(3): p. 519-24.
101. Remple, S.A., et al., *Cathepsin B expression and localization in glioma progression and invasion*. *Cancer Research*, 1994. **54**(23): p. 6027-31.
102. Murnane, M.J., et al., *Stage-specific increases in cathepsin B messenger RNA content in human colorectal carcinoma*. *Cancer research*, 1991. **51**(4): p. 1137-42.
103. Sinha, A.A., et al., *The relationship of cathepsin B and stefin A mRNA localization identifies a potentially aggressive variant of human prostate cancer within a Gleason histologic score*. *Anticancer research*, 1999. **19**(4B): p. 2821-9.
104. Lin, L., et al., *A minimal critical region of the 8p22-23 amplicon in esophageal adenocarcinomas defined using sequence tagged site-amplification mapping and quantitative polymerase chain reaction includes the GATA-4 gene*. *Cancer Research*, 2000. **60**(5): p. 1341-1347.
105. Thompson, V.F., et al., *Digestion of m- and m-calpain by trypsin and chymotrypsin*. *Biochimica et Biophysica Acta, Proteins and Proteomics*, 2003. **1648**(1-2): p. 140-153.
106. Guroff, G., *A Neutral, Calcium-Activated Proteinase from the Soluble Fraction of Rat Brain*. *JBC*, 1964. **239**: p. 149-55.
107. Meyer, W.L., E.H. Fischer, and E.G. Krebs, *Activation of skeletal muscle phosphorylase b kinase by calcium ion*. *Biochemistry*, 1964. **3**(8): p. 1033-9.
108. Dayton, W.R., et al., *Properties of a calcium ion-activated protease that may be involved in myofibrillar protein turnover*. *Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation*, 1975. **2**(Proteases Biol. Control): p. 551-77.
109. Kubbutat, M.H.G. and k.H. Vousden, *Proteolytic cleavage of human p53 by calpain: a potential regulator of protein stability*. *Molecular and Cellular Biology*, 1997. **17**(1): p. 460-468.
110. Molinari, M., J. Anagli, and E. Carafoli, *PEST sequences do not influence substrate susceptibility to calpain proteolysis*. *JBC*, 1995. **270**(5): p. 2032-5.
111. Dourdin, N., et al., *Potential m-calpain substrates during myoblast fusion*. *Experimental Cell Research*, 1999. **246**(2): p. 433-442.
112. Harada, K., et al., *Translocation and down-regulation of protein kinase C- $\alpha$ , - $\beta$ , and - $\gamma$  isoforms during ischemia-reperfusion in rat brain*. *Journal of Neurochemistry*, 1999. **72**(6): p. 2556-2564.

113. Murachi, T., et al., *Intracellular calcium ion-dependent protease (calpain) and its high-molecular-weight endogenous inhibitor (calpastatin)*. *Advances in Enzyme Regulation*, 1981. **19**: p. 407-24.
114. Murachi, T., *Intracellular calcium protease and its inhibitor protein: calpain and calpastatin*. *Calcium Cell Funct.*, 1983. **4**: p. 377-410.
115. Sorimachi, H., et al., *Muscle-specific calpain, p94, is degraded by autolysis immediately after translation, resulting in disappearance from muscle*. *JBC*, 1993. **268**(14): p. 10593-605.
116. Croall, D.E. and G.N. Demartino, *Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation*. *Physiological Reviews*, 1991. **71**(3): p. 813-47.
117. Strobl, S., et al., *The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium*. *PNAS*, 2000. **97**(2): p. 588-592.
118. Hosfield, C.M., et al., *Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca<sup>2+</sup>-dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation*. *EMBO Journal*, 1999. **18**(24): p. 6880-6889.
119. Blanchard, H., et al., *Structure of a calpain Ca(2+)-binding domain reveals a novel EF-hand and Ca(2+)-induced conformational changes*. *Nature structural biology*, 1997. **4**(7): p. 532-8.
120. Dutt, P., et al., *Roles of individual EF-hands in the activation of m-calpain by calcium*. *Biochemical journal*, 2000. **348 Pt 1**: p. 37-43.
121. Tompa, P., et al., *On the Sequential Determinants of Calpain Cleavage*. *JBC*, 2004. **279**(20): p. 20775-20785.
122. Moldoveanu, T., et al., *A Ca<sup>2+</sup> switch aligns the active site of calpain*. *Cell (Cambridge, MA, United States)*, 2002. **108**(5): p. 649-660.
123. Dutt, P., et al., *Origins of the difference in Ca<sup>2+</sup> requirement for activation of m- and m-calpain*. *Biochemical Journal*, 2002. **367**(1): p. 263-269.
124. Richard, I., et al., *Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A*. *Cell (Cambridge, Massachusetts)*, 1995. **81**(1): p. 27-40.
125. Moldoveanu, T., et al., *Calpain silencing by a reversible intrinsic mechanism*. *Nature Structural Biology*, 2003. **10**(5): p. 371-378.
126. Gabrijelcic-Geiger, D., et al., *Human m-calpain: Simple isolation from erythrocytes and characterization of autolysis fragments*. *Biological Chemistry*, 2001. **382**(12): p. 1733-1737.
127. Jones, E.Y., D.I. Stuart, and N.P. Walker, *Structure of tumour necrosis factor*. *Nature*, 1989. **338**(6212): p. 225-8.
128. Newton, A.C. and J.E. Johnson, *Protein kinase C: a paradigm for regulation of protein function by two membrane-targeting modules*. *Biochimica et Biophysica Acta, Reviews on Biomembranes*, 1998. **1376**(2): p. 155-172.
129. Alexa, A., et al., *Contribution of Distinct Structural Elements to Activation of Calpain by Ca<sup>2+</sup> Ions*. *JBC*, 2004. **279**(19): p. 20118-20126.
130. Arthur, J.S.C., et al., *Disruption of the murine calpain small subunit gene, Capn4: calpain is essential for embryonic development but not for cell growth and division*. *Molecular and Cellular Biology*, 2000. **20**(12): p. 4474-4481.
131. Hosfield, C.M., J.S. Elce, and Z. Jia, *Activation of Calpain by Ca<sup>2+</sup>: Roles of the Large Subunit N-terminal and Domain III-IV Linker Peptides*. *JMB*, 2004. **343**(4): p. 1049-1053.
132. Cong, J., et al., *The role of autolysis in activity of the calcium-dependent proteinases (m-calpain and m-calpain)*. *JBC*, 1989. **264**(17): p. 10096-103.
133. Molinari, M., J. Anagli, and E. Carafoli, *Ca<sup>2+</sup>-activated neutral protease is active in the erythrocyte membrane in its nonautolyzed 80-kDa form*. *JBC*, 1994. **269**(45): p. 27992-5.
134. Crawford, C., N.R. Brown, and A.C. Willis, *Studies of the active site of m-calpain and the interaction with calpastatin*. *Biochemical journal*, 1993. **296 ( Pt 1)**: p. 135-42.
135. Cong, J., V.F. Thompson, and D.E. Goll, *Effect of monoclonal antibodies specific for the 28-kDa subunit on catalytic properties of the calpains*. *JBC*, 1993. **268**(34): p. 25740-7.

136. Takahashi-Nakamura, M., et al., *Purification and characterization of an inhibitor of calcium-activated neutral protease from rabbit skeletal muscle*. Journal of Biochemistry (Tokyo, Japan), 1981. **90**(6): p. 1583-9.
137. Graham-Siegenthaler, K., et al., *Active recombinant rat calpain II. Bacterially produced large and small subunits associate both in vivo and in vitro*. JBC, 1994. **269**(48): p. 30457-60.
138. Hathaway, D.R., D.K. Werth, and J.R. Haeblerle, *Limited autolysis reduces the calcium ion requirement of a smooth muscle calcium ion-activated protease*. JBC, 1982. **257**(15): p. 9072-7.
139. Zimmerman, U.J.P. and W.W. Schlaepfer, *Two-stage autolysis of the catalytic subunit initiates activation of calpain I*. Biochimica et Biophysica Acta, Protein Structure and Molecular Enzymology, 1991. **1078**(2): p. 192-8.
140. Nakagawa, K., et al., *Dissociation of m-calpain subunits occurs after autolysis of the N-terminus of the catalytic subunit, and is not required for activation*. Journal of Biochemistry (Tokyo, Japan), 2001. **130**(5): p. 605-611.
141. Goll, D.E., et al., *Intracellular Proteolysis: Mechanisms and Regulation*, ed. N. Katunuma and E. Kominami. 1989, Tokyo, Japan: Japan Scientific societies Press. 80-91.
142. Mellgren, R.L., et al., *Rabbit skeletal muscle calcium-dependent protease requiring millimolar calcium ion. Purification, subunit structure, and calcium ion-dependent autoproteolysis*. JBC, 1982. **257**(12): p. 7203-9.
143. Dayton, W.R., et al., *A calcium(2+) ion-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Partial characterization of the purified enzyme*. Biochemistry, 1976. **15**(10): p. 2159-67.
144. Edmunds, T., et al., *Comparison of the autolyzed and unautolyzed forms of m- and m-calpain from bovine skeletal muscle*. Biochimica et Biophysica Acta, Protein Structure and Molecular Enzymology, 1991. **1077**(2): p. 197-208.
145. Hosfield, C.M., et al., *Calpain mutants with increased Ca<sup>2+</sup> sensitivity and implications for the role of the C2-like domain*. JBC, 2001. **276**(10): p. 7404-7407.
146. James, K.E., et al., *Aza-peptide epoxides: potent and selective inhibitors of Schistosoma mansoni and pig kidney legumains (asparaginyl endopeptidases)*. Biological chemistry, 2003. **384**(12): p. 1613-8.
147. Yoshizawa, T., et al., *Calpain dissociates into subunits in the presence of calcium ions*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1995. **208**(1): p. 376-83.
148. Pal, G.P., J.S. Elce, and Z. Jia, *Dissociation and aggregation of calpain in the presence of calcium*. JBC, 2001. **276**(50): p. 47233-47238.
149. Yoshizawa, T., et al., *A catalytic subunit of calpain possesses full proteolytic activity*. FEBS Letters, 1995. **358**(1): p. 101-3.
150. Schmaier, A.H., et al., *High molecular weight kininogen is an inhibitor of platelet calpain*. Journal of clinical investigation, 1986. **77**(5): p. 1565-73.
151. Higashiyama, S., et al., *Human high molecular weight kininogen as a thiol proteinase inhibitor: presence of the entire inhibition capacity in the native form of heavy chain*. Biochemistry, 1986. **25**(7): p. 1669-75.
152. Ishiguro, H., et al., *Interaction of human calpains I and II with high molecular weight and low molecular weight kininogens and their heavy chain: mechanism of interaction and the role of divalent cations*. Biochemistry, 1987. **26**(10): p. 2863-70.
153. Benetti, R., et al., *The death substrate Gas2 binds m-calpain and increases susceptibility to p53-dependent apoptosis*. EMBO Journal, 2001. **20**(11): p. 2702-2714.
154. Kurebayashi, N., A.B. Harkins, and S.M. Baylor, *Use of fura red as an intracellular calcium indicator in frog skeletal muscle fibers*. Biophysical journal, 1993. **64**(6): p. 1934-60.
155. Jiang, Y.-H., M.G. Klein, and M.F. Schneider, *Numerical simulation of Ca<sup>2+</sup> \"sparks\" in skeletal muscle*. Biophysical Journal, 1999. **77**(5): p. 2333-2357.
156. Saïdo, T.C., et al., *Positive regulation of mu-calpain action by polyphosphoinositides*. JBC, 1992. **267**(34): p. 24585-90.

157. Zalewska, T., V.F. Thompson, and D.E. Goll, *Effect of phosphatidylinositol and inside-out erythrocyte vesicles on autolysis of m- and m-calpain from bovine skeletal muscle*. *Biochimica et Biophysica Acta, Molecular Cell Research*, 2004. **1693**(2): p. 125-133.
158. Nakamura, M., et al., *Fragmentation of an endogenous inhibitor upon complex formation with high- and low-calcium requiring forms of calcium-activated neutral proteases*. *Biochemistry*, 1989. **28**(2): p. 449-55.
159. Inomata, M., et al., *Binding sites for calcium-activated neutral protease on erythrocyte membranes are not membrane phospholipids*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1990. **171**(2): p. 625-32.
160. Lee, W.J., et al., *Factors influencing the binding of calpain I to human erythrocyte inside-out vesicles*. *Biochemistry International*, 1990. **22**(1): p. 163-71.
161. Kifor, O., et al., *m-Calpain colocalizes with the calcium-sensing receptor (CaR) in caveolae in parathyroid cells and participates in degradn. of CaR*. *JBC*, 2003. **278**(33): p. 31167-31176.
162. Anagli, J., J. Haggmann, and E. Shaw, *Affinity labeling of the calcium-activated neutral proteinase (calpain) in intact human platelets*. *Biochemical Journal*, 1993. **289**(1): p. 93-9.
163. Inomata, M. and S. Kawashima, *The possible self-down-regulation of calpain triggered by cell membranes*. *Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranes*, 1995. **1235**(1): p. 107-14.
164. Mellgren, R.L., K. Song, and M.T. Mericle, *m-Calpain requires DNA for activity on nuclear proteins at low calcium concentrations*. *JBC*, 1993. **268**(1): p. 653-7.
165. Glading, A., et al., *Epidermal growth factor activates m-calpain (calpain II), at least in part, by extracellular signal-regulated kinase-mediated phosphorylation*. *Molecular and Cellular Biology*, 2004. **24**(6): p. 2499-2512.
166. Shiraha, H., et al., *Activation of m-calpain (calpain II) by epidermal growth factor is limited by protein kinase A phosphorylation of m-calpain*. *Molecular and Cellular Biology*, 2002. **22**(8): p. 2716-2727.
167. Smith, S.D., et al., *Glutamate substitutions at a PKA consensus site are consistent with inactivation of calpain by phosphorylation*. *FEBS Letters*, 2003. **542**(1-3): p. 115-118.
168. Tompa, P., et al., *Calpastatin subdomains A and C are activators of calpain*. *JBC*, 2002. **277**(11): p. 9022-9026.
169. Ono, Y., H. Sorimachi, and K. Suzuki, *Structure and physiology of calpain, an enigmatic protease*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998. **245**(2): p. 289-294.
170. Cox, E.A. and A. Huttenlocher, *Regulation of integrin-mediated adhesion during cell migration*. *Microscopy Research and Technique*, 1998. **43**(5): p. 412-419.
171. Santella, L., et al., *Calcium, protease action, and the regulation of the cell cycle*. *Cell Calcium*, 1998. **23**(2/3): p. 123-130.
172. Zimmerman, U.-J.P., et al., *The calpain small subunit gene is essential: its inactivation results in embryonic lethality*. *IUBMB Life*, 2000. **50**(1): p. 63-68.
173. Fischer, P.M., et al., *Structure-activity relationship of truncated and substituted analogues of the intracellular delivery vector penetratin*. *Journal of Peptide Research*, 2000. **55**(2): p. 163-172.
174. Pontremoli, S. and E. Melloni, *Extralysosomal protein degradation*. *Annual Review of Biochemistry*, 1986. **55**: p. 455-81.
175. Franco, S., B. Perrin, and A. Huttenlocher, *Isoform specific function of calpain 2 in regulating membrane protrusion*. *Experimental Cell Research*, 2004. **299**(1): p. 179-187.
176. Huttenlocher, A., et al., *Regulation of cell migration by the calcium-dependent protease calpain*. *JBC*, 1997. **272**(52): p. 32719-22.
177. Wang, L.F., et al., *Calpastatin gene in human testis*. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 1994. **33**(2): p. 245-51.
178. Thompson, S.K., et al., *Design of potent and selective human cathepsin K inhibitors that span the active site*. *PNAS*, 1997. **94**(26): p. 14249-14254.
179. Nixon, R.A., *A "protease activation cascade" in the pathogenesis of Alzheimer's disease*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2000. **924**(Alzheimer's Disease): p. 117-131.

180. Yamashima, T., et al., *Transient brain ischaemia provokes Ca<sup>2+</sup>, PIP<sub>2</sub> and calpain responses prior to delayed neuronal death in monkeys*. *European journal of neuroscience*, 1996. **8**(9): p. 1932-44.
181. Yoshikawa, Y., et al., *Calpain inhibitor-1 protects the rat heart from ischemia-reperfusion injury: Analysis by mechanical work and energetics*. *American Journal of Physiology*, 2005. **288**(4, Pt. 2): p. H1690-H1698.
182. Barta, J., et al., *Calpain-I-sensitive myofibrillar proteins of the human myocardium*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2005. **278**(1&2): p. 1-8.
183. Nath, R., et al., *Processing of cdk5 Activator p35 to Its Truncated Form (p25) by Calpain in Acutely Injured Neuronal Cells*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000. **274**(1): p. 16-21.
184. Patrick, G.N., et al., *Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration*. *Nature (London)*, 1999. **402**(6762): p. 615-622.
185. Han, P., et al., *Suppression of cyclin-dependent kinase 5 activation by amyloid precursor protein: A novel excitoprotective mechanism involving modulation of tau phosphorylation*. *Journal of Neuroscience*, 2005. **25**(50): p. 11542-11552.
186. Parnaud, G., et al., *Inhibition of calpain blocks pancreatic b-cell spreading and insulin secretion*. *American Journal of Physiology*, 2005. **289**(2, Pt. 1): p. E313-E321.
187. Wendt, A., V.F. Thompson, and D.E. Goll, *Interaction of calpastatin with calpain*. *Biological Chemistry*, 2004. **385**(6): p. 465-472.
188. Takano, E. and T. Murachi, *Purification and some properties of human erythrocyte calpastatin*. *Journal of Biochemistry (Tokyo, Japan)*, 1982. **92**(6): p. 2021-8.
189. Wei, W., et al., *Immunoaffinity purification of calpastatin and calpastatin constructs*. *Biochimica et biophysica acta*, 2002. **1597**(1): p. 97-106.
190. Imajoh, S. and K. Suzuki, *Reversible interaction between calcium-activated neutral protease (CANP) and its endogeneous inhibitor*. *FEBS Letters*, 1985. **187**(1): p. 47-50.
191. Crawford, C., *Protein and peptide inhibitors of calpains*. *Intracell. Calcium-Depend. Proteolysis*, 1990: p. 75-89.
192. Inazawa, J., et al., *Assignment of the human calpastatin gene (CAST) to chromosome 5 at region q14->q22*. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 1990. **54**(3-4): p. 156-8.
193. Cong, M., et al., *The bovine calpastatin gene promoter and a new N-terminal region of the protein are targets of cAMP-dependent protein kinase activity*. *JBC*, 1998. **273**(1): p. 660-666.
194. Takano, J., et al., *Four types of calpastatin isoforms with distinct amino-terminal sequences are specified by alternative first exons and differentially expressed in mouse tissues*. *Journal of Biochemistry (Tokyo)*, 2000. **128**(1): p. 83-92.
195. Maki, M., et al., *Calpastatins: biochemical and molecular biological studies*. *Biomedica Biochimica Acta*, 1991. **50**(4-6): p. 509-16.
196. Emori, Y., et al., *Endogenous inhibitor for calcium-dependent cysteine protease contains four internal repeats that could be responsible for its multiple reactive sites*. *PNAS*, 1987. **84**(11): p. 3590-4.
197. Takano, E., et al., *Pig heart calpastatin: identification of repetitive domain structures and anomalous behavior in polyacrylamide gel electrophoresis*. *Biochemistry*, 1988. **27**(6): p. 1964-72.
198. Maki, M., et al., *All four internally repetitive domains of pig calpastatin possess inhibitory activities against calpains I and II*. *FEBS Letters*, 1987. **223**(1): p. 174-80.
199. Maki, M., et al., *Analysis of structure-function relationship of pig calpastatin by expression of mutated cDNAs in Escherichia coli*. *JBC*, 1988. **263**(21): p. 10254-61.
200. Takano, E., et al., *Preference of calcium-dependent interactions between calmodulin-like domains of calpain and calpastatin subdomains*. *FEBS Letters*, 1995. **362**(1): p. 93-7.
201. Emori, Y., et al., *All four repeating domains of the endogenous inhibitor for calcium-dependent protease independently retain inhibitory activity. Expression of the cDNA fragments in Escherichia coli*. *JBC*, 1988. **263**(5): p. 2364-70.

202. Kawasaki, H., et al., *Identification and characterization of inhibitory sequences in four repeating domains of the endogenous inhibitor for calcium-dependent protease*. Journal of Biochemistry (Tokyo, Japan), 1989. **106**(2): p. 274-81.
203. Lee, W.J., M. Hatanaka, and M. Maki, *Multiple forms of rat calpastatin cDNA in the coding region of functionally unknown amino-terminal domain*. Biochimica et Biophysica Acta, Gene Structure and Expression, 1992. **1129**(2): p. 251-3.
204. Lee, W.J., et al., *Molecular diversity in amino-terminal domains of human calpastatin by exon skipping*. JBC, 1992. **267**(12): p. 8437-42.
205. Hao, L.-Y., et al., *Calpastatin domain L is involved in the regulation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels in guinea pig cardiac myocytes*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000. **279**(3): p. 756-761.
206. Yang, H.Q., et al., *Analysis of calcium-dependent interaction between amino-terminal conserved region of calpastatin functional domain and calmodulin-like domain of m-calpain large subunit*. JBC, 1994. **269**(29): p. 18977-84.
207. Ma, H., et al., *Amino-terminal conserved region in proteinase inhibitor domain of calpastatin potentiates its calpain inhibitory activity by interacting with calmodulin-like domain of the proteinase*. JBC, 1994. **269**(39): p. 24430-6.
208. Mellgren, R.L., *On the mechanism of binding of calpastatin, the protein inhibitor of calpains, to biologic membranes*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1988. **150**(1): p. 170-6.
209. Mellgren, R.L., R.D. Lane, and S.S. Kakar, *Isolated bovine myocardial sarcolemma and sarcoplasmic reticulum vesicles contain tightly bound calcium-dependent protease inhibitor*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1987. **142**(3): p. 1025-31.
210. Mellgren, R.L., R.D. Lane, and M.T. Mericle, *The binding of large calpastatin to biologic membranes is mediated in part by interaction of an amino terminal region with acidic phospholipids*. Biochimica et Biophysica Acta, Protein Structure and Molecular Enzymology, 1989. **999**(1): p. 71-7.
211. Sasaki, T., et al., *Inactivation of calpain I and calpain II by specificity-oriented tripeptidyl chloromethyl ketones*. Journal of Biochemistry (Tokyo, Japan), 1986. **99**(1): p. 173-9.
212. Konno, T., et al., *A circular dichroism study of preferential hydration and alcohol effects on a denatured protein, pig calpastatin domain I*. Biochimica et biophysica acta, 1997. **1342**(1): p. 73-82.
213. Uemori, T., et al., *Characterization of a functional domain of human calpastatin*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1990. **166**(3): p. 1485-93.
214. Ishima, R., et al., *Structure of the active 27-residue fragment of human calpastatin*. FEBS Letters, 1991. **294**(1-2): p. 64-6.
215. Maki, M., et al., *Inhibition of calpain by a synthetic oligopeptide corresponding to an exon of the human calpastatin gene*. JBC, 1989. **264**(32): p. 18866-9.
216. Molinari, M. and E. Carafoli, *Calpain: a cytosolic proteinase active at the membranes*. Journal of Membrane Biology, 1997. **156**(1): p. 1-8.
217. Kawasaki, H., Y. Emori, and K. Suzuki, *Calpastatin has two distinct sites for interaction with calpain-effect of calpastatin fragments on the binding of calpain to membranes*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1993. **305**(2): p. 467-72.
218. Todd, B., et al., *A Structural Model for the Inhibition of Calpain by Calpastatin: Crystal Structures of the Native Domain VI of Calpain and its Complexes with Calpastatin Peptide and a Small Molecule Inhibitor*. JMB, 2003. **328**(1): p. 131-146.
219. Betts, R. and J. Anagli, *The b- and g-CH2 of B27-WT's Leu11 and Ile18 Side Chains Play a Direct Role in Calpain Inhibition*. Biochemistry, 2004. **43**(9): p. 2596-2604.
220. Betts, R., et al., *Structural determinants of the calpain inhibitory activity of calpastatin peptide B27-WT*. JBC, 2003. **278**(10): p. 7800-7809.
221. Nishimura, T. and D.E. Goll, *Binding of calpain fragments to calpastatin*. JBC, 1991. **266**(18): p. 11842-50.

222. Michetti, M., et al., *Mechanism of action of the calpain activator protein in rat skeletal muscle*. European Journal of Biochemistry, 1991. **202**(3): p. 1177-80.
223. Blomgren, K., et al., *Calpastatin is up-regulated in response to hypoxia and is a suicide substrate to calpain after neonatal cerebral hypoxia-ischemia*. JBC, 1999. **274**(20): p. 14046-14052.
224. Salamino, F., et al., *Modulation of rat brain calpastatin efficiency by post-translational modifications*. FEBS Letters, 1997. **412**(3): p. 433-438.
225. De Tullio, R., et al., *Differential degradation of calpastatin by m- and  $\mu$ -calpain in  $Ca^{2+}$ -enriched human neuroblastoma LAN-5 cells*. FEBS Letters, 2000. **475**(1): p. 17-21.
226. Cottin, P., P.L. Vidalenc, and A. Ducastaing, *Calcium ion-dependent association between a calcium ion-activated neutral proteinase (CaANP) and its specific inhibitor*. FEBS Letters, 1981. **136**(2): p. 221-4.
227. Otsuka, Y. and D.E. Goll, *Purification of the calcium-dependent proteinase inhibitor from bovine cardiac muscle and its interaction with the millimolar calcium-dependent proteinase*. JBC, 1987. **262**(12): p. 5839-51.
228. Hanada, K., et al., *Studies on thiol protease inhibitors. Part III. Inhibitory activities of E-64 derivatives on papain*. Agricultural and Biological Chemistry, 1978. **42**(3): p. 537-41.
229. Salamino, F., et al., *Modulation of calpastatin specificity in rat tissues by reversible phosphorylation and dephosphorylation*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1994. **199**(3): p. 1326-32.
230. De Tullio, R., et al., *Changes in intracellular localization of calpastatin during calpain activation*. Biochemical Journal, 1999. **343**(2): p. 467-472.
231. Kato, M., et al., *Caspases cleave the amino-terminal calpain inhibitory unit of calpastatin during apoptosis in human Jurkat T cells*. Journal of Biochemistry (Tokyo), 2000. **127**(2): p. 297-305.
232. Averna, M., et al., *Changes in intracellular calpastatin localization are mediated by reversible phosphorylation*. Biochemical Journal, 2001. **354**(1): p. 25-30.
233. Averna, M., et al., *Phosphorylation of rat brain calpastatins by protein kinase C*. FEBS Letters, 1999. **450**(1,2): p. 13-16.
234. Jaracz, S., et al., *Recent advances in tumor-targeting anticancer drug conjugates*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2005. **13**(17): p. 5043-5054.
235. Alvarez, M.E., et al., *Phevalin, a new calpain inhibitor, from a Streptomyces sp.* Journal of Antibiotics, 1995. **48**(10): p. 1165-7.
236. Chung, M.-C., et al., *Penicillide, a nonpeptide calpain inhibitor, produced by Penicillium sp. F60760*. Journal of Microbiology and Biotechnology, 1998. **8**(2): p. 188-190.
237. Van Den Bosch, L., et al., *An  $\alpha$ -mercaptoacrylic acid derivative (PD150606) inhibits selective motor neuron death via inhibition of kainate-induced  $Ca^{2+}$  influx and not via calpain inhibition*. Neuropharmacology, 2002. **42**(5): p. 706-713.
238. Schechter, I. and A. Berger, *On the size of the active site in proteases. I. Papain*. Biochemical and biophysical research communications, 1967. **27**(2): p. 157-62.
239. Aoyagi, T. and H. Umezawa, *Structures and activities of protease inhibitors of microbial origin*. Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation, 1975. **2**(Proteases Biol. Control): p. 429-54.
240. Kondo, S., et al., *Isolation and characterization of leupeptins produced by Actinomycetes*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 1969. **17**(9): p. 1896-901.
241. Sasaki, T., et al., *Comparative specificity and kinetic studies on porcine calpain I and calpain II with naturally occurring peptides and synthetic fluorogenic substrates*. JBC, 1984. **259**(20): p. 12489-94.
242. Saito, M., et al., *Purification and structure of novel cysteine proteinase inhibitors, staccopins P1 and P2, from Staphylococcus tanabeensis*. Agricultural and Biological Chemistry, 1987. **51**(3): p. 861-8.

243. Ogura, K., et al., *Purification and structure of a novel cysteine proteinase inhibitor, strepin P-I*. Agricultural and Biological Chemistry, 1985. **49**(3): p. 799-805.
244. Yano, Y., et al., *The effects of calpeptin (a calpain specific inhibitor) on agonist induced microparticle formation from the platelet plasma membrane*. Thrombosis Research, 1993. **71**(5): p. 385-96.
245. Mehdi, S., et al., *Inhibition of the proteolysis of rat erythrocyte membrane proteins by a synthetic inhibitor of calpain*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1988. **157**(3): p. 1117-23.
246. Sasaki, T., et al., *Inhibitory effect of di- and tripeptidyl aldehydes on calpains and cathepsins*. Journal of Enzyme Inhibition, 1990. **3**(3): p. 195-201.
247. Moldoveanu, T., et al., *Crystal Structures of Calpain-E64 and -Leupeptin Inhibitor Complexes Reveal Mobile Loops Gating the Active Site*. JMB, 2004. **343**(5): p. 1313-1326.
248. Stein, R.L., F. Melandri, and L. Dick, *Kinetic characterization of the chymotryptic activity of the 20S proteasome*. Biochemistry, 1996. **35**(13): p. 3899-908.
249. Shaw, E., *Cysteinyl proteinases and their selective inactivation*. Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology, 1990. **63**: p. 271-347.
250. Wang, X., et al., *SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis*. Cell (Cambridge, MA, United States), 1994. **77**(1): p. 53-62.
251. Sherwood, S.W., et al., *In vivo inhibition of cyclin B degradation and induction of cell-cycle arrest in mammalian cells by the neutral cysteine protease inhibitor N-acetylleucylleucylnorleucinal*. PNAS, 1993. **90**(8): p. 3353-7.
252. Milligan, S.A., M.W. Owens, and M.B. Grisham, *Inhibition of I $\kappa$ B- $\alpha$  and I $\kappa$ B- $\beta$  proteolysis by calpain inhibitor I blocks nitric oxide synthesis*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1996. **335**(2): p. 388-395.
253. Drenth, J., K.H. Kalk, and H.M. Swen, *Binding of chloromethyl ketone substrate analogs to crystalline papain*. Biochemistry, 1976. **15**(17): p. 3731-8.
254. Olson, J.E., et al., *Antimalarial effects in mice of orally administered peptidyl cysteine protease inhibitors*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1999. **7**(4): p. 633-638.
255. Jia, Z., et al., *Crystal structures of recombinant rat cathepsin B and a cathepsin B-inhibitor complex. Implications for structure-based inhibitor design*. JBC, 1995. **270**(10): p. 5527-33.
256. Wilcox, P.E., et al., *Substrate binding site in bovine chymotrypsin Ag. Crystallographic study using peptide chloromethyl ketones as site-specific inhibitors*. Biochemistry, 1971. **10**(20): p. 3728-38.
257. Li, Z., et al., *Anti-malarial drug development using models of enzyme structure*. Chemistry & Biology, 1994. **1**(1): p. 31-7.
258. Wasilewski, M.M., et al., *Cysteine protease inhibitors block schistosome hemoglobin degradation in vitro and decrease worm burden and egg production in vivo*. Molecular and Biochemical Parasitology, 1996. **81**(2): p. 179-189.
259. Roush, W.R., et al., *Design and synthesis of dipeptidyl a',b'-epoxy ketones, potent irreversible inhibitors of the cysteine protease cruzain*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1998. **8**(19): p. 2809-2812.
260. Engel, J.C., P.S. Doyle, and J.H. McKerrow, *Trypanocidal effect of cysteine protease inhibitors in vitro and in vivo in experimental Chagas disease*. Medicina, 1999. **59 Suppl 2**: p. 171-5.
261. Somoza, J.R., et al., *Crystal Structure of Human Cathepsin V*. Biochemistry, 2000. **39**(41): p. 12543-12551.
262. Demuth, H.U., *Recent developments in inhibiting cysteine and serine proteases*. Journal of Enzyme Inhibition, 1990. **3**(4): p. 249-78.
263. Polgar, L., *On the mode of activation of the catalytically essential sulfhydryl group of papain*. European journal of biochemistry / FEBS, 1973. **33**(1): p. 104-9.

264. Hanada, K., et al., *Studies on thiol protease inhibitors. Part I. Isolation and characterization of E-64, a new thiol protease inhibitor*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1978. **42**(3): p. 523-8.
265. Hanada, K., et al., *Studies on thiol protease inhibitors. Part II. Structure and synthesis of E-64, a new thiol protease inhibitor*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1978. **42**(3): p. 529-36.
266. Inaba, T., Y. Hirayama, and N. Fujinaga, *Inhibition of cathepsin B1 by E-64, a thiol proteinase inhibitor, and its derivatives*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1979. **43**(3): p. 655-6.
267. Sugita, H., et al., *Inhibition of epoxide derivatives on chicken calcium-activated neutral protease (CANP) in vitro and in vivo*. *Journal of Biochemistry (Tokyo, Japan)*, 1980. **87**(1): p. 339-41.
268. Towatari, T., et al., *Purification and properties of a new cathepsin from rat liver*. *Journal of Biochemistry (Tokyo, Japan)*, 1978. **84**(3): p. 659-71.
269. Yabe, Y., D. Guillaume, and D.H. Rich, *Irreversible inhibition of papain by epoxysuccinyl peptides. Carbon-13 NMR characterization of the site of alkylation*. *Journal of the American Chemical Society*, 1988. **110**(12): p. 4043-4.
270. Varughese, K.I., et al., *Crystal structure of a papain-E-64 complex*. *Biochemistry*, 1989. **28**(3): p. 1330-2.
271. Varughese, K.I., et al., *Crystal structure of an actinidin-E-64 complex*. *Biochemistry*, 1992. **31**(22): p. 5172-6.
272. Fujishima, A., et al., *The crystal structure of human cathepsin L complexed with E-64*. *FEBS letters*, 1997. **407**(1): p. 47-50.
273. Murata, M., et al., *Novel epoxysuccinyl peptides. Selective inhibitors of cathepsin B, in vitro*. *FEBS Letters*, 1991. **280**(2): p. 307-10.
274. Towatari, T., et al., *Novel epoxysuccinyl peptides. A selective inhibitor of cathepsin B, in vivo*. *FEBS Letters*, 1991. **280**(2): p. 311-15.
275. Turk, D., et al., *Crystal structure of cathepsin B inhibited with CA030 at 2.0-Å resolution: A basis for the design of specific epoxysuccinyl inhibitors*. *Biochemistry*, 1995. **34**(14): p. 4791-7.
276. Buttle, D.J., et al., *CA074 methyl ester: a proinhibitor for intracellular cathepsin B*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1992. **299**(2): p. 377-80.
277. Katunuma, N., et al., *Structure based development of novel specific inhibitors for cathepsin L and cathepsin S in vitro and in vivo*. *FEBS Letters*, 1999. **458**(1): p. 6-10.
278. Katunuma, N., et al., *Study of the functional share of lysosomal cathepsins by the development of specific inhibitors*. *Advances in Enzyme Regulation*, 1999. **39**: p. 247-260.
279. Tsuge, H., et al., *Inhibition Mechanism of Cathepsin L-Specific Inhibitors Based on the Crystal Structure of Papain-CLIK148 Complex*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999. **266**(2): p. 411-416.
280. Katunuma, N., et al., *Structure-based development of cathepsin L inhibitors and therapeutic applications for prevention of cancer metastasis and cancer-induced osteoporosis*. *Advances in Enzyme Regulation*, 2002. **42**: p. 159-172.
281. Parkes, C., A.A. Kembhavi, and A.J. Barrett, *Calpain inhibition by peptide epoxides*. *Biochemical Journal*, 1985. **230**(2): p. 509-16.
282. Schirmeister, T., *New Peptidic Cysteine Protease Inhibitors Derived from the Electrophilic  $\alpha$ -Amino Acid Aziridine-2,3-dicarboxylic Acid*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1999. **42**(4): p. 560-572.
283. Donkor, I.O., *A survey of calpain inhibitors*. *Current Medicinal Chemistry*, 2000. **7**(12): p. 1171-1188.
284. Haruta, J., et al., *Preparation of 1,3,2-dioxathiolane oxide derivatives as inhibitors of calcium-dependent, neutral protease and other enzymes*. 1991, (Japan Tobacco, Inc., Japan). Application: WO. p. 88 pp.

285. Tamai, M., et al., *An efficient synthetic method for ethyl (+)-(2S,3S)-3-[(S)-3-methyl-1-(3-methylbutylcarbamoyl)butylcarbamoyl]-2-oxiranecarboxylate (EST), a new inhibitor of cysteine proteinases*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 1987. **35**(3): p. 1098-104.
286. Giordano, C., et al., *Iodo and diiodotyrosine epoxysuccinyl derivatives as selective inhibitors of cathepsin B*. European Journal of Medicinal Chemistry, 1993. **28**(12): p. 917-26.
287. Tamai, M., et al., *In vitro and in vivo inhibition of cysteine proteinases by EST, a new analog of E-64*. Journal of Pharmacobio-Dynamics, 1986. **9**(8): p. 672-7.
288. Schaschke, N., et al., *Substrate/propeptide-derived endo-epoxysuccinyl peptides as highly potent and selective cathepsin B inhibitors*. FEBS Letters, 1998. **421**(1): p. 80-82.
289. Noda, T., et al., *Effects on cathepsin B, H, and D in pectoral muscle of dystrophic chickens (line 413) of in vivo administration of E-64-c (N-[N-(L-3-transcarboxyoxirane-2-carbonyl)-L-leucyl]-3-methyl-butylamine)*. Journal of Biochemistry (Tokyo, Japan), 1981. **90**(3): p. 893-6.
290. Yamamoto, D., et al., *Refined x-ray structure of papain.E-64-c complex at 2.1-Å resolution*. JBC, 1991. **266**(22): p. 14771-7.
291. Turk, D., et al., *Crystal structures of human procathepsin B at 3.2 and 3.3 Å resolution reveal an interaction motif between a papain-like cysteine protease and its propeptide*. FEBS Letters, 1996. **384**(3): p. 211-214.
292. Wang, K.K.W. and P.-W. Yuen, *Calpain inhibition: an overview of its therapeutic potential*. Trends in Pharmacological Sciences, 1994. **15**(11): p. 412-19.
293. McGowan, E.B., E. Becker, and T.C. Detwiler, *Inhibition of calpain in intact platelets by the thiol protease inhibitor E-64d*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1989. **158**(2): p. 432-5.
294. Stern, I., et al., *Crystal structure of NS-134 in complex with bovine cathepsin B: a two-headed epoxysuccinyl inhibitor extends along the entire active-site cleft*. Biochemical Journal, 2004. **381**(2): p. 511-517.
295. Schaschke, N., et al., *Epoxysuccinyl peptide-derived affinity labels for cathepsin B*. FEBS Letters, 2000. **482**(1,2): p. 91-96.
296. Balaji, K.N., et al., *Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation*. Journal of Experimental Medicine, 2002. **196**(4): p. 493-503.
297. Schaschke, N., et al., *b-Cyclodextrin/epoxysuccinyl peptide conjugates: a new drug targeting system for tumor cells*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2000. **10**(7): p. 677-680.
298. Schaschke, N., et al., *Epoxysuccinyl peptide-derived cathepsin B inhibitors: modulating membrane permeability by conjugation with the C-terminal heptapeptide segment of penetratin*. Biological Chemistry, 2002. **383**(5): p. 849-852.
299. Matsumoto, K., et al., *Structural basis of inhibition of cysteine proteases by E-64 and its derivatives*. Biopolymers, 1999. **51**(1): p. 99-107.
300. Greenbaum, D., et al., *Epoxide electrophiles as activity-dependent cysteine protease profiling and discovery tools*. Chemistry & Biology, 2000. **7**(8): p. 569-581.
301. Hook, V., et al., *Cathepsin L and Arg/Lys aminopeptidase: A distinct prohormone processing pathway for the biosynthesis of peptide neurotransmitters and hormones*. Biological Chemistry, 2004. **385**(6): p. 473-480.
302. Alizadeh, A.A., et al., *Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling*. Nature (London), 2000. **403**(6769): p. 503-511.
303. Bogoy, M., et al., *Selective targeting of lysosomal cysteine proteases with radiolabeled electrophilic substrate analogs*. Chemistry & Biology, 2000. **7**(1): p. 27-38.
304. Baruch, A., et al., *Defining a link between gap junction communication, proteolysis, and cataract formation*. JBC, 2001. **276**(31): p. 28999-29006.
305. Greenbaum, D., et al., *Chemical approaches for functionally probing the proteome*. Molecular and Cellular Proteomics, 2002. **1**(1): p. 60-68.
306. Greenbaum, D.C., et al., *Small Molecule Affinity Fingerprinting a Tool for Enzyme Family Subclassification, Target Identification, and Inhibitor Design*. Chemistry & Biology, 2002. **9**(10): p. 1085-1094.

307. Bogyo, M. and D. Greenbaum, *Peptide derivatives for papain cysteine hydrolase profiling, determination, inhibition, and purification*. 2002, (The Regents of the University of California, USA). Application: WO. p. 121 pp.
308. Verhelst, S.H.L. and M. Bogyo, *Solid-phase synthesis of double-headed epoxysuccinyl activity-based probes for selective targeting of papain family cysteine proteases*. *ChemBioChem*, 2005. **6**(5): p. 824-827.
309. Asgian, J.L., et al., *Aza-Peptide Epoxides: A New Class of Inhibitors Selective for Clan CD Cysteine Proteases*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2002. **45**(23): p. 4958-4960.
310. James Karen, E., et al., *Aza-peptide epoxides: potent and selective inhibitors of Schistosoma mansoni and pig kidney legumains (asparaginyl endopeptidases)*. *Biological chemistry*, 2003. **384**(12): p. 1613-8.
311. James, K.E., et al., *Design, Synthesis, and Evaluation of Aza-Peptide Epoxides as Selective and Potent Inhibitors of Caspases-1, -3, -6, and -8*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2004. **47**(6): p. 1553-1574.
312. Kato, D., et al., *A General Solid Phase Method for the Preparation of Diverse Azapeptide Probes Directed Against Cysteine Proteases*. *Organic Letters*, 2005. **7**(25): p. 5649-5652.
313. Somoza, J.R., J.T. Palmer, and J.D. Ho, *The Crystal Structure of Human Cathepsin F and Its Implications for the Development of Novel Immunomodulators*. *JMB*, 2002. **322**(3): p. 559-568.
314. Goto, T., T. Yamaza, and T. Tanaka, *Cathepsins in the osteoclast*. *Journal of Electron Microscopy*, 2003. **52**(6): p. 551-558.
315. Wang, D., et al., *Cathepsin K inhibitor-polymer conjugates: potential drugs for the treatment of osteoporosis and rheumatoid arthritis*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2004. **277**(1-2): p. 73-79.
316. Deaton, D.N. and S. Kumar, *Cathepsin K inhibitors: their potential as anti-osteoporosis agents*. *Progress in Medicinal Chemistry*, 2004. **42**: p. 245-375.
317. Turk, V., J. Kos, and B. Turk, *Cysteine cathepsins (proteases)-On the main stage of cancer?* *Cancer Cell*, 2004. **5**(5): p. 409-410.
318. Sukhova, G.K., et al., *Deficiency of cathepsin S reduces atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice*. *Journal of Clinical Investigation*, 2003. **111**(6): p. 897-906.
319. Abbenante, G. and D.P. Fairlie, *Protease inhibitors in the clinic*. *Medicinal Chemistry*, 2005. **1**(1): p. 71-104.
320. Tsujinaka, T., et al., *Synthesis of a new cell penetrating calpain inhibitor (calpeptin)*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1988. **153**(3): p. 1201-8.
321. Sakai, K., et al., *A unique specificity of a calcium activated neutral protease indicated in histone hydrolysis*. *Journal of Biochemistry (Tokyo, Japan)*, 1987. **101**(4): p. 911-18.
322. Menard, R., et al., *The specificity of the S1' subsite of cysteine proteases\**. *FEBS Letters*, 1993. **328**(1-2): p. 107-10.
323. Portaro, F.C.V., et al., *Probing the specificity of cysteine proteinases at subsites remote from the active site: analysis of P4, P3, P2' and P3' variations in extended substrates*. *Biochemical Journal*, 2000. **347**(1): p. 123-129.
324. Cotrin, S.S., et al., *Positional-scanning combinatorial libraries of fluorescence resonance energy transfer peptides to define substrate specificity of carboxydipeptidases: assays with human cathepsin B*. *Analytical Biochemistry*, 2004. **335**(2): p. 244-252.
325. Bratkovic, T., et al., *Affinity selection to papain yields potent peptide inhibitors of cathepsins L, B, H, and K*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005. **332**(3): p. 897-903.
326. St. Hilaire, P.M., et al., *Fluorescence-Quenched Solid Phase Combinatorial Libraries in the Characterization of Cysteine Protease Substrate Specificity*. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 1999. **1**(6): p. 509-523.

327. Cuerrier, D., T. Moldoveanu, and P.L. Davies, *Determination of Peptide Substrate Specificity for m-Calpain by a Peptide Library-based Approach: the importance of primed side interactions*. JBC, 2005. **280**(49): p. 40632-40641.
328. Assafa, H. and I.O. Donkor, *Synthesis and calpain inhibitory activity of  $\alpha$ -ketoester and  $\alpha$ -ketoacid tripeptides with varying lipophilic groups at the P3 position*. Abstracts of Papers, 221st ACS National Meeting, San Diego, CA, United States, April 1-5, 2001, 2001: p. MEDI-074.
329. Hashida, S., et al., *Inhibitions by E-64 derivatives of rat liver cathepsin B and cathepsin L in vitro and in vivo*. Journal of Biochemistry (Tokyo, Japan), 1980. **88**(6): p. 1805-11.
330. Kaergel, H.J., et al., *Action of cathepsin L on the oxidized B-chain of bovine insulin*. FEBS Letters, 1980. **114**(2): p. 257-60.
331. Hirao, T. and K. Takahashi, *Purification and characterization of a calcium-activated neutral protease from monkey brain and its action on neuropeptides*. Journal of Biochemistry (Tokyo, Japan), 1984. **96**(3): p. 775-84.
332. Takahashi, K., *Calpain substrate specificity*. Intracell. Calcium-Depend. Proteolysis, 1990: p. 55-74.
333. Mori, K. and H. Iwasawa, *Pheromone synthesis. XXXV. Stereoselective synthesis of optically active forms of d-multistriatin, the attractant for European populations of the smaller European elm bark beetle*. Tetrahedron, 1980. **36**(1): p. 87-90.
334. Atwell, G.J. and W.A. Denny, *Monoprotection of Alpha, Omega-Alkanediamines with the N-Benzoyloxycarbonyl Group*. Synthesis-Stuttgart, 1984(12): p. 1032-1033.
335. Ostresh, J.M., et al., *Peptide libraries: determination of relative reaction rates of protected amino acids in competitive couplings*. Biopolymers, 1994. **34**(12): p. 1681-9.
336. Khosla, M.C., R.R. Smeby, and F.M. Bumpus, *Failure sequence in solid-phase peptide synthesis due to the presence of an N-alkylamino acid*. Journal of the American Chemical Society, 1972. **94**(13): p. 4721-4.
337. Barlos, K., et al., *Preparation of protected peptide fragments using triphenylmethyl resins*. Tetrahedron Letters, 1989. **30**(30): p. 3943-6.
338. Barlos, K., et al., *Esterification of partially protected peptide fragments with resins. Synthesis of Leu15-gastrin I using 2-chlorotrityl chloride resin*. Tetrahedron Letters, 1989. **30**(30): p. 3947-50.
339. Stabach, P.R., et al., *Site-Directed Mutagenesis of all Spectrin at Codon 1175 Modulates Its m-Calpain Susceptibility*. Biochemistry, 1997. **36**(1): p. 57-65.
340. Schroder, E., et al., *X-ray crystallographic structure of a papain-leupeptin complex*. FEBS Letters, 1993. **315**(1): p. 38-42.
341. Zhao, B., et al., *Crystal structure of human osteoclast cathepsin K complex with E-64*. Nature Structural Biology, 1997. **4**(2): p. 109-111.
342. Arvidson, S., *Extracellular enzymes*. Gram-Positive Pathogens, 2000: p. 379-385.
343. Potempa, J., et al., *Degradation of elastin by a cysteine proteinase from Staphylococcus aureus*. JBC, 1988. **263**(6): p. 2664-7.
344. Shaw, L., et al., *The role and regulation of the extracellular proteases of Staphylococcus aureus*. Microbiology (Reading, United Kingdom), 2004. **150**(1): p. 217-228.
345. Teixido, M., et al., *Bicyclic Homodetic Peptide Libraries: Comparison of Synthetic Strategies for Their Solid-Phase Synthesis*. Journal of Combinatorial Chemistry, 2003. **5**(6): p. 760-768.
346. Kaiser, E., et al., *Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides*. Analytical biochemistry, 1970. **34**(2): p. 595-8.
347. Goodman, M. and M. Chorev, *On the concept of linear modified retro-peptide structures*. Accounts of Chemical Research, 1979. **12**(1): p. 1-7.
348. Csizmok, V., et al., *Primary Contact Sites in Intrinsically Unstructured Proteins: The Case of Calpastatin and Microtubule-Associated Protein 2*. Biochemistry, 2005. **44**(10): p. 3955-3964.
349. Tompa, P., *The functional benefits of protein disorder*. Theochem, 2003. **666-667**: p. 361-371.

350. Shoemaker, B.A., J.J. Portman, and P.G. Wolynes, *Speeding molecular recognition by using the folding funnel: the fly-casting mechanism*. PNAS, 2000. **97**(16): p. 8868-8873.
351. Wilmot, C.M. and J.M. Thornton, *Analysis and prediction of the different types of b-turn in proteins*. JMB, 1988. **203**(1): p. 221-32.
352. Venkatachalam, C.M., *Stereochemical criteria for polypeptides and proteins. V. Conformation of a system of three linked peptide units*. Biopolymers, 1968. **6**(10): p. 1425-36.
353. Lewis, P.N., F.A. Momany, and H.A. Scheraga, *Chain reversals in proteins*. Biochimica et Biophysica Acta, Protein Structure, 1973. **303**(2): p. 211-29.
354. Hutchinson, E.G. and J.M. Thornton, *A revised set of potentials for b-turn formation in proteins*. Protein Science, 1994. **3**(12): p. 2207-16.
355. Croall, D.E. and K.S. McGrody, *Domain structure of calpain: mapping the binding site for calpastatin*. Biochemistry, 1994. **33**(45): p. 13223-30.
356. Kato, H., et al., *A novel method for preparations of several hapten-protein conjugates*. Rinsho Kagaku Shinpojumu, 1976. **16**: p. 38-41.
357. Edsall, J.T. and J. Wyman, *Biophysical Chemistry. Vol. I. Thermodynamics, Electrostatics, and the Biological Significance of the Properties of Matter*. 1958. 699 pp.
358. Campbell, D.A. and A.K. Szardenings, *Functional profiling of the proteome with affinity labels*. Current Opinion in Chemical Biology, 2003. **7**(2): p. 296-303.
359. Kozarich, J.W., *Activity-based proteomics: enzyme chemistry redux*. Current Opinion in Chemical Biology, 2003. **7**(1): p. 78-83.
360. Eto, A., et al., *The role of the calpain-calpastatin system in thyrotropin-releasing hormone-induced selective down-regulation of a protein kinase C isoenzyme, nPKC $\epsilon$ , in rat pituitary GH4C1 cells*. JBC, 1995. **270**(42): p. 25115-20.
361. Yamazaki, T., et al., *Specific Increase in Amyloid b-Protein 42 Secretion Ratio by Calpain Inhibition*. Biochemistry, 1997. **36**(27): p. 8377-8383.
362. Kusakawa, G.-I., et al., *Calpain-dependent proteolytic cleavage of the p35 cyclin-dependent kinase 5 activator to p25*. JBC, 2000. **275**(22): p. 17166-17172.
363. Blomgren, K., et al., *Synergistic activation of Caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia. A mechanism of "pathological apoptosis"?* JBC, 2001. **276**(13): p. 10191-10198.
364. Popp, O., et al., *The calpastatin-derived calpain inhibitor CPIB reduces mRNA expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 and invasion by leukemic THP-1 cells*. Biological Chemistry, 2003. **384**(6): p. 951-958.
365. Gil-Parrado, S., et al., *Calpastatin exon 1B-derived peptide, a selective inhibitor of calpain: Enhancing cell permeability by conjugation with penetratin*. Biological Chemistry, 2003. **384**(3): p. 395-402.
366. Croce, K., et al., *Inhibition of calpain blocks platelet secretion, aggregation, and spreading*. JBC, 1999. **274**(51): p. 36321-36327.
367. Böhm, G., *CD Spectra Deconvolution* - <http://bioinformatik.biochemtech.uni-halle.de/cdnn>.
368. Machleidt, W., Assfalg-Machleidt, I. and Auerswald, E. A, *Kinetics and molecular mechanism of inhibition of cysteine proteinases by their protein inhibitors*. In *Innovations in Proteases and their Inhibitors*, ed. F.X. Aviles. 1993: Walter de Gruyter, Berlin, Germany. 179-196.
369. Morrison, J.F., *The slow-binding and slow, tight-binding inhibition of enzyme-catalyzed reactions*. Trends in Biochemical Sciences, 1982. **7**(3): p. 102-5.
370. Buntrock, R.E., *The ACS Style Guide. A Manual for Authors and Editors, 2nd ed. Edited by Janet S. Dodd*. Journal of Chemical Information and Computer Sciences. Vol. 38. 1998. 1254-1255.
371. International Union of Pure and Applied Chemistry, I.U.o.B.a.M.B., *IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature & Nomenclature Committee of IUBMB - Publications List*. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/bibliog/jcfn.html>.