

Abstract

Bile salt-activated cholesterol esterase (CEase) is a lipolytic enzyme with broad substrate specificity. The enzyme is primarily expressed in the pancreas and mammary glands of higher mammals. The major role of CEase is the duodenal digestion of dietary lipids. In addition, CEase is directly involved in the absorption of cholesteryl esters and the lipoprotein metabolism. Moreover, CEase is associated with the development of inflammatory diseases, in particular with atherosclerosis and, thus, represents an attractive target for the design of inhibitors as hypocholesterolemic and anti-atherosclerotic agents.

The presented thesis provides the development of a new fluorescence-based high throughput screening (HTS)-enabled assay to measure the activity of human, murine, bovine and porcine CEase with 4-methylumbelliferyl butyrate (4-MUB) as a substrate. Human CEase was isolated from breast milk (ehCEase), recombinant murine (mCEase) and human pancreatic CEases (full-length rhCEase), as well as truncated variants of human pancreatic CEase (Ala1-Phe518 = rhCEasePhe518; Ala1-Val532 = rhCEaseVal532) were obtained from an eukaryotic over-expression system.

Comparison of human CEase variants with regards to substrate specificity, bile salt-interaction and inhibition revealed that full-length rhCEase exhibits the same kinetic characteristics as ehCEase and is, therefore, comparable to the physiological occurring CEase. Comparison of the truncated variants with ehCEase and full-length rhCEase showed impaired activity of rhCEasePhe518 while rhCEaseVal532 exhibited similar kinetic properties to ehCEase and full-length rhCEase and is, therefore, a better choice with regards to crystallization experiments. Furthermore, a series of 17 isoindolinones was analyzed regarding their inhibition towards CEase. The most potent isoindolinones exhibited IC_{50} values in the low micromolar range and showed a residual enzymatic activity at high inhibitor concentrations. Notably, those isoindolinones bearing a 3-phenyl substituent and an unsubstituted or *ortho*-chloro-substituted 2-benzyl group exhibited the highest inhibitory potency. Further kinetic characterization of the enzyme-inhibitor interaction for the most potent isoindolinone derivatives resulted in hyperbolic mixed-type inhibition against human CEases with K_i values in the high nanomolar range. Inhibition was confirmed using a substrate with resemblance of natural substrates of CEase, i.e. 4-methylumbelliferyl oleate (4-MUO). Full-length rhCEase exhibited K_i values in the low micromolar range and a parabolic competitive type of inhibition. This exceptional inhibition type indicates the involvement of two inhibitor molecules competing with one substrate molecule at the active site of the enzyme. Unspecific, aggregate-based inhibition was excluded on the basis of experiments performed in the presence of Triton X-100. Selectivity studies using five human serine hydrolases, i.e. acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, chymotrypsin, leukocyte elastase, and thrombin, revealed a high selectivity of active isoindolinones for CEase.

The crystal structure of recombinant murine CEase was solved in collaboration with Prof. Dr. Ulrich Baumann and Dr. Swantje Borowski (Institute of Biochemistry, Department of Chemistry, University of Cologne), which provide new insights into the activation mechanism of CEase by bile salts. Mutagenesis of mCEase and subsequent kinetic analysis of the mutants utilizing a modified version of the newly developed fluorescence-based CEase assay with 4-MUO as a substrate revealed the importance of the remote bile salt-binding site.

Zusammenfassung

Gallensalz-aktivierte Cholesterolesterase (CEase) ist eine unspezifische Serinhydrolase, die ein breitgefächertes Substratspektrum aufweist. Dieses lipolytische Enzym wird vor allem von den Acinuszellen des Pankreas und Milchdrüsen höherer Säugetiere synthetisiert. Die Hauptaufgabe der CEase ist die Katalyse des Verdauens von Nahrungslipiden. Weiterhin ist CEase an der Absorption von Cholesterylestern und am Stoffwechsel von Lipoproteinen beteiligt. CEase wird in Verbindung mit proatherogenen und proinflammatorischen Prozessen gebracht. In diesem Zusammenhang spielt CEase eine besondere Rolle bei der Entstehung von Atherosklerose und stellt daher eine attraktive Zielstruktur für die Entwicklung niedermolekularer Inhibitoren dar, die als potentielle anti-atherosklerotisch wirksame Agentien eingesetzt werden könnten.

Die vorliegende Arbeit umfasst die Entwicklung eines fluoreszenz-basierten hochdurchsatzfähigen-Screening (HTS) – Assays mit dem fluorogenen Substrat 4-Methylumbelliferylbutyrat (4-MUB), um sowohl die Aktivität als auch die Hemmung der CEase von Mensch, Maus, Rind und Schwein zu bestimmen. Das endogene menschliche Enzyme (ehCEase) wurde aus Muttermilch isoliert. Rekombinante pankreatisch murine (mCEase) und humane CEase, (full-length rhCEase) als auch verkürzte Varianten der humanen CEase (Ala1-Phe518 = rhCEasePhe518; Ala1-Val532 = rhCEaseVal532), wurden mittels eines eukaryotischen Überexpressionssystems gewonnen.

Der Vergleich der humanen CEase-Varianten hinsichtlich Substratspezifität, Wechselwirkung mit Gallensalzen und Hemmung ergab, dass full-length rhCEase dieselben kinetischen Eigenschaften aufweist wie ehCEase und daher vergleichbar mit dem natürlich vorkommenden Enzym ist. Die verkürzten humanen CEase-Varianten wurden ebenfalls mit ehCEase und full-length rhCEase verglichen, wobei eine verminderte Aktivität von rhCEasePhe518 gezeigt wurde. rhCEaseVal532 wies ähnliche kinetische Eigenschaften wie ehCEase und full-length rhCEase auf und stellt daher eine bessere Wahl in Bezug auf Kristallisationsexperimente dar.

Eine Serie von 17 Isoindolinonen wurde auf ihre Fähigkeit CEase Aktivität zu hemmen getestet. Die potentesten Isoindolinone zeigten IC_{50} -Werte im niederen mikromolaren Bereich und wiesen enzymatische Restaktivität bei sehr hohen Inhibitorkonzentrationen auf. Insbesondere diejenigen Isoindolinone, die einen 3-Phenyl-Substituenten oder einen unsubstituierten bzw. *ortho*-Chlor-substituierten 2-Benzylrest besitzen, zeigten die höchste inhibitorische Potenz. Charakterisierung der Enzym-Inhibitor-Wechselwirkung, d.h. Bestimmung von K_i -Werten (Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes) und Art der Hemmung, für die potentesten Isoindolinonderivate, ergab hyperbol-gemischte-Hemmung gegenüber CEase mit K_i -Werten im hohen nanomolaren Bereich. Die Hemmung wurde unter Verwendung von 4-Methylumbelliferonoleat (4-MUO), einem Substrat, welches natürlich

vorkommenden Substraten ähnelt, bestätigt. Full-length rhCEase wies K_i -Werte im niedrig mikromolaren Bereich und eine parabol kompetitive Hemmung auf. Dieser außergewöhnliche Hemmtyp beschreibt die Beteiligung von zwei Inhibitormolekülen, die mit einem Substratmolekül an dem aktiven Zentrum des Enzyms konkurrieren. Unspezifische, durch Aggregation des Inhibitors induzierte Hemmung, konnte mit Hilfe einer modifizierten Variante des oben beschriebenen Assays und Triton X-100 ausgeschlossen werden. Selektivitätsstudien mit fünf anderen humanen Serinhydrolasen, d. h. Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase, Chymotrypsin, Leukozytenelastase und Thrombin, resultierten in einer hohen Selektivität der aktivsten Isoindolinone gegenüber CEase.

Die Kristallstruktur der rekombinanten mCEase wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Ulrich Baumann und Dr. Swantje Borowski (Institut für Biochemie, Institut für Chemie, Universität zu Köln) etabliert und verschafft neue Einblicke in den Aktivierungsmechanismus von mCEase mit primären Gallensalzen. Mit Hilfe von Mutationen einzelner Aminosäuren an der „remote bile salt-binding site“ wurde der Einfluss auf die Aktivität und der Aktivierungsmechanismus studiert. Hierzu wurde der neu entwickelte Fluoreszenz-Assay modifiziert, indem als Substrat 4-Methylumbelliferyloleat (4-MUO) verwendet wurde. Durch die kinetische Charakterisierung und den Vergleich zwischen mCEase Wildtyp *versus* mCEase Mutanten wurde die Wichtigkeit der Gallensalzbindungsstelle erörtert und der Einfluss auf die Aktivierung von CEase durch diese gezeigt.