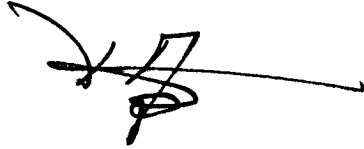


19. Dez. 1994

Diss. ETH Nr. 10813



**Zum Mechanismus der durch Pepsin katalysierten Automerisierung  
des Tripeptids L-Leucyl-L-leucyl-L-leucin**

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels  
Doktor der Naturwissenschaften  
der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE  
ZÜRICH

vorgelegt von  
CLAUDIA PEDRONI  
dipl. Chem. ETH  
geboren am 11. Mai 1964  
von Mergoscia /TI

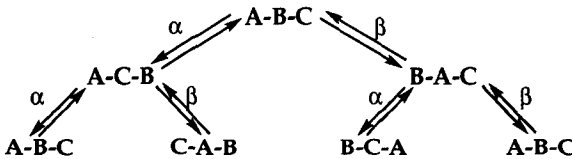
Angenommen auf Antrag von  
Prof. Dr. D. Arigoni, Referent  
PD. Dr. B. Jaun, Korreferent

Zürich 1994

## Zusammenfassung

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war die Beobachtung von Tedford<sup>5</sup>, wonach die Umsetzung einer regiospezifisch mit  $^{13}\text{C}$ -markierten Probe von Leu-Leu-Leu mit dem Enzym Pepsin eine Automerisierungsreaktion auslöst, die einer Zufallsverteilung des ursprünglichen Markierungsmusters entgegenstrebt.

Spätere Arbeiten von Labaudinière<sup>80</sup> bestätigten diesen Befund. Die massenspektroskopisch vorgenommene Verfolgung der Zeitabhängigkeit dieser Automerisierungsreaktion lieferte Resultate, welche dahingehend interpretiert wurden, dass die Automerisierung von Leu-Leu-Leu nach zwei parallelen Mechanismen abläuft, die im nachstehenden Schema als Weg  $\alpha$  und  $\beta$  festgehalten werden.



Im Anschluss daran stellte Geijsen<sup>82</sup> das Substrat Leu<sup>13,18</sup>-Leu-Leu her und zeigte NMR-spektroskopisch, dass dessen Umsetzung mit Pepsin Tripeptidspezies lieferte, deren mittlere und C-terminale Aminosäuren sowohl  $^{13}\text{C}$ - als auch  $^{18}\text{O}$ -markiert waren.

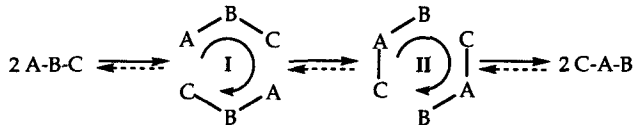
Im Lichte des obigen Automerisierungsschemas musste dieser Befund als Beweis für das Auftreten eines kovalent gebundenen Zwischenproduktes im Laufe der pepsinkatalysierten Reaktion gedeutet werden. Die Bedeutung dieses Resultates hängt kritisch von der Gültigkeit des angegebenen Schemas ab. Es schien deshalb angebracht, das Schema für die beobachtete Automerisierung einer unabhängigen Prüfung zu unterziehen.

Im Bestreben einen unabhängigen, NMR-spektroskopischen Nachweis für das Fortschreiten der Automerisierungsreaktion zu entwickeln, wurden Bedingungen ausgearbeitet, die es erlauben, unter Beibehaltung der ursprünglichen kinetischen Parameter, eine Bevorzugung des Automerisierungsvorganges bei geringerer Enzymkonzentration zu erreichen.

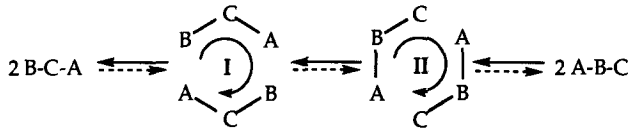
Zur Untersuchung der Regiospezifität von Bruch und Bildung von Peptidbindungen im Laufe dieser Automerisierungsreaktion wur-

den sechs spezifisch, in strategischen Stellungen mit  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$  markierte Proben des Tripeptids Leu-Leu-Leu hergestellt und mit Pepsin umgesetzt. Die erhaltenen Resultate widersprechen dem von Labaudinière aufgestellten Schema und führen zu einer neuen Interpretation der Automerisierungsreaktion, die nachstehend schematisch veranschaulicht ist.

$\alpha$ -Reaktion:



$\beta$ -Reaktion:



Diese Resultate belegen zudem, dass die Spezies zweiter Generation schneller gebildet werden als auf Grund der Gesetzmässigkeit einer zufälligen Verteilung zu erwarten wäre. Daraus folgt zwingend, dass die automerisierten Substratmoleküle nach dem ersten turnover zum Teil in der katalytischen Stelle verbleiben und mit unprozessierten Substratmolekülen aus der Lösung auf die geschilderte Art und Weise in Wechselwirkung treten.

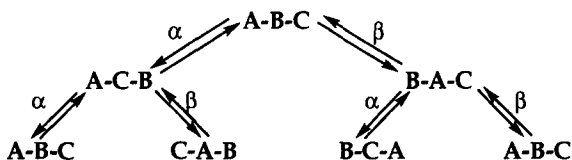
Dieses neue Schema erlaubt aber nicht mehr, die Ergebnisse von Geijsen als bindenden Hinweis für die kovalente Wirkungsweise des Pepsins zu interpretieren, denn auch ein nach einer allgemeinen Säure-Basen Katalyse wirkender Mechanismus würde mit diesen Ergebnissen im Einklang stehen.

Um eine Unterscheidung zwischen den zwei Reaktionsmodi herbeizuführen, wurde die trimarkierte Spezies Leu $^{13}$ -Leu-Leu $^{18,18}$  hergestellt und mit Pepsin umgesetzt. Die in den Zeitabständen vorgenommene massenspektroskopische Bestimmung der Isotopenzusammensetzung des Reaktionsgemisches zeigte überraschend eine zunehmende Abnahme der  $^{18}\text{O}$ -Markierung. Da das Auswaschen der  $^{18}\text{O}$ -Markierung rascher als die Automerisierung erfolgte, war der Nachweis der kritischen Spezies verunmöglicht, und damit die angestrebte Aufklärung der katalytischen Wirkungsweise von Pepsin einmal mehr verhindert.

## Summary

The starting point for this project was Tedford's<sup>5</sup> observation that treatment of a regiospecifically  $^{13}\text{C}$ -labelled specimen of the tripeptide Leu-Leu-Leu with pepsin causes an automerisation reaction which eventually results in a random distribution of the original label.

In later work, Labaudinière<sup>80</sup> attempted to follow the kinetics of the automerisation process by mass spectrometric techniques; the results were interpreted as being the consequence of the operation of two parallel pathways  $\alpha$  and  $\beta$ , which are described in the following diagram :



Subsequently, Geijsen<sup>82</sup> synthesized a doubly labelled substrate Leu<sup>13,18</sup>-Leu-Leu and showed by NMR-spectroscopy that its transformation by pepsin produces automerised species in which the middle as well as the carboxyterminal unit still carry the  $^{13}\text{C}$  and the  $^{18}\text{O}$  label.

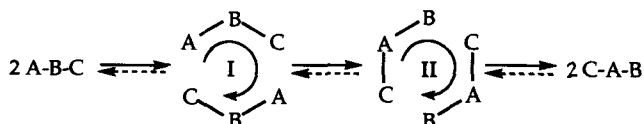
On the basis of the Labaudinière scheme this result can be taken as a demonstration that pepsin operates by a mechanism which involves formation of a covalently bound intermediate. Since the significance of this proof depends critically on the validity of the underlying automerisation model, it was felt mandatory to submit this model to an independent experimental verification.

First, new experimental conditions were worked out which allow the automerisation reaction to be carried out with a less concentrated enzyme solution and this in turn made it possible to follow the process by NMR techniques.

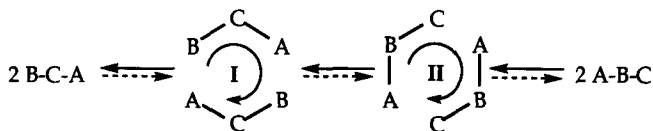
In order to determine the regiospecificity of breaking and formation of peptide bonds during the automerisation reaction it was next necessary to synthesize specimens of the substrate labelled regiospecifically with  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  in strategic positions. The results

obtained upon incubation of six such substrates with pepsin are not in accord with the original Labaudinière scheme; rather, they suggest for the automerisation reaction the parallel operation of the two schemes indicated below:

Reaction  $\alpha$ :



Reaction  $\beta$ :



In addition, the new results also demonstrate that the second generation species are produced faster than expected on statistical ground; this implies that after the first turnover some of the automerised molecules do not leave the catalytic site but interact by a similar scheme with molecules from the original starting material.

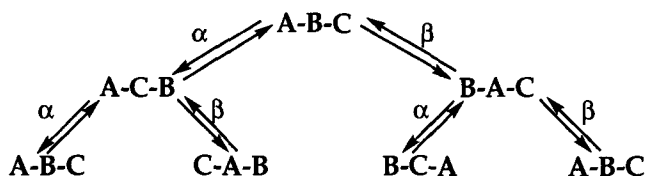
Within the framework of the new model the results of Geijsen's investigation can no longer be taken as proof for a covalent mode of action of pepsin, since they are equally well explained by a mechanism involving general acid-base catalysis.

In a final attempt to discriminate between the two possible mechanisms, a specimen of Leu<sup>13</sup>-Leu-Leu<sup>18,18</sup> was synthesized and submitted to the automerisation reaction since the covalent, but not the alternative mechanism, predicts the formation of a product labelled with both <sup>13</sup>C and <sup>18</sup>O in its terminal carboxylgroup. Unfortunately, analysis of the reaction mixture obtained after different reaction times showed that the <sup>18</sup>O label of the starting material decrease continually at a rate which is faster than the one of the automerisation reaction. Accordingly, failure to detect the critical species does not allow unequivocal conclusions to be drawn and the problem of the mechanistic basis for the catalytic action of pepsin remains veiled.

## Compendio

Questo lavoro trae spunto dalle osservazioni di Tedford<sup>5</sup>, secondo cui, esponendo prolungatamente all'azione della pepsina il tripeptide Leu-Leu-Leu marcato regiospecificamente con  $^{13}\text{C}$ , il marchio originale subisce una distribuzione statistica.

Successivi lavori di Labaudinière<sup>80</sup> confermano questo fatto. L'osservazione del processo di automerizzazione in funzione del tempo tramite spettroscopia di massa ha fornito risultati la cui interpretazione ha portato all'elaborazione di uno schema di principio secondo il quale l'automerizzazione avviene per due vie parallele  $\alpha$  e  $\beta$  indicate qui sotto.



Più tardi Geijsen<sup>82</sup> ha sintetizzato il sostrato doppiamente marcato Leu<sup>13,18</sup>-Leu-Leu e ha dimostrato per spettroscopia NMR che l'automerizzazione produce tripeptidi marcati doppiamente con  $^{13}\text{C}$  e  $^{18}\text{O}$  sia sull'unità centrale che su quella carbossiterminale.

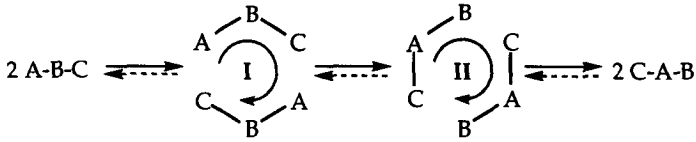
Nell'ambito dello schema di Labaudinière questo risultato va interpretato come prova che il modo d'azione della pepsina mette in gioco intermedi legati sull'enzima in modo covalente. Poiché l'interpretazione di questo risultato dipende eminentemente dalla validità dello schema riportato, si è ritenuto opportuno sottoporre tale schema ad una verifica indipendente.

Anzitutto sono state elaborate condizioni che permettono di eseguire la reazione di automerizzazione con soluzioni d'enzima più diluite che, di riscontro, rendono possibile l'impiego della spettroscopia NMR per registrare queste trasformazioni.

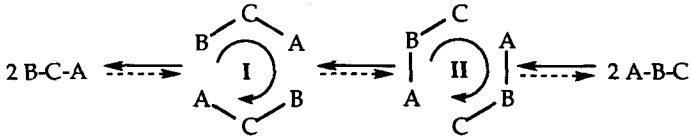
Per poter determinare la regiospecificità della rottura e della formazione di legami peptidici nel corso della reazione di automerizzazione, si è resa necessaria la sintesi di sei tripeptidi Leu-Leu-Leu marcati in modo specifico con  $^{13}\text{C}$  e  $^{15}\text{N}$  in posizioni strategiche, che sono poi stati sottoposti all'azione della pepsina. I

risultati così ottenuti sono in disaccordo con lo schema proposto da Labaudinière e suggeriscono in sua vece il modello seguente:

Reazione  $\alpha$ :



Reazione  $\beta$ :



Questi risultati mostrano inoltre che le specie di seconda generazione vengono prodotte più velocemente di quanto lo permettano le leggi della casualità, da cui si deve dedurre che dopo il primo riassetto alcune molecole automerizzate non lasciano il centro catalitico ma interagiscono con molecole originali secondo lo schema descritto.

Proiettati nel nuovo modello i risultati di Geijsen non rappresentano più la prova inequivocabile della catalisi covalente esercitata dalla pepsina in quanto diventano compatibili anche con una catalisi acido-basica generale.

Per tentare di trovare una prova atta a differenziare tra i due meccanismi, il sostrato  $\text{Leu}^{13}\text{-Leu-Leu}^{18,18}$  è stato sintetizzato e sottoposto all'automerizzazione in quanto solo il meccanismo covalente, ma non quello alternativo, è compatibile con la formazione di un prodotto di automerizzazione a doppio marchio  $^{13}\text{C}$  e  $^{18}\text{O}$  sul gruppo carbossilico. Inaspettatamente l'analisi MS del miscuglio di reazione isolato a scadenze diverse mostra chiaramente che la velocità di scambio dell'ossigeno marcato supera nettamente quella della reazione di automerizzazione. La conseguente impossibilità intrinseca di dimostrare la presenza della specie richiesta vanifica gli sforzi intrapresi per elucidare il principio d'azione del modo catalitico della pepsina.