

## Versuche zur Anwendung von Thermitase als Katalysator zur Knüpfung der Peptidbindung

Vorläufige Mitteilung

Andreas Könnecke\* und Hans-Dieter Jakubke

Sektion Biowissenschaften der Karl-Marx-Universität, Bereich Biochemie,  
DDR-7010 Leipzig, Deutsche Demokratische Republik

(Eingegangen 12. Februar 1981. Angenommen 24. April 1981)

*Attempts for the Application of Thermitase as a Catalyst for Peptide Bond  
Formation (Short Communication)*

The utility of thermitase, a thermophilic proteolytic enzyme from *Thermoactinomyces vulgaris*, as a catalyst for peptide synthesis has been studied using several N<sup>z</sup>-benzyloxycarbonyl dipeptide esters as carboxyl components and Leu-NH<sub>2</sub> as nucleophile. Couplings were most successful with substrates containing Met, Leu, Ala, Phe, Tyr in P<sub>1</sub>-position, and Val, Ala, Pro in P<sub>2</sub>, whereas the substrates with Val, Ile, Pro in P<sub>1</sub> failed to couple.

(*Keywords: Enzymatic peptide synthesis; Thermitase*)

Ein Nachteil der in den letzten Jahren wieder intensiver bearbeiteten Peptidsynthese mit Hilfe proteolytischer Enzyme<sup>1</sup> besteht darin, daß durch die Substratspezifität der Proteasen die generelle Anwendbarkeit im Sinne chemischer Kupplungsmethoden, die die Verknüpfung praktisch aller Aminosäuren miteinander gestatten, limitiert wird. Komplementär zum universellen Einsatz chemischer Kupplungsmethoden wäre ein Satz proteolytischer Enzyme unterschiedlicher Substratspezifität, mit dessen Hilfe ebenfalls die verschiedensten Kupplungen enzymkatalysiert und damit racemisierungsfrei realisierbar wären. Dies dürfte der Hauptgrund dafür sein, daß jüngst eine Vielzahl von Proteasen (Chymotrypsin<sup>2</sup>, Trypsin<sup>3</sup>, Papain<sup>4</sup>, Pepsin<sup>5</sup>, Thermolysin<sup>6</sup>, Subtilisin<sup>7</sup>, Carboxypeptidase Y<sup>8</sup>, mikrobielle Proteasen<sup>9</sup>, Metalloproteinasen<sup>10</sup> u. a.) auf ihre Eignung zur Knüpfung von Peptidbindungen eingehender geprüft wurden.

Hier berichten wir über erste Ergebnisse mit Thermitase, einer thermophilen Protease vom Serintyp aus *Thermoactinomyces vulgaris*<sup>11</sup>,

über deren Substratspezifität bisher nur wenig bekannt ist<sup>12</sup>. Die hohe esterolytische Aktivität dieses Enzyms<sup>12</sup> verhiess eine schnelle Acylenzymbildung und damit auch erfolgversprechende Versuche zur Knüpfung der Peptidbindung ausgehend von N-geschützten Peptidestersubstraten als Carboxykomponenten. Daher haben wir eine Reihe von N<sup>z</sup>-Benzyloxycarbonyl-dipeptid-methylestern bei der Thermitase-katalysierten Kupplung mit Leu-NH<sub>2</sub> als Nucleophil untersucht.

Tabelle 1. *Thermitase-katalysierte Synthese von Benzyloxycarbonyl-tripeptidamiden aus den entsprechenden Benzyloxycarbonyl-dipeptidmethylestern und Leucinamid*

Carboxykomponente	Ausb. (%)	Carboxykomponente	Ausb. (%)
Z-Gly-Ala-OMe	0	Z-Leu-Pro-OMe	0
Z-Leu-Ala-OMe	10	Z-Gly-Phe-OMe	3
Z-Val-Ala-OMe	47	Z-Leu-Phe-OMe	13
Z-Leu-Val-OMe	0	Z-Ala-Phe-OMe	30
Z-Leu-Leu-OMe	16	Z-Pro-Phe-OMe	65
Z-Ala-Leu-OMe	39	Z-Ala-Tyr-OMe	13
Z-Leu-Ile-OMe	0	Z-Leu-Tyr-OMe	23
Z-Leu-Met-OMe	53		

Die in Tab. 1 zusammengefaßten Resultate wurden unter folgenden experimentellen Standardbedingungen erhalten: 0,2 mmol N-geschützter Dipeptid-ester und 0,4 mmol Leu-NH<sub>2</sub> sowie 2 mg Thermitase wurden in einem Zweiphasensystem<sup>13</sup> aus 0,5 ml CCl<sub>4</sub> und 1,5 ml Tris-Puffer (0,2 M, 5 mM-CaCl<sub>2</sub>, pH 8,1) für 3 h intensiv gerührt. Das ausgefallene Produkt wurde auf einer gewogenen Glasfritte abgesaugt, alternierend mit 1 N-HCl, gesätt. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und Wasser gewaschen und i. Vak. getrocknet. Nach Überprüfung der Einheitlichkeit des Produktes (DC) wurde die Ausbeute gewichtsmäßig bestimmt ( $\pm 5\%$ ); die Ausbeuten sind Mittelwerte aus mindestens zwei Versuchen.

Die ermittelten Ausbeuten bei der Thermitase-katalysierten Synthese der Modellpeptide liegen allgemein niedrig und überschreiten nur selten 50% d. Th. (Tab. 1). Die angewandten experimentellen Bedingungen können insofern als optimal bezeichnet werden, da zahlreiche Parallelversuche mit a) verdreifachter Enzymmenge, b) größerem Überschuß an Nucleophil sowie c) mit Wasser mischbaren Cosolventien (Dimethylformamid, Methanol) zu keiner Ausbeuteverbesserung, im Falle von c) sogar zur Verschlechterung der Ausbeuten führten. Versuche in der Nähe des Temperaturoptimums der Thermitase (55 °C) brachten neben der Verkürzung der Reaktionszeit auf ca. ein Viertel bis ein Drittel der bei Raumtemperatur zur vollständigen Umsetzung der Estersubstrate notwendigen Zeit keine höheren Ausbeuten. Die Ver-

wendung von Gly-NH<sub>2</sub> bzw. Ala-NH<sub>2</sub> als Nucleophil hatte ein deutliches Absinken der Ausbeuten im Vergleich zu Leu-NH<sub>2</sub> zur Folge. Bei Experimenten mit einem zehnfachen Überschuß an Leu-NH<sub>2</sub> sanken die Produktausbeuten signifikant, und es kam zur Bildung von Nebenprodukten bisher ungeklärter Natur. Auch die Umsetzung von *Z*-Ala-Ala-*OMe* ergab kein einheitliches Produkt; nach Kristallisation aus Methanol/Wasser waren noch zwei verschiedene Reaktionsprodukte nachweisbar, deren nähere Charakterisierung aussteht.

Die Resultate aus Tab. 1 erlauben folgende Rückschlüsse bezüglich der Eignung von Thermitase als Biokatalysator für die Knüpfung der Peptidbindung: a) In der *Z*-Leu-*Xxx-OMe*-Serie sinken die Ausbeuten der Kupplungen in der Reihe *Xxx* = Met > Tyr > Leu > Phe > Ala. Aus verschiedenen Syntheseansätzen konnte die entsprechende N-geschützte Dipeptidsäure, z. B. *Z*-Leu-Phe-OH<sup>14</sup>, in guten Ausbeuten isoliert und charakterisiert werden. Die Substrate mit *Xxx* = Val, Ile und Pro lieferten kein Produkt und wurden im Gegensatz zu den anderen Substraten nur partiell hydrolysiert. Dies stimmt mit der geringen Reaktivität dieser Substrate bei der Thermitase-katalysierten Esterhydrolyse überein. Bei pH 8 und 55 °C in Gegenwart von 30% (*v/v*) Dimethylformamid beträgt z. B. für *Z*-Ala-Phe-*OMe*  $k_{\text{cat}}/K_M$  690 000 M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> ( $k_{\text{cat}}$  13 800 s<sup>-1</sup>), für *Z*-Leu-Ile-*OMe* dagegen nur 790 M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> (3 s<sup>-1</sup>)<sup>15</sup>. Damit ist der mögliche Einsatzbereich des Enzyms auf Grund seiner Primärspezifität zumindest vorläufig abgegrenzt. b) Wie schon kinetische Studien zur Esterhydrolyse zeigten<sup>15</sup>, ist besonders die ausgeprägte Sekundärspezifität des Enzyms bemerkenswert und dokumentiert sich gleichfalls bei den Syntheserversuchen. Bei den Substraten *Z*-*Xxx*-Phe(Ala)-*OMe* läßt sich folgende Reihung der P<sub>2</sub>-Spezifität für die Synthesen aufstellen: Pro ≈ Val > Ala > Leu > Gly.

Die hohen  $k_{\text{cat}}$ -Werte der meisten mit Erfolg zur Synthese eingesetzten Substrate bei der Esterhydrolyse sind einer hohen Reaktivität der jeweiligen Acylenzyme gegenüber Wasser bzw. Hydroxylionen gleichzusetzen. Das Reaktivitäts-Selektivitäts-Prinzip legt daher nahe, daß die um das Acylenzym konkurrierenden Reaktionen der Hydrolyse und Aminolyse trotz der höheren Nucleophilie der Aminokomponente wenig spezifisch nebeneinander ablaufen können, wobei oft die Hydrolyse infolge der hohen Wasserkonzentration die Oberhand gewinnt. Damit finden die niedrigen Syntheseausbeuten eine Erklärung. Beim Chymotrypsin, dessen esterolytische Aktivität weniger ausgeprägt ist, dominiert die Aminolyse und damit die Peptidsynthese<sup>13, 16</sup>, die hydrolytische Spaltung des Acylenzyms spielt hierbei eine untergeordnete Rolle<sup>16</sup>. Wie für das Chymotrypsin gezeigt, hängt das Verhältnis von Hydrolyse zu Aminolyse des Acylenzyms sowohl vom angreifenden Nucleophil als auch vom Acylteil des Acylenzyms ab<sup>16</sup>. Darüber hinaus

dürfte auch der Charakter der S'-Bindungsregion am Enzym von Bedeutung sein. Bei der Thermitase und bei anderen Enzymen mit ausgeprägter esterolytischer Wirkung (z. B. Subtilisine) scheint viel leichter Wasser in diese Region gelangen zu können als beim Chymotrypsin, das sich durch eine sehr hydrophobe Substratbindungstasche auszeichnet. Damit ließe sich die leichte hydrolytische Spaltung der Acylenzyme und folglich das für die Peptidsynthese ungünstige Verhältnis zwischen Hydrolyse und Aminolyse bei der Thermitase erklären.

### Dank

Den Herren Prof. Dr. H. Rutloff, Zentralinstitut für Ernährung der AdW der DDR, Potsdam-Rehbrücke, und Doz. Dr. R. Kleine, Institut für physiologische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, danken wir für die Bereitstellung von Thermitase sowie Frau W. Wenger für die technische Mitarbeit.

### Literatur

- 1 Isowa Y., Yuki Gosei Kagaku Kyokaiishi **36**, 195 (1978); Chem. Abstr. **89**, 18456 (1978).
- 2 Morihara K., Oka T., Biochem. J. **163**, 531 (1977); Oka T., Morihara K., J. Biochem. **84**, 1277 (1978); Homandberg G. A., Mattis J. A., Laskowski M., jr., Biochemistry **17**, 5220 (1978); Kuhl P., Posselt S., Jakubke H.-D., Pharmazie, im Druck.
- 3 Oka T., Morihara K., J. Biochem. **82**, 1055 (1977); Inouye K., Watanabe K., Morihara K., Tochino Y., Kanaya T., Emura J., Sakakibara S., J. Amer. Chem. Soc. **101**, 751 (1979).
- 4 Jost R., Brambilla E., Monti J. C., Luisi P. L., Helv. Chim. Acta **63**, 375 (1980); Döring G., Kuhl P., Jakubke H.-D., Mh. Chem., im Druck.
- 5 Saltman R., Vlach D., Luisi P. L., Biopolymers **16**, 631 (1977).
- 6 Isowa Y., Ohmori M., Ichikawa T., Kurita H., Sato M., Mori K., Bull. Chem. Soc. Jap. **50**, 2762 (1977).
- 7 Isowa Y., Ohmori M., Sato M., Mori K., Bull. Chem. Soc. Jap. **50**, 2766 (1977).
- 8 Widmer F., Johansen J. T., Carlsberg. Res. Commun. **44**, 37 (1979).
- 9 Morihara K., Oka T., Tsuzuki H., Tochino Y., Kanaya T., Biophys. Biochem. Res. Commun. **92**, 396 (1980).
- 10 Isowa Y., Ichikawa T., Ohmori M., Bull. Chem. Soc. Jap. **51**, 271 (1978).
- 11 Behnke U., Schalınatus E., Rutloff H., Höhne W. E., Frömmel C., Acta Biol. Med. Germ. **37**, 1185 (1978); Kleine R., Rothe U., Acta Biol. Med. Germ. **36**, K 27 (1977).
- 12 Behnke U., Kleine R., Ludewig M., Rutloff H., Gröger L., Acta Biol. Med. Germ. **37**, 1205 (1978).
- 13 Kuhl P., Könnecke A., Döring G., Däumer H., Jakubke H.-D., Tetrahedron Lett. **1980**, 893; Könnecke A., Bullerjahn R., Jakubke H.-D., Mh. Chem. **112**, 469 (1981).
- 14 Weygand F., Prox A., König W. A., Chem. Ber. **99**, 1451 (1966).
- 15 Kleine R., Rothe U., Könnecke A., Jakubke H.-D., Acta Biol. Med. Germ., im Druck.
- 16 Fersht A. R., Blow D. M., Fastrez J., Biochemistry **12**, 2035 (1973).