

Thema: P r o t e a s e n

I Definition und Nachweis

Die historisch gewachsene Definition „Proteasen sind Enzyme, die Proteine spalten“ ist heute in dieser Form nicht mehr haltbar, dennoch wird der Begriff weiter benutzt. Man sollte besser vom Oberbegriff Peptidasen ausgehen. Peptidasen sind alle Enzyme, welche die Spaltung von Peptidbindungen zu katalysieren vermögen. Innerhalb dieser Gruppe der Peptidasen kann zwischen den **Endopeptidasen** (den Proteasen im herkömmlichen Sinne) und den **Exopeptidasen** unterschieden werden. Als Beispiel für eine Endopeptidase sei hier das Trypsin vorgestellt: Trypsin spaltet eine Proteinkette an allen sterisch zugänglichen Peptidbindungen, an denen die Aminosäuren Arginin oder Lysin beteiligt sind (vgl. **Fig. 1**).

Bei den Exopeptidasen kann man zwei Gruppen unterscheiden: die **Amino-peptidasen**, welche vom Aminoende des Proteins her sukzessive eine Aminosäure nach der anderen abspalten, und die **Carboxypeptidasen**, die in gleicher Weise verfahren, die Aminosäuren aber vom Carboxylende her abspalten (vgl. **Fig. 2**).

Die Spaltung der Peptidbindung ist ein exothermer Vorgang; das Enzym setzt lediglich die Aktivierungsenergie der Hydrolysereaktion herab.

Nachweis-Methoden für Proteasen beruhen in der Regel darauf, daß man ein Substrat, also ein bestimmtes Protein, vorlegt, das Enzym einwirken läßt und entweder die Menge der Spaltprodukte oder die Menge des nicht gespaltenen Substrates bestimmt. Als Bezugsgröße dient dann jeweils die Zeiteinheit. Als eine Möglichkeit zum Proteasenachweis soll die Gelatineverflüssigung durch die Protease Trypsin gezeigt werden. (*Demonstrationsversuch*)

Eine sehr elegante, halbquantitative Methode zum Nachweis von Proteasen ist die Radialdiffusion (1). (*Demonstrationsversuch*) Man beschichtet hierbei Objekt-träger mit einem Agar-Gel, in welches man ein Protease-Substrat (hier: Casein) einbettet. In das Agar-Gel werden kleine Löcher eingestanzt. Die auf Protease zu testende Lösung wird in diese Löcher gefüllt; anschließend läßt man die Platte in einer feuchten Kammer ca. 14 Stunden bei Raumtemperatur stehen. Nach Reaktionsende taucht man die Plättchen in Trichloressigsäure oder gibt sie in ein Färbebad mit üblichen Proteinfarbstoffen (Amidoschwarz, Coomassie Blue u. a.). Die Lysezonen der Protease können mit der Overhead-Projektion bei beiden Verfahren demonstriert werden (vgl. **Fig. 3**).

Ein bedeutsames Gebiet der **Anwendung von Proteasen** sind die Waschmittel. Otto Röhm aus Darmstadt erhielt schon 1913 ein Patent für den Einsatz von Pankreasenzymen in Waschmitteln; heute werden hierfür meist Bakterien-Enzyme benutzt (2). Der Nachweis von Proteasen in Waschmitteln kann mit einem anwendungsorientierten Versuch erfolgen: Man „wäscht“ blutverschmutzte, bei 50°C getrocknete Leinenlappen zum einen mit einer proteasehaltigen Waschlauge (z.B. BURTI der Firma Röhm), zum anderen mit der gleichen, jedoch gekochten, Waschlauge. Es zeigt sich beim proteasehaltigen Waschmittel eine bessere Reinigungswirkung. *(Demonstrationsversuch)*

II Vorkommen

Das Vorkommen von Proteasen im Verdauungstrakt ist jedem bekannt (vgl. **Fig. 4**). Die „Verdauung“ von Nahrungseiweiß erfolgt zunächst im Magen bei saurem pH-Wert und anschließend im Zwölffingerdarm und im Dünndarm bei alkalischem pH-Wert. Die Enzyme im Magen (Pepsin) und im Dünndarm (Trypsin, Chymotrypsin, Carboxypeptidasen u. a. m.) sind, wie mit folgendem Versuch *(Demonstrationsversuch)* gezeigt werden kann, an die pH-Werte ihrer Wirkungsstätten angepaßt. Man gibt zu diesem Zweck in Reagensgläser Streifen von belichtetem und entwickeltem Film (*Das Verfahren wird dem Freiburger Chemiker Kurt Wallenfels zugeschrieben, eine Literaturstelle ist nicht bekannt.*), sowie Pufferlösungen mit verschiedenen pH-Werten zu. In einer Testreihe setzt man jeweils die gleiche Menge Pankreatin zu, in einer zweiten Testreihe wird Pepsin zugesetzt. Nach Inkubieren bei 50°C zeigen die Pankreatin-Ansätze bei pH 7 und pH 9 eine starke Proteolyse durch intensive Schwarzfärbung an. Die Schwarzfärbung wird durch die Spaltung der Gelatineschicht bewirkt, in welche bei Filmen die lichtempfindlichen Substanzen eingebettet sind. Bei pH 4 zeigt sich beim Pankreatin-Ansatz keine Reaktion. Bei Pepsin ist dagegen bei pH 1 und pH 4 eine schwache Proteolyse nachweisbar, bei pH 7 zeigt sich dagegen keine Reaktion. Pankreas-Enzyme spalten also im schwach alkalischen Milieu optimal, Pepsin dagegen im schwach sauren Milieu. *(Anmerkung: Gelatine lässt sich im sauren Milieu wegen Strukturveränderungen im Protein schlecht spalten, deshalb sind die Ergebnisse bei Pepsin so schwach ausgebildet.)*

Proteasen kommen überall da vor, wo Proteine metabolisiert werden. Als Beispiel soll gezeigt werden, daß die Humusschicht eines Waldbodens Gelatine zu verflüssigen vermag.

(Demonstrationsversuch)

Große Mengen von Proteasen kommen nicht nur im Verdauungstrakt von Säugetieren vor, auch in einigen Pflanzen sind sie reichlich enthalten (3). Als Beispiel soll zunächst die Kannenpflanze (Nepenthes, **Fig. 5**) vorgestellt werden. In ihren Kannen fängt diese Pflanze Insekten und verdaut sie. Auf diese Weise bessern die Insektivoren ihren Stickstoffhaushalt auf. Mit Hilfe des Filmtests kann man sowohl in den Nepentes-Kannen (*Demonstrationsversuch*) als auch in den Tentakeltröpfchen des Sonnentaus (vgl. **Fig. 6**) Protease nachweisen (vgl. auch (4)). Schon sehr lange ist es bekannt, daß einige Früchte sehr reich an Protease sind (5). Als Beispiele werden Ananas- und Papaya-Früchte vorgeführt. Beide Früchte (beim Ananas auch die Blätter) enthalten eine Protease, die, wie der Versuch zeigt, durch Quecksilberchlorid gehemmt werden kann (*Demonstrationsversuch*) (vgl. **Fig. 7**). Das Enzym aus Papaya, das Papain, wird in den sogenannten Fleischzartmachern („meat tenderizer“) angewandt, doch demonstriert der Film-Test, daß das Präparat viel Salz und nur *sehr* wenig Protease enthält. (*Demonstrationsversuch*) Frühere Behauptungen (6), daß die Indios proteasehaltige Früchte, besonders Feigen, als Wurmmittel angewendet haben sollen, mögen zwar stimmen, ob das Mittel auch wirksam war, steht heute jedoch erheblich in Frage.

III Reaktionsmechanismus

Der Nachweis der Hemmbarkeit von Pflanzenproteasen durch Quecksilber(II)chlorid (*siehe vorheriger Demonstrationsversuch*) führt uns zur Frage nach dem Reaktionsmechanismus von Proteasen. Papain und Bromelain (die Protease im Ananas) benötigen für ihre Aktivität eine Cystein-Gruppe im „aktiven Zentrum“. Unter dem aktiven Zentrum eines Enzyms versteht man dabei denjenigen Bereich des Enzymmoleküls, in dem die Katalyse abläuft. Im Falle der oben genannten Pflanzenproteasen kann man das Cystein im aktiven Zentrum durch Zugabe von Quecksilber-Ionen blockieren („Sulfid-Bildung“); man kann das Enzym aber auch durch Oxidation der SH-Gruppe inaktivieren.

Voraussetzung für die Untersuchung des Reaktionsmechanismus eines Enzyms ist seine Einheitlichkeit, d.h. es dürfen keine anderen Enzyme oder Proteine im Präparat enthalten sein. Die heute üblichste Methode um die Einheitlichkeit von Enzympräparationen zu überprüfen, ist die **Disc-Elektrophorese**, deren Prinzip am Beispiel der Auftrennung von Pankreatin und kristallisiertem Trypsin erläutert werden soll (vgl. **Fig. 8**).

Drei Phänomene ermöglichen die scharfe Auftrennung der Proteine im Acrylamid-Gel:

1. Proteine besitzen unterschiedliche Ladungen und wandern aus diesem Grunde unterschiedlich schnell im elektrischen Feld;
2. das Acrylamid-Gel wirkt durch seine Quervernetzung wie ein Molekular-Sieb;
3. man benutzt ein diskontinuierliches Puffersystem (daher der Name Disc-); dieses arbeitet in der Weise, daß im Gel schneller wandernde Anionen (z.B. Cl⁻) sind als im Kammerpuffer (dort z.B. Glycinat) und so im oberen Bereich des Acrylamid-Säulchens ein sehr starker Potentialgradient entsteht, welcher ein „Zusammenschieben“ des aufgegebenen Proteins in einer sehr scharfen Startzone bewirkt.

Bei Vorliegen eines einheitlichen, womöglich kristallisierten Enzyms gibt es vor allem vier Strategien zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus von Proteasen:

1. die Verwendung von Modellsubstraten
2. der Einsatz spezifischer Inhibitoren
3. die Spaltung sequenzbekannter Proteine
4. die Methoden der **Cryoenzymologie** und der **Röntgenbeugung** (vgl. hierzu (7))

Die Verwendung von Modellsubstraten soll am Beispiel der Spaltung von Z-Tyrosinnitrophenylester durch Chymotrypsin demonstriert werden. Die Z-Tyrosinnitrophenylester-Spaltung erfolgt dabei zunächst sprungartig und anschließend sehr langsam (vgl. **Fig. 9**).

Hartley, der diesen Befund bei der Spaltung von Nitrophenylacetat durch Chymotrypsin machte (8), deutete seine Ergebnisse in der Weise, daß zunächst, sehr rasch, ein Acyl-Enzym gebildet wird - wobei Nitrophenol freigesetzt wird - und anschließend in langsamer Reaktion das Acyl-Enzym gespalten wird. Die Bildung eines Acyl-Enzyms als Zwischenstufe der Chymotrypsin-Katalyse gilt heute als gesichert und man nimmt den in **Anlage 1** dargestellten, stark vereinfachten Reaktionsmechanismus an.

Aus diesem Schema kann man entnehmen, daß Chymotrypsin im aktiven Zentrum einen Histidin- und einen Serin-Rest besitzt. Es soll nun durch Einsatz spezifischer Inhibitoren gezeigt werden, daß dies auch für Trypsin gilt. Als Grundreaktion wird die Spaltung von Benzoyl-L-Arginin-4-nitroanilin („BAPA“) benutzt; setzt man zu der fast farblosen BAPA-Lösung Trypsin zu, so wird die Lösung durch abgespaltenes Nitroanilin intensiv gelb gefärbt.

(Demonstrationsversuch) In zwei Parallelversuchen kann nachgewiesen, werden, daß diese Spaltung durch Zusatz von Phenylmethansulfonylfluorid vollständig und durch Zusatz von Tosyl-lysin-chlorketon fast vollständig verhindert werden kann. *(Demonstrationsversuch)*

Phenylmethansulfonylfluorid („PMSF“) blockiert Serinreste, Tosyl-lysinchloro-keton („TLCK“) reagiert spezifisch mit dem Histidinrest im aktiven Zentrum; das Lysin dient dabei als sogenanntes „affinity label“ (vgl. **Fig. 10**). Trypsin braucht also ebenfalls einen Histidin- und einen Serin-Rest um proteolytisch wirksam sein zu können.

Durch die Untersuchung der Spaltstellen in sequenzbekannten Proteinen hat man die „**Spaltspezifität**“ vieler Proteasen charakterisiert. Trypsin spaltet *selektiv* hinter Arginin und Lysin, Chymotrypsin bevorzugt hinter aromatischen Aminosäuren und hinter Methionin. Die Spaltspezifität von Proteasen wird bei der Strukturaufklärung von Proteinen ausgenutzt.

III Selektive Proteolysen

Auch die Natur nutzt die Spaltspezifität von Proteasen aus. Dies soll am Beispiel von Milch- und Blutgerinnung gezeigt werden. (*Demonstrationsversuch*) Gibt man zu über (!) 18°C warmer, aufgelöster Trockenmilch ein wenig „Lab“, eine Enzym-Präparation aus dem vierten Magen des Kalbes, so kann nach kurzer Zeit am Overhead-Projektor gezeigt werden, daß die Milch geronnen ist. Die Labung der Milch ist der erste Schritt bei der Herstellung aller hochwertigen Käse und dadurch von großer wirtschaftlicher Bedeutung. Der entscheidende Prozeß bei der Milchgerinnung ist die Spaltung des κ -Caseins durch das Chymosin, eine im Lab enthaltene Protease. Das κ -Casein ist die einzige Caseinfraktion, die in Gegenwart der in der Milch enthaltenen Calcium-Ionen löslich ist.

Zusammensetzung der Milch-Caseine (nach (10))

α -Casein	40%**
β -Casein	30%**
κ -Casein	15%
γ -Casein	5%**

** unlöslich in Gegenwart von Ca⁺⁺

Das κ -Casein besitzt eine *amphipatische* Struktur, d.h. es ist im Grunde ein Tensid (vgl. **Fig. 12**). Durch die Spaltung der Bindung Phenylalanin 105 - Methionin 106 wird das Molekül in zwei ganz unterschiedliche Hälften gespalten: das hydrophobe, unlösliche para- κ -Casein und das lösliche Caseinoglykopeptid (10,11). Das para- κ -Casein bildet mit den anderen unlöslichen Caseinen zusammen das Koagulat (vgl. **Fig. 12**).

Der letzte Schritt bei der Blutgerinnung ist ebenfalls eine ganz selektive Proteolyse. Das Enzym Thrombin im Blutserum als Prothrombin vorkommt, spaltet das Serumprotein Fibrinogen, wobei das Fibrin-Monomere entsteht, welches in einem noch nicht geklärten Prozeß zu einer Gitterstruktur aggregiert, die das Grundgerüst des Blutgerinnsels aufbaut.

(Demonstrationsversuch) Setzt man zu Citratblut etwas Test-Thrombin (Behring-Werke, Marburg) zu, so kommt es in ganz kurzer Zeit zur Blutgerinnung, was mit einem Häkchen demonstriert werden kann. Daß die Spaltung des Fibrinogens dabei tatsächlich der gerinnungsauslösende Vorgang ist, kann durch Zusatz von Thrombin zu einer Fibrinogen-Lösung gezeigt werden. *(Demonstrationsversuch)* Schon kurze Zeit nach der Enzymzugabe entsteht ein Fibrin-“clot“. Der wichtigste Vorgang bei der Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin-Monomerem ist die Spaltung einer Arg-Gly-Bindung in der Kette des α -Fibrinogens, wobei das Fibrinopeptid A abgespalten wird (11) (vgl. **Fig. 13**)

Über Proteasen, besonders über die Regulation ihrer Aktivität durch Peptid- und Proteininhibitoren gäbe es noch viel zu berichten (12).

Hier soll nur noch kurz auf die vielleicht wichtigste und folgenschwerste Proteolyse hingewiesen werden: die Zona Pelucida, das letzte Hindernis für das ins Ei eindringende Spermatozoon wird durch eine im Akrosom lokalisierte Protease, das **Acrosin**, hydrolysiert und damit der Weg zur Befruchtung frei gemacht (13).

Literatur

- (1) Schill, W. B. & G. F. B. Schumacher; Annal. Bioch. 46, 502-533 (1972)
- (2) Schumacher, G. F. B. & Schill, W. B.; Annal. Bioch. 48,9-26 (1972)
- (3) Berg, M. u. a. in Waschmittelchemie (Hg. Henkel & Cie, GmbH) Hüthig-Verlag, Heidelberg 1976, S.155 ff
- (4) Ryan, G. A. ; Ann. Rev. Plant Physiol. 24, 173-196 (1973)
- (5) Heslop-Harrison, Y.; Endeavour XXXV, 114-122 (1976)
- (6) Vauquelin, L.N.; Ann. Chim. 43, 267 (1799)
- (7) Walti, A.; J. Americ. Chem. Soc. 60, 493 (1938)
- (8) Fink, A. L.; Accounts of Chemical Research 110, 233-239 (1977)
- (9) Hartley, B. S. & B. A .Kilby; Biochem. J. 56, 288 (1954)
- (10) Buddecke, E.; Grundriss der Biochemie, Berlin' 51977
- (11) Alais, C.; Chimia 28, 597-604 (1974)
- (12) Jollès, P.; Molecular & Cellular Bioch. 7 ,73-85 (1975)
- (13) Tschesche, H. ; Angew. Chem. 86, 21-41 (1974)
- (14) McRorie, R.A. & W. L. Williams; Ann. Rev. Bioch(1974) 777 ff.

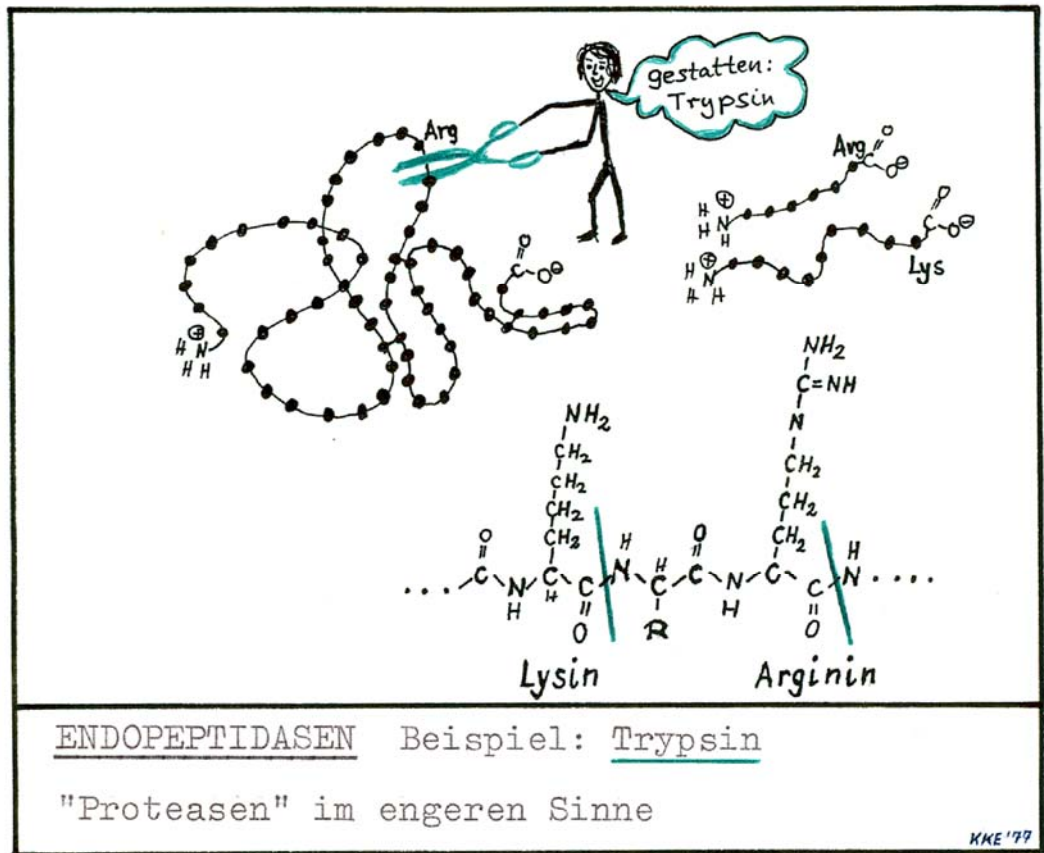
Anmerkungen und Nachträge :

Alte Rechtschreibung!

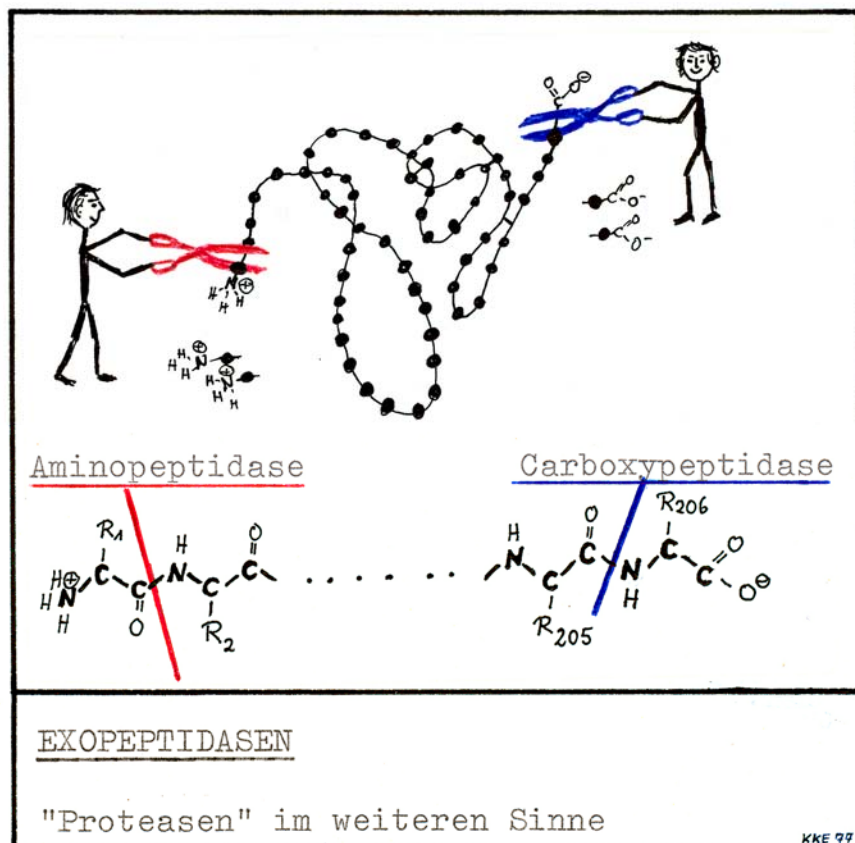
Die Untersuchung der durch **Thrombin** induzierten Blutgerinnung hat inzwischen zu sehr viel differenzierten Ergebnissen geführt. Das Grundmodell hat sich dadurch aber nicht verändert.

Die Bestimmung der **Akrosin**aktivität gehört inzwischen zu den andrologischen Standarduntersuchungen. Siehe z.B. http://www.klinik.uni-frankfurt.de/zdv/cgi-bin/frameset.pl?nav=nav_labore&loc=lab_andrologie&file=lab_andrologie_erweitert.htm

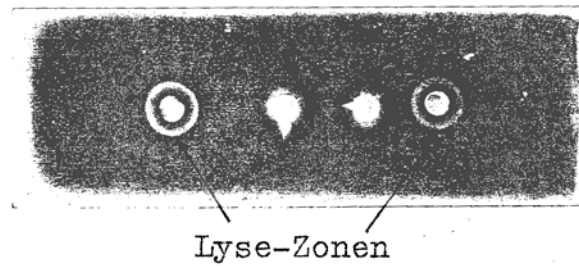
Figur 1



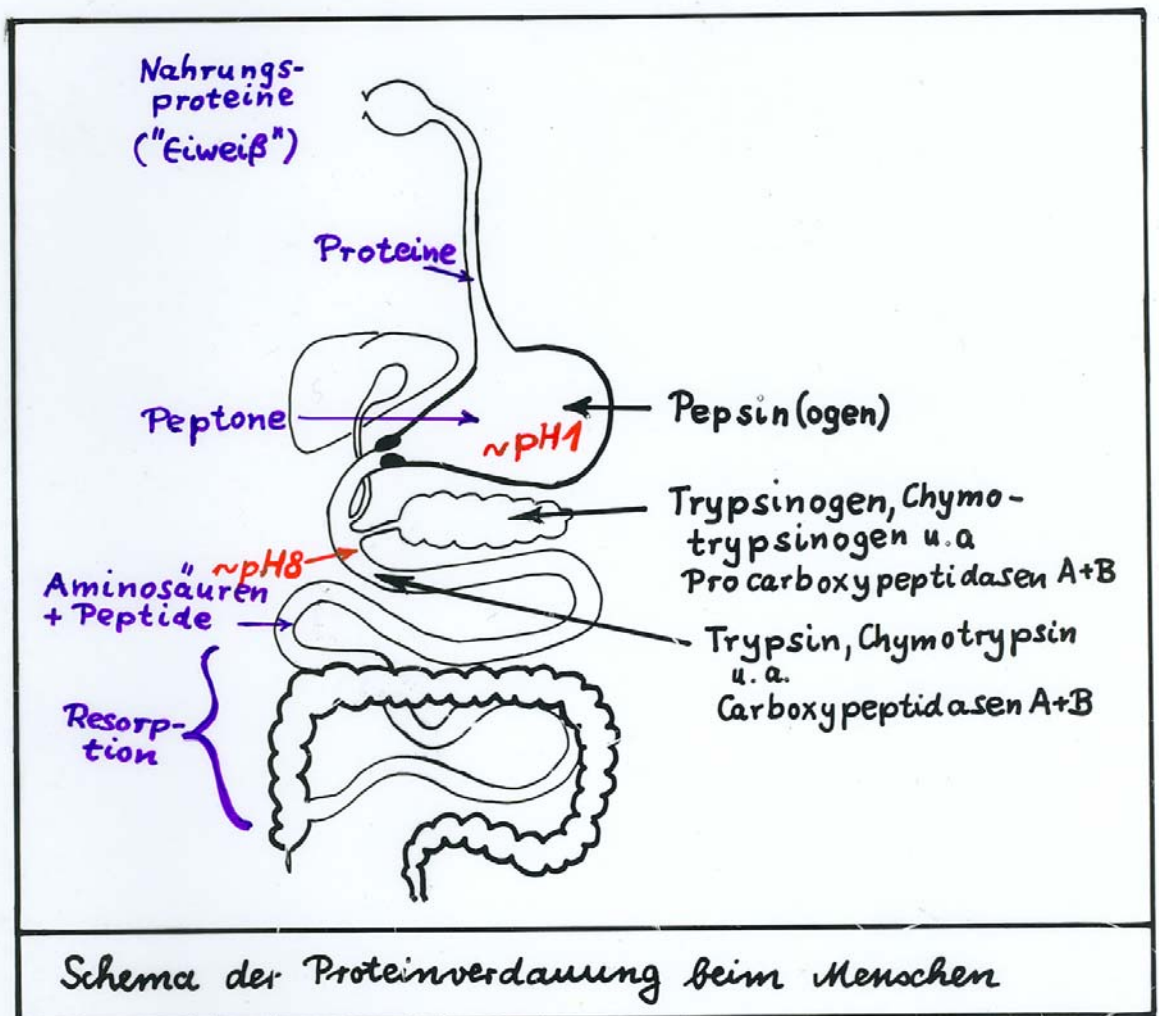
Figur 2



Figur 3



Figur 4



Figur 5a




Figur 5b

RUNDBLÄTTRIGER SONNENTAU (*Drosera rotundifolia*)

Wächst auf stickstoffarmen Moorstandorten und bessert ihren Stickstoffhaushalt durch Insektenfang auf. Die Tröpfchen enthalten Protease, wie der Filmtest beweist. Insekten bleiben an den "Tentakeln" hängen. Diese ziehen sich daraufhin zusammen. Diese Reaktion wird, wie schon DARWIN 1875 zeigen konnte, durch Stickstoffverbindungen ausgelöst.

Literatur: Heslop-Harrison, Y.: Carnivorous plants a century after Darwin. Endeavour XXXV, 1976, S. 116-122

Fundort der Pflanze: Franzosenwiesen (Burgwald)



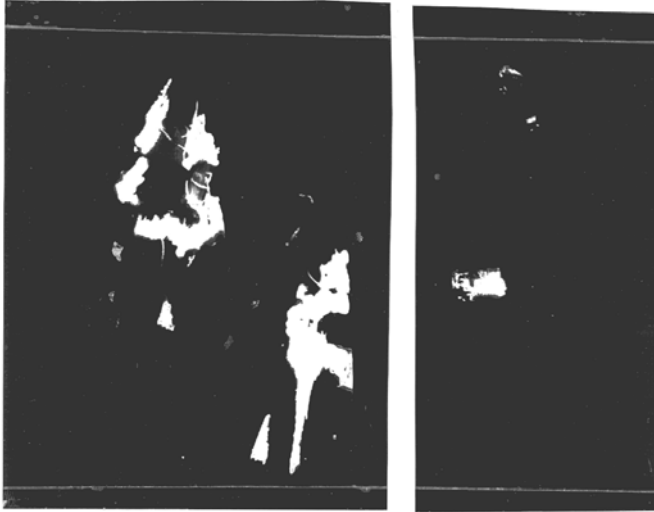
Filmtest mit einem Sonnentau-Blatt

Detail



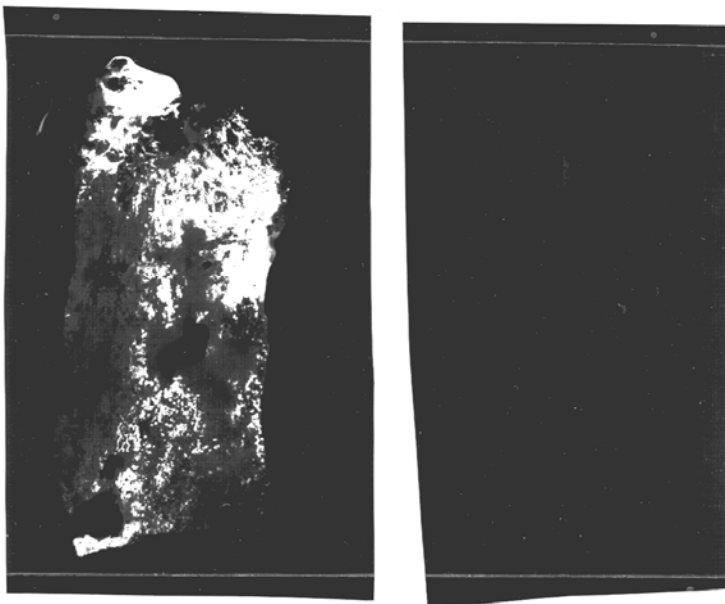
Figur 6

Protease Bromelain



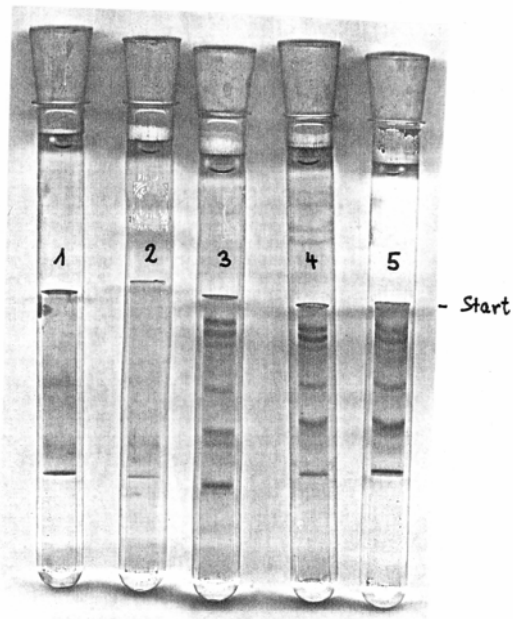
mit Quecksilber(II)chlorid

Protease Papain



mit Quecksilber(II)chlorid

Figur 7



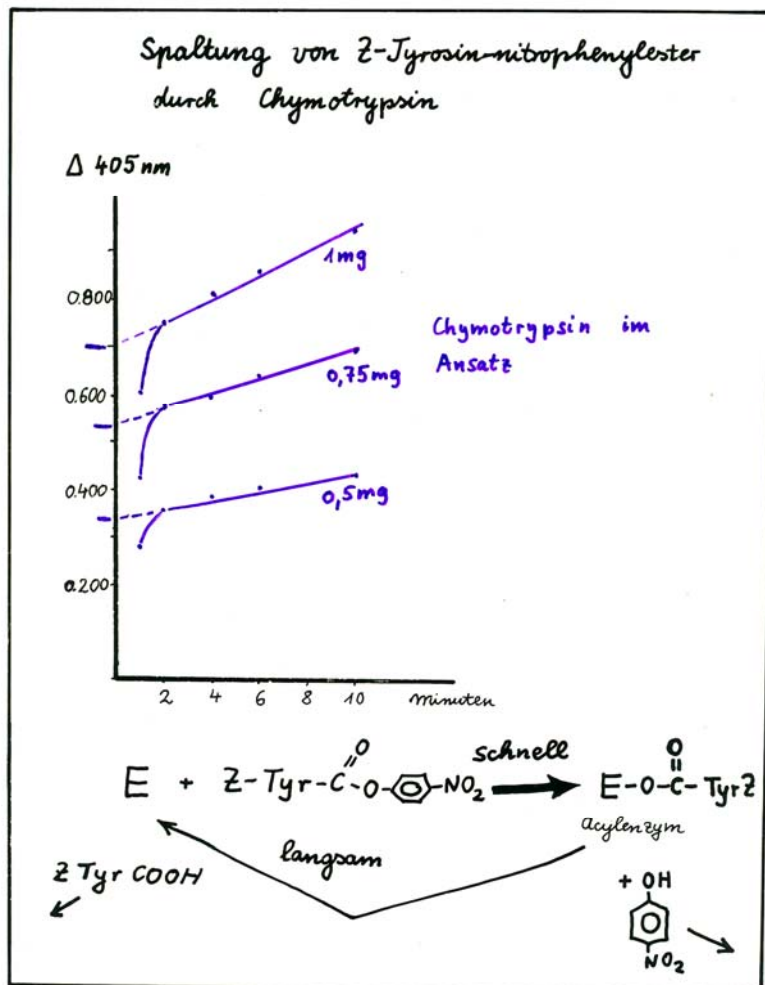
Disc-Elektrophorese

Kammer-Puffer: TRIS-Glycin pH 8,9

Gel-Puffer: TRIS-HCl pH 8,0

1,2 krist. Trypsin, 3,4,5 Pankreatin

Figur 8



Figur 9

Aminosäurespezifische Enzymhemmung

1. selektive Blockierung von Serinresten

PMSF

Phenylmethylsulfonylfluorid

bei Chymotrypsin: Blockierung von Serin 195
 bei Trypsin: Blockierung von Serin 183

2. selektive Blockierung von Histidinresten im aktiven Zentrum

TRYPsin

Histidin 46

Serin 183

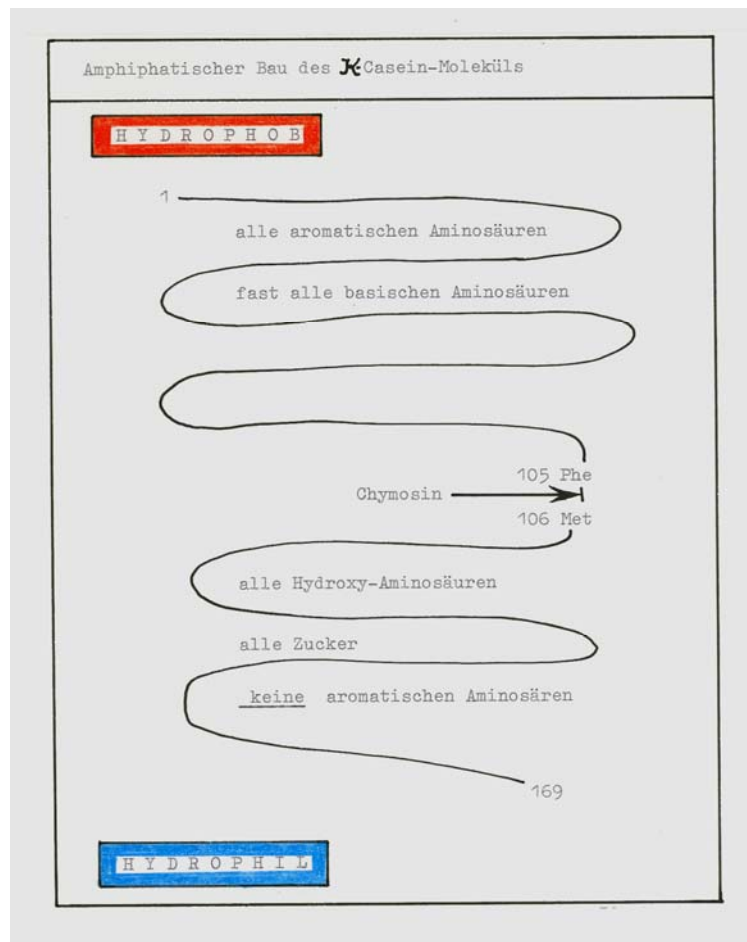
Lysin

Tosyl

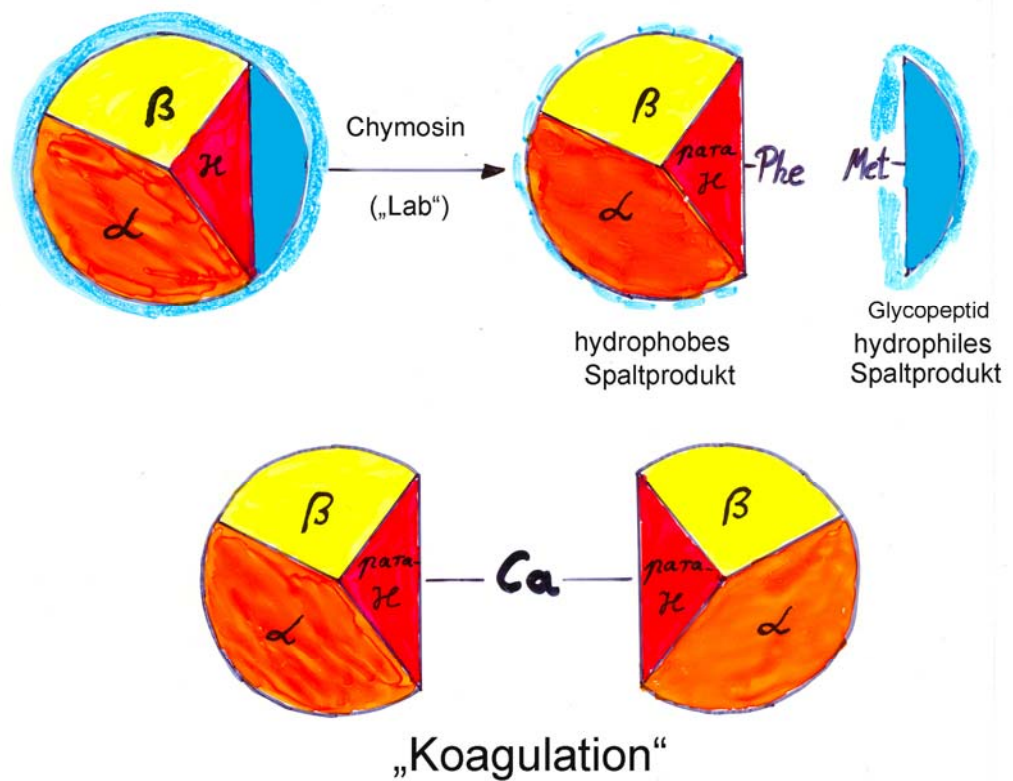
TLCK
 Tosyllysinchloro keton

Oxidation mit Peressigsäure
 → Carbomethylhistidin

Figur 10



Figur 11



Figur 12

