

# Die Bestimmung kleiner Proteolysegrade

Von

**M. Pantlitschko** und **E. Gründig**

Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Universität Wien

Mit 5 Abbildungen

(Eingegangen am 29. Januar 1957)

1. Es wird eine Methode entwickelt, die den Nachweis und die quantitative Bestimmung der Proteolyse mit kleinen Trypsin- und Pepsinmengen gestattet.

2. Die Methode beruht auf der Durchführung der Biuretreaktion in der nach Einwirkung proteolytischer Fermente enteweißten Lösung und Messung der Extinktion bei 530  $m\mu$ .

3. Es wird nachgewiesen, daß bei kurzer Einwirkungsdauer von geringen Trypsinmengen auf Casein ausschließlich Polypeptide entstehen.

4. Es ist mit dieser Methode möglich, die proteolytische Wirksamkeit von Thrombin schnell und sicher zu bestimmen.

Im Verlaufe unserer Untersuchungen über die proteolytischen Enzyme verschiedener Organe waren wir vor die Aufgabe gestellt, geringe Proteolysegrade bei Anwesenheit von Nucleasen zu bestimmen. Die in unserer Zusammenstellung<sup>1</sup> erwähnten Methoden kamen auf Grund ihrer geringen Empfindlichkeit nicht in Betracht. Die Messung der Proteolysegrade durch die Bestimmung der Zunahme des säurelöslichen Tyrosins im enteweißten Filtrat war in unserem Falle nicht möglich, da durch die Anwesenheit von Nucleasen und deren Substraten wechselnde Mengen von Purinbasen im Filtrat auftraten, die das Ergebnis der spezifischen UV-Absorption bei 280  $m\mu$  wesentlich beeinträchtigen. Die gasometrische Aminostickstoffbestimmung nach *Kendrick* und *Hanke*<sup>2</sup> lieferte bei Trypsin als proteolytisches Ferment ebenso wie die gaso-

<sup>1</sup> *M. Pantlitschko, E. Kaiser und H. Andres, Biochem. Z. 322, 526 (1952).*

<sup>2</sup> *A. B. Kendrick und M. E. Hanke, J. Biol. Chem. 117, 161 (1937).*

metrische Carboxyl-C-Bestimmung nach *Van Slyke* und Mitarb.<sup>3</sup> erst bei sehr langen Bebrütungszeiten brauchbare Ergebnisse. (Diese beiden Methoden lieferten bei Verwendung von Trypsin, prozentuell ausgedrückt, wesentlich geringere Proteolysewerte, als sie z. B. durch die Bestimmung des säurelöslichen Tyrosins gefunden wurden.) Obwohl diese beiden Methoden bei Testanalysen mit Aminosäure ausgezeichnete Ergebnisse lieferten, konnten wir sie aus Gründen, die wir weiter unten darlegen und weil sie uns für Serienuntersuchungen zu zeitraubend waren, nicht verwenden. Da bei proteolytischen Vorgängen Peptidbindungen gespalten werden, versuchten wir nun, die Abnahme der Zahl dieser Bindungen pro Versuchsansatz mit Hilfe der Biuretreaktion direkt ohne Enteiweißung zu verfolgen. Es zeigte sich aber, daß bei der von uns gewählten Versuchsdauer von etwa einer Stunde keine Veränderungen mit Sicherheit zu beobachten waren.

Es wurde also folgendes festgestellt:

1. Mit Hilfe der gasometrischen (N- und Carboxyl-C) Aminosäurebestimmung konnte nur ein kleiner Bruchteil der Aminosäuren gefunden werden, die nach den Ergebnissen der Messung des Gehaltes an säurelöslichem Tyrosin durch UV-Absorption bei 280  $m\mu$  zu erwarten gewesen wäre. Wird das Filtrat des mit 8% Endkonzentration TCE gefällten Substrats etwa 24 Stdn. mit 5 n HCl bei 110° C hydrolysiert und anschließend der Aminosäuregehalt gasometrisch bestimmt, finden wir etwa 40mal mehr Aminosäuren als vor der Hydrolyse. Die primär entstehenden Spaltprodukte sind also nicht TCE-fällbare Polypeptide.

2. Während, wie oben erwähnt, im gesamten Versuchsansatz keine Änderung der Konzentration der biuretaktiven Substanzen nachzuweisen war, wurden solche im Filtrat des mit 8% Endkonzentration TCE gefällten Substrats in so großer Menge aufgefunden, daß wir darauf eine Bestimmungsmethode aufbauen konnten, die zum Nachweis von proteolytischen Fermenten, wie z. B. Trypsin, Papain, Pepsin und Thrombin gute Dienste leistet und auch im klinischen Betrieb zur einfachen und schnellen Bestimmung dieser Fermente verwendet werden kann.

### Methodik

Als Fermente verwendeten wir kristallisiertes Trypsin „Novo“<sup>4</sup>, kristallisiertes Pepsin (Amour)<sup>4</sup>, Papain (Merck 1 : 350) sowie „Topostasin Roche“<sup>4</sup>. Als Substrat diente uns für Trypsin und Papain „Casein nach *Hammarsten*“<sup>4</sup> in 1%iger Lösung in Phosphatpuffer, pH = 7,2 und  $\mu = 0,1$ , für Thrombin

<sup>3</sup> *D. Van Slyke, R. T. Dillon, D. A. McFayden und P. Hamilton, J. Biol. Chem. 141, 67 (1941).*

<sup>4</sup> Für die Überlassung dieser Präparate sind wir den genannten Firmen zu Dank verpflichtet.

$\alpha$ -Casein, hergestellt nach der Methode von *Hipp, Groves, Custer* und *McMeekin*<sup>5</sup> in 0,5%iger Lösung im selben Puffer. Bei Pepsin wurde als Substrat eine Serumverdünnung mit pH 2,05 verwendet (Verdünnung von 1 Teil Serum und 2 Teilen 0,1 n Salzsäure). Alle Substrate wurden, mit Toluol überschichtet, im Eis aufbewahrt. Die Fermente wurden in der entsprechenden Pufferlösung (Trypsin und Thrombin in Phosphatpuffer pH = 7,2,  $\mu$  = 0,1, Pepsin in Salzsäure-Kaliumchlorid-Puffer, pH = 2,  $\mu$  = 0,2) gelöst.

#### Versuchsansatz

*Trypsin, Papain* und *Pepsin*: 2 ccm Substratlösung und 1 ccm Fermentlösung werden nach Inkubierung bei 37° C mit 3 ccm 16%iger TCE enteiweißt, nach 30 Min. bei 37° C durch Blaubandfilter filtriert, 4 ccm Filtrat mit 1 ccm 20%iger Lauge und 2 ccm *Weichselbaum*-Reagens<sup>6</sup> versetzt und nach 30 Min. bei 530 m $\mu$  und 2 cm Schichtdicke im *Hilger*-Nonrecording-Spektrograph gemessen. In die Vergleichsküvette wird der gleiche Ansatz nach sofortiger Enteiweißung und Behandlung wie oben gebracht. Man kann aber auch einen Leerwert mit 4 ccm Wasser verwenden, da, wie Versuche ergaben, beim unbebrüteten Ansatz keine biuretpositiven Substanzen in das Filtrat übergehen.

*Thrombin*: Die Mischung von Substrat und Fermentlösung wird nach entsprechender Inkubationszeit durch Fällung beim isoelektrischen Punkt des  $\alpha$ -Caseins (pH = 4,6) mit 2 ccm 2 m Acetatpuffer enteiweißt, der Niederschlag abzentrifugiert. 4 ccm der klaren Lösung werden mit 2 ccm 20%iger Lauge und 2 ccm *Weichselbaum*-Reagens versetzt und die Extinktion wie oben gemessen.

Eine Adsorption von Peptiden an das ausfallende Eiweiß findet nicht statt, wie wir uns an Hand von Versuchen mit genau bekannten Peptonmengen, die wir den Substratlösungen zusetzten, überzeugen konnten. Die Aktivität geben wir in Extinktionseinheiten an. Es läßt sich auch, wie wir später zeigen werden, der Prozentanteil des abgebauten Eiweißes bestimmen.

#### Ergebnisse

*Trypsin*: Wie aus Abb. 1 hervorgeht, besteht bei geringer Trypsinkonzentration eine lineare Abhängigkeit zwischen den gefundenen Extinktionswerten und den Fermentkonzentrationen. Bei höheren Fermentkonzentrationen besteht diese Linearität nicht mehr.

Wenn an denselben Versuchsansätzen die Proteolyse mit Hilfe der UV-Absorption gemessen wird, so besteht diese Linearität zwischen Fermentkonzentration und Extinktion auch bei höheren Enzymkonzentrationswerten. Diese Tatsache macht, wenn man größere Trypsinmengen bestimmen will, das Aufstellen einer Eichkurve bei gegebener Substratkonzentration notwendig.

Abb. 2 zeigt die lineare Abhängigkeit der gefundenen Extinktionswerte von der Zeit bei Anwendung einer gegebenen Trypsinmenge (2  $\gamma$  EKZ).

<sup>5</sup> *N. J. Hipp, M. L. Groves, J. H. Custer* und *T. L. McMeekin*, *J. Dairy Sci.* **35**, 772 (1952).

<sup>6</sup> *N. Weichselbaum*, *Amer. J. Clin. Pathol.* **10**, 49 (1946).

Wegen der kurzen Dauer der Einwirkung des Fermentes ist die Verwendung von vorgewärmten Lösungen sowie eine genaue Zeitmessung unbedingt erforderlich.

Ein Ansatz mit  $2\gamma$  EKZ Trypsin Endkonzentration, wie oben beschrieben, wurde in Zentrifugenröhrchen durchgeführt, sofort und nach 1 Std. Bebrütung mit gleichen Teilen 16%iger TCE entweißt, zentrifugiert, der Niederschlag nochmals mit 8%iger TCE gewaschen. Von der überstehenden Flüssigkeit wurden 4 ccm zur Bestimmung mit Hilfe der Biuretreaktion verwendet und die Extinktion auf die gesamte Menge

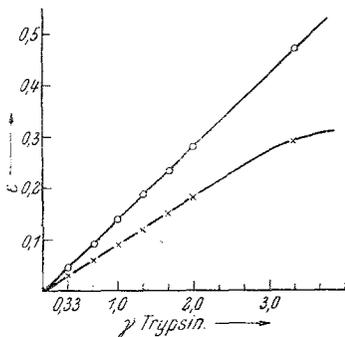


Abb. 1. Kristallisiertes Trypsin (Bebrütungsdauer 1 Std.); —○—○—○— Extinktion bei 280  $m\mu$ , 1 cm Schichtdicke; —×—×—×— Extinktion bei 530  $m\mu$ , 2 cm Schichtdicke

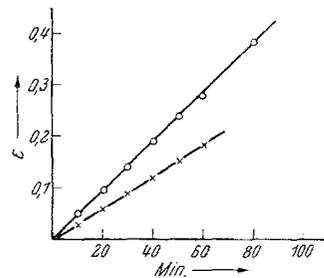


Abb. 2. Kristallisiertes Trypsin ( $2\gamma$ -Endkonzentration/ccm); —○—○—○— Extinktion bei 280  $m\mu$ , 1 cm Schichtdicke; —×—×—×— Extinktion bei 530  $m\mu$ , 2 cm Schichtdicke

von 6 ccm berechnet. Der Niederschlag wurde in 1 ccm 20%iger Natronlauge gelöst und damit ebenfalls die Biuretreaktion durchgeführt. Aus untenstehender Zusammenstellung ersieht man, daß die Zahl der Peptidbindungen, ausgedrückt durch die Extinktion der Biuretreaktion, wenn man die überstehende Flüssigkeit und den Niederschlag gemeinsam betrachtet, keine Änderung erfährt. Wir haben also, wie oben erwähnt, die Möglichkeit, den prozentuellen Abbau des Substrats durch verschiedene Enzymlösungen zu bestimmen. Damit in Einklang steht auch die Tatsache, daß die Konzentration der Spaltprodukte im TCE-Filtrat durch Dialyse in Cellophanschläuchen, wenn man die Volumszunahme korrigiert, nicht geändert wird.

Tabelle 1

Inkubationszeit	Extinktion des TCE-lösl. Anteils	Extinktion des Niederschlages	Ges. Extinktion	Abbau in %
0	0	0,537	0,537	0
1 Std.	0,127	0,407	0,534	23,7

*Pepsin*: Auch für Pepsin konnte, wie aus untenstehender Abb. 3 hervorgeht, dieselbe lineare Proportionalität der Extinktionswerte in bezug auf die Abhängigkeit von der Konzentration des Fermentes bzw. der Zeit bei gegebener Fermentkonzentration gefunden werden.

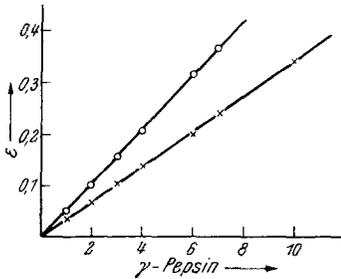


Abb. 3. Kristallisiertes Pepsin (Bebrütungsdauer 1 Std.)

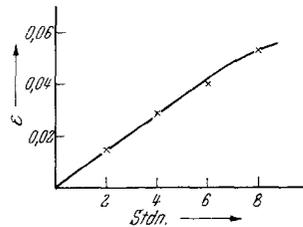


Abb. 4. Kristallisiertes Thrombin (100 γ-Endkonzentration/cm)

*Papain*: Von der Wiedergabe der Papain-Proteolyse-Kurven nehmen wir Abstand, da prinzipiell dieselben Ergebnisse wie bei Trypsin erhalten wurden.

*Thrombin*: Während es uns nicht möglich war, die proteolytische Wirkung des Thrombins auf Casein mit Hilfe der üblichen Methode nach-

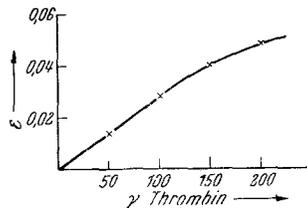


Abb. 5. Kristallisiertes Thrombin (Bebrütungsdauer 4 Std.)

zuweisen, erlaubt die Bestimmung der biuretaktiven Substanzen im Filtrat des beim isoelektrischen Punkt gefällten  $\alpha$ -Caseins ohne weiteres die Messung des Proteolysegrades. Bei geringerer Thrombinkonzentration empfiehlt es sich, die Inkubationszeit zu verlängern und eine Eichkurve aufzustellen.