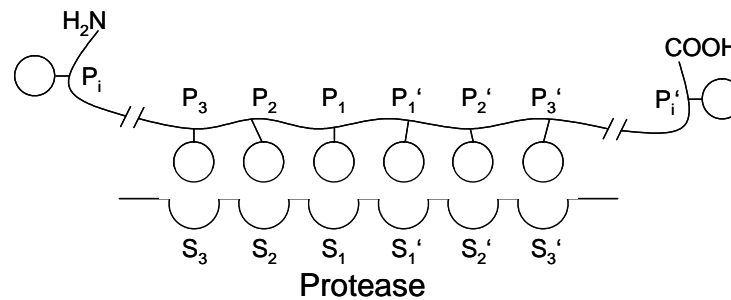


### 3 Proteasen

Proteasen sind Enzyme, die Peptidbindungen hydrolytisch spalten. Von daher ist die korrektere Bezeichnung Peptidasen (kurz für Peptidbindungshydrolasen), wobei auch die Begriffe Proteinase und proteolytische Enzyme synonym verwendet werden. Historisch gesehen wurde zwischen Proteasen und Proteinase unterschieden (mit allgemein Peptidbindungen bzw. ausschließlich Proteinen als Substrat, Grassmann and Dyckerhoff 1928; Barrett and McDonald 1986). Aufgrund des eigentlichen Substrats (der Peptidbindung) wurde der Begriff der Peptidasen eingeführt (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC34/>); eine Unterscheidung nach dem Wirkungsort (im Inneren bzw. am Ende der Polypeptidkette) führte zur Einteilung in Endopeptidasen (früher: Proteinase) und Exopeptidasen (früher: Peptidasen). Ein Versuch, alle Enzyme begrifflich zu vereinen, mündete in dem Term proteolytische Enzyme (Barrett and McDonald 1986).

#### 3.1 Klassifizierung von Proteasen

Entsprechend der *Enzyme Commission*-(EC-)Nummerierung gehören Proteasen in die Hauptklasse 3 (Hydrolasen), Unterklasse 4 (Substrat: Peptidbindungen). Momentan gibt es 287 Einträge in den 14 Subunterklassen, die jedoch alle die katalysierte Reaktion beschreiben und nicht die Enzyme als solche. Daher sind unter derselben EC-Nummer mitunter verschiedene Proteasen zu finden. Zur Beschreibung der Substratspezifität und der Bindung des Substrats an die Protease wurde von Schechter und Berger eine Nomenklatur eingeführt, die die Aminosäurereste des Substrats mit  $P_i, \dots, P_3, P_2, P_1, P_1', P_2', P_3', \dots, P_i'$  bzw. die entsprechenden Bindungsstellen am Enzym mit  $S_i, \dots, S_3, S_2, S_1, S_1', S_2', S_3', \dots, S_i'$  bezeichnet (Abb. 5) (Schechter and Berger 1967). Die Spaltung des Substrats erfolgt zwischen  $P_1$  und  $P_1'$  und die Substratspezifität der Proteasen wird i.d.R. auch durch die Aminosäurereste in  $P_1$ - und/oder  $P_1'$ -Position bestimmt (Ausnahmen bilden z.B. einige Cathepsine, s. Kapitel Cathepsine und lysosomaler Proteinabbau).



**Abb. 5:** Schematische Darstellung der Substratbindungsstellen  $S_3 - S_3'$  der Protease bzw. der Aminosäurereste  $P_i - P_i'$  des Protein- bzw. Peptidsubstrats nach Schechter und Berger (Schechter and Berger 1967). Die Spaltung des Substrats erfolgt zwischen  $P_1$  und  $P_1'$ .

In der Datenbank MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>; Rawlings *et al.* 2006), die derzeit über 2000 Einträge zu individuellen Peptidasen umfasst, werden die Proteasen hingegen entsprechend ihrer „Familienzugehörigkeit“ charakterisiert.

Hinsichtlich der Position der zu spaltenden Peptidbindung werden unterschieden:

- Endopeptidasen (hydrolysieren Peptidbindungen im „Inneren“ von Proteinen, d.h. wenigstens 3 Aminosäurereste von den Termini entfernt; v.a. Verdauungsproteasen wie Chymotrypsin oder Pepsin)
- Omega-Peptidasen (zusammengefasst unter EC3.4.19; hydrolysieren Peptidbindungen im „Inneren“ von Proteinen, jedoch in der Nähe der Termini; die Peptidbindung muss nicht notwendigerweise eine so genannte  $\alpha$ -Peptidbindung, d.h. eine Peptidbindung zwischen zwei  $C_\alpha$ -Atomen sein; Substrate sind substituierte oder zyklisierte Aminosäuren oder Aminosäuren mit Isopeptidbindungen für bspw.  $\gamma$ -Glutamyl-Hydrolase, Pyroglutamyl-Peptidase oder Ubiquitinyln-Hydrolase)
- Exopeptidasen (benötigen je nach Spezifität einen freien N- oder C-Terminus; sie spalten Peptidbindungen nicht weiter als 3 Aminosäurereste vom entsprechenden Terminus entfernt und sie werden wie nachfolgend ausgeführt weiter unterteilt)
- Aminopeptidasen (EC3.4.11; spalten einzelne Aminosäurereste vom freien N-Terminus des Substratproteins)
- Di- bzw. Tripeptidyl-Peptidasen (EC3.4.14; spalten Di- bzw. Tripeptide vom freien N-Terminus des Substratproteins)
- Carboxypeptidasen (spalten einzelne Aminosäurereste vom freien C-Terminus des Substratproteins)
- Peptidyl-Dipeptidasen (EC3.4.15; spalten Dipeptide vom freien C-Terminus des Substratproteins) und
- Dipeptidasen (EC3.4.13; spalten Dipeptide mit freiem N- und C-Terminus)

Eine alternative Unterteilung der Proteasen erfolgt nach ihrem Katalysemechanismus (Tabelle 1):

**Tabelle 1:** Einteilung der Proteasen nach ihrem Katalysemechanismus

Typ	Funktionelle Gruppe im aktiven Zentrum	Beispiel
Serinprotease	Serin	(Chymo)Trypsin, Plasmin, Thrombin
saure Protease	Aspartat / H <sub>2</sub> O	Pepsin, Cathepsine D, E
Cysteinprotease	Cystein	Cathepsine B, H, L, Caspasen, Calpaine
Metalloprotease	meistens Zn <sup>2+</sup> / H <sub>2</sub> O	Thermolysin, Carboxypeptidase A, Collagenase
Threoninprotease	Threonin	Proteasom

### 3.2 Proteasen *in vivo*

Proteasen sind für alle Organismen lebenswichtig und sind daher ubiquitär (etwa 2% aller proteinkodierender Gene kodieren Proteasen; Rawlings *et al.* 2006). Vertreter einiger Proteasefamilien wie z.B. der Chymotrypsinfamilie können in allen Organismenreichen (Bakterien, Archaeen, Protozoen, Pilze, Pflanzen, Tiere und Viren) gefunden werden. Je nach ihrem Wirkungsort im jeweiligen Organismus werden sie als intrazelluläre oder extrazelluläre Proteasen bezeichnet.

#### 3.2.1 Intrazelluläre Proteasen

Intrazellulären Proteasen kommt neben der Prozessierung von „Pro-“Proteinen und der Abspaltung von Signalsequenzen („Prä-“Sequenzen) beim Membrandurchtritt bzw. beim *routing* zu den Lysosomen, Mitochondrien, in den extrazellulären Raum oder in Membranen v.a. die Aufgabe der Regulation des Proteinhaushalts zu. Über einen proteolytischen Abbau von Proteinen in den Mitochondrien und Chloroplasten ist relativ wenig bekannt. In Mitochondrien existieren Homologe zur bakteriellen Lon- (Wang *et al.* 1993) und Clp-Protease (de Sagarra *et al.* 1999) und in Mitochondrien- und Chloroplastenmembranen

wurden Vertreter der AAA-Proteasen (*ATPases associated with a variety of cellular activities*; Langer 2000) nachgewiesen.

Die Regulation des Proteinhaushalts im Zytosol umfasst die Qualitätskontrolle neu synthetisierter Proteine (Hartl and Hayer-Hartl 2002), d.h. die Beseitigung fehlerhaft synthetisierte Proteine, die zu Missfaltung und/oder Aggregation neigen können (Dobson 2003; Markossian and Kurganov 2004), die Entsorgung durch Stress (Temperatur, Oxidation, Desaminierungen *etc.*) gealterter Proteine sowie die rechtzeitige Eliminierung regulatorischer und so genannter Haushaltsenzyme (Goldberg 2003). Die Halbwertszeit der Haushaltsenzyme (*housekeeping enzymes*), d.h. derjenigen Enzyme, die für die „Grundaktivitäten“ der Zelle erforderlich sind, beträgt in etwa 1-2 Tage, die der regulatorischen Enzyme hingegen meist nur wenige Minuten bis Stunden, um eine effiziente Steuerung der metabolischen Prozesse zu garantieren (Dice and Goldberg 1975; Doherty and Mayer 1992). Generell konnte zudem beobachtet werden, dass größere Proteine schneller abgebaut werden als kleinere und Proteine mit einem isoelektrischen Punkt (pI) im sauren Bereich schneller als basische Proteine (Dice and Goldberg 1975).

### 3.2.1.1 Proteasom

Der Abbau von Proteinen im Zytosol erfolgt größtenteils in einer ATP-abhängigen Reaktion über Proteasomen (Hilt and Wolf 1996; Tanaka 1998), welche mit ca. 1,7 MDa extrem große Partikel darstellen. Sie sind bei Eukaryonten aus einem so genannten 20S-Kernkomplex, der aus 28 Untereinheiten besteht und als multifunktionelle Protease den eigentlichen Abbau bewerkstelligt, und zwei 19S-Kappenkomplexen, die den röhrenförmigen 20S-Komplex verschließen und mit Hilfe einer ATPase-Aktivität die Substraterkennung bzw. -weiterleitung in das Innere des Kernkomplexes vermitteln, aufgebaut (Coux *et al.* 1996).<sup>Ann. 8</sup> Voraussetzung für einen proteolytischen Abbau durch die Proteasomaschinerie ist die Markierung des Zielproteins durch Ubiquitin, einem hochkonservierten Protein aus 76 Aminosäuren. Durch einen Enzymkomplex aus Ubiquitin-aktivierendem (E1) und -konjugierendem (E2) Enzym sowie einer Ubiquitin-Protein-Ligase (E3) wird ATP-abhängig das Zielprotein an  $\epsilon$ -Aminogruppen mit dem C-terminalen Glycinrest des Ubiquitins verknüpft (Hershko and Ciechanover 1992; 1998).<sup>Ann. 9</sup> Neben den hier beschriebenen Abbaufunktionen, die somit auch zur Bereitstellung von Aminosäuren für Synthesen (Aminosäure-*pool*) dienen, sei noch die Involvierung der Proteasomen in die Generierung von 10-15 Aminosäurereste langen Peptiden im Zuge der Antigenpräsentation durch den MHC I (*major histocompatibility complex I*) erwähnt sowie die Involvierung des proteasomalen

Abbaus in verschiedene Krankheiten. Eine verminderte Proteasomaktivität wurde bei aggregationsassoziierten Krankheiten wie Morbus Parkinson oder Huntington Chorea festgestellt (Rubinsztein 2006).

### 3.2.1.2 Caspasen und Calpaine

Weitere bedeutsame zytosolische Proteasen sind Caspasen (*cysteiny-l-aspartate-cleaving proteases*), die wichtigsten Enzyme des programmierten Zelltods (Apoptose; Jesenberger and Jentsch 2002; Riedl and Shi 2004). Dieser ist ein – im Gegensatz zur Nekrose – von der entsprechenden Zelle aktiv ausgeführter Prozess („Selbstmord“), um nicht mehr benötigte oder geschädigte Zellen zu entfernen. Durch eine Vielzahl von Faktoren werden dabei zunächst Initiator-Caspasen (Caspasen 8 und 9) aktiviert, die dann Effektor-Caspasen (Caspasen 3, 6, 7) aktivieren; diese bauen durch proteolytische Spaltung ihrerseits dann diverse Zielproteine ab, was letztendlich zum Zelltod führt. Diese Prozesse unterliegen einer strikten Kontrolle, in die wiederum das Ubiquitin / Proteasom-System involviert ist. Eine Störung kann zur Ausbildung einer Vielzahl von Krankheiten führen, die neben Autoimmunerkrankungen Immundefizienz- und neurodegenerative Erkrankungen sowie die Entstehung von Tumoren einschließen (Jesenberger and Jentsch 2002; Hipfner and Cohen 2004). Auch die zytosolischen, Calcium-abhängigen Calpaine (abgeleitet von *Cal*modulin wegen der Calciumabhängigkeit und *Papain*, der damals bekanntesten Cysteinprotease) sind bedeutsam für zahlreiche Prozesse wie z.B. Zellmobilität (durch Abbau des Zytoskeletts), Signaltransduktion (durch Calciumabhängigkeit) oder Apoptose. Pathologische Funktionsstörungen führen u.a. zu einem Anstieg des mit Krebsentstehung verbundenen Proteins p53, durch Störung der Apoptose zu neurodegenerativen Erkrankungen oder zu Muskeldystrophie. Daher ist es nicht überraschend, dass derzeit etwa 14% der ca. 500 bekannten humanen Proteasen als Targets für die Entwicklung von Medikamenten untersucht werden (Rawlings *et al.* 2006).

### 3.2.1.3 Cathepsine und lysosomaler Proteinabbau

Der Großteil v.a. langlebiger Proteine wird durch Cathepsine in den Lysosomen abgebaut (Bohley and Seglen 1992); diese finden im Pflanzenreich ihr Äquivalent in den Vakuolen. Neben dem Abbau von Proteinen, die spezifisch in die Lysosomen transportiert werden, liegt die Bedeutung der Lysosomen im unselektiven Abbau von extrazellulären Komponenten durch Endozytose bzw. Phagozytose und intrazellulärer Partikel (z.B.

Mitochondrien) durch Autophagie.<sup>Ann. 10</sup> Die 11 lysosomalen „Haupt“-Cathepsine sind Cysteinproteasen der Papainfamilie und wirken als Endo- und/oder Exopeptidasen (Gocheva and Joyce 2007). Daneben gibt es noch Cathepsinvertreter der Serinproteasen (Cathepsine G und A) und der Aspartatproteasen (Cathepsine D und E). Die lysosomalen Cathepsine werden als Zymogene synthetisiert und erst nach Mannose-6-Phosphat-vermittelter Aufnahme in die Lysosomen durch Abspaltung der Prosequenz aktiviert. Durch Abbau von Proteinen zu Dipeptiden und Aminosäuren, die dann wieder ins Zytosol zurückgeschleust werden, tragen die Lysosomen (bzw. die darin enthaltenen Proteasen) maßgeblich zur Aufrechterhaltung des Aminosäure-pools der Zellen bei. Interessanterweise wird die Substratspezifität der Cathepsine v.a. durch die S<sub>2</sub>-Bindestelle bestimmt (<http://merops.sanger.ac.uk/>). Große Bedeutung kommt einigen Cathepsinen (B, L, S) im Rahmen der MHC II-vermittelten Antigenpräsentation zu. Während der Wirkungsort der Cathepsine normaler Zellen die Lysosomen sind, kommt es bei der Tumorbildung häufig zur Translokation zur Zelloberfläche und nachfolgend zur Sekretion der Proteasen. Ein Anstieg der Konzentration an Cathepsinen B oder L im Serum ist daher häufig auch ein Hinweis auf eine Tumorerkrankung. Im Extrazellularraum können die Cathepsine entweder selbst die Komponenten der extrazellulären Matrix (Collagen, Gelatine, Tenascin) abbauen oder sie aktivieren andere Proteasen (Matrixmetalloproteasen, MMP), die dann ihrerseits Aktivierungskaskaden auslösen oder die o.g. Komponenten abbauen. Durch die Auflösung des Zellverbundes kann es dann zur Invasion von Tumoren in das entsprechende Gewebe oder zur Metastasierung, d.h. der Abwanderung von Krebszellen aus Tumoren, kommen (Gocheva and Joyce 2007).<sup>Ann. 11</sup>

Wie oben erwähnt, wird eine Vielzahl zytosolischer Proteine in den Lysosomen abgebaut. Sie werden jedoch nicht durch Phagozytose in die Lysosomen geschleust, sondern durch Chaperon-vermittelte Autophagie (*chaperon-mediated autophagy*, CMA Massey *et al.* 2004) aufgenommen. Das Hitzeschockprotein hsc73 (*heat shock cognate*) sowie diverse so genannte Co-Chaperone binden dabei an das Zielprotein (Agarraberes and Dice 2001); dieser Komplex bindet an der Lysosomenaußenseite an den *lysosomal-associated membrane protein type 2a* (lamp2a) -Rezeptor und mit Hilfe des lysosomalen hsc73 (lys-hsc73; Cuervo 2004) wird das Zielprotein in die Lysosomen transferiert und dort von den Cathepsinen abgebaut (Cuervo and Dice 2000; Martinez-Vicente *et al.* 2005; Anm.: Für dieses Chaperonsystem werden von denselben Autoren auch die Begriffe ly-hsc73, hsc70 und lys-hsc70 verwendet.). Als CMA-Signalsequenz wurde durch Vergleich des Abbaus von mikroinjizierter RNase A, RNase S (d.h. durch Subtilisin ausschließlich an der Peptidbindung Ala20-Ser21 gespaltene RNase A) und der beiden Fragmente der RNase S (S-Protein, Aminosäurereste 21-124, und S-Peptid,

Aminosäurereste 1–20) die Aminosäuresequenz KFERQ ermittelt (Backer *et al.* 1983; Backer and Dice 1986; Dice *et al.* 1986). Tatsächlich konnte durch Immunopräzipitation eine derartige Sequenz in ca. 30% aller zytosolischen Proteine nachgewiesen werden (Chiang and Dice 1988) und eine Fusion von „Nicht-KFERQ-Proteinen“ mit dem die KFERQ-Sequenz enthaltenden S-Peptid förderte einen Abbau (Backer and Dice 1986).<sup>Ann. 12</sup>

Die hier ausgeführten Beispiele belegen, dass proteolytische Prozesse in der Zelle eine Vielzahl von Aufgaben übernehmen und dass sie äußerst fein gesteuert werden müssen, um einerseits den physiologischen Aufgaben gerecht zu werden, andererseits jedoch um pathologische Erscheinungen auszuschließen.

### 3.2.2 Extrazelluläre Proteasen

Proteasen können – wie andere Proteine auch – nach Sekretion ihre biologische (katalytische) Aktivität auch außerhalb der Zellen ausüben. Die Sekretion, die dabei konstitutiv, d.h. andauernd und gleich bleibend, oder reguliert erfolgen kann, geschieht über dieselben Mechanismen wie für andere Proteine, d.h. unter Mitwirkung von so genannten Signal- oder Präsequenzen, die meist 16–20 Aminosäurereste lang sind (Birch and Loh 1990). Beim Membrandurchtritt erfolgt deren Abspaltung durch Signalpeptidasen, wobei die Proteasen auch dann noch i.d.R. als inaktive Vorstufen (Zymogene) vorliegen. Erst durch Abspaltung der Prosequenz, die einerseits als Chaperon während der Faltung (Eder and Fersht 1995; Takagi and Takahashi 2003), andererseits als Inhibitor (Kessler and Safrin 1994; O'Donohue and Beaumont 1996; Wiederanders *et al.* 2003) wirken kann, erreichen die Proteasen ihre aktive Form. Diese proteolytische Spaltung kann autokatalytisch oder durch andere Proteasen erfolgen.

Bei Einzellern wie Bakterien werden die Proteasen in den periplasmatischen Raum oder ins Medium abgegeben, wo sie v.a. dem extrazellulären Abbau von Nahrungsproteinen bzw. – im Fall einer Virulenz – dem Abbau des Bindegewebes des Wirtes und der Deregulation von Proteinkaskaden oder Inhibitorsystemen dienen (Goguen *et al.* 1995). Bei höheren Organismen kann die Sekretion (z.B. über Schleimhäute) nach außen (exokrin) oder „nach innen“, z.B. ins Blut (endokrin), erfolgen. In die erste Gruppe gehören z.B. die Verdauungsenzyme wie Pepsin, Trypsin oder Chymotrypsin, in die zweite Gruppe die Enzyme der Blutgerinnungskaskade (Kallikreine, Blutgerinnungsfaktoren, Thrombin), der Fibrinolyse (Urokinase, Plasmin), des Komplementsystems (C1r, C1s, *mannose binding lectin-associated serine proteases*, MASP) sowie die Proteasen des extrazellulären Raums (Matrix-Metalloproteinasen). Genauso wie die intrazellulären Proteasen ist die Aktivität der

extrazellulären Proteasen durch eine feine Abstimmung von Aktivierung und Inhibierung geregelt, um pathologische Effekte zu verhindern (Neurath 1984; Molinari *et al.* 2003). Ein effizientes System zur Steuerung der Aktivierung stellen so genannte Kaskaden dar, bei denen zunächst regulatorische Proteine aktiviert werden, die (häufig im Zusammenspiel mit anderen, Nicht-Protease-Effektoren) letztendlich das entsprechende Zielprotein aktivieren. In einem einfachen Fall aktiviert die Enteropeptidase (Enterokinase) des Dünndarmepithels Trypsinogen, das vom Pankreas in den Dünndarm sezerniert wird. Das entstehende Trypsin kann sich (aufgrund einer ähnlichen Substratspezifität) autokatalytisch aktivieren (positive Rückkopplung), zudem aktiviert es die inaktiven Vorstufen von Chymotrypsin (Chymotrypsinogen), Elastase (Proelastase) sowie Carboxypeptidase A und B (Procarboxypeptidase A bzw. B, Coll *et al.* 1991). Deutlich komplizierter ist die so genannte Blutgerinnungskaskade; hier erfolgt die Aktivierung der exekutiven Protease Thrombin über 4 (exogenes System) bzw. 6 Schritte (endogenes System). Durch Spaltung des extrazellulären Bereichs von Transmembranproteinen kommt es zur Modulation von Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Wechselwirkungen, von Zellfunktionen oder aber auch zur Freisetzung von Molekülen, die dann frei diffundieren können wie z.B. Zytokine oder Wachstumsfaktoren. Die diese Spaltungen ausführenden Proteasen werden unter der Bezeichnung *shedddases* zusammengefasst (Garcia-Touchard *et al.* 2005). Extrazelluläre Proteasen sind meist Serin- und Metalloproteasen (Garcia-Touchard *et al.* 2005), v.a. im Reich der Pilze gibt es jedoch zahlreiche Beispiele für sekretierte saure (Aspartat-)Proteasen wie z.B. die Mucor Rennine von *Mucor pusillus* und *Mucor miehei*, die *Rhizopus niveus* Aspartatprotease und die sauren Proteasen A und B (kommerziell als Proctase A bzw. B bekannt) aus *Aspergillus niger* var. *macrosporus* (Rao *et al.* 1998).

Eine besondere Stellung nehmen virale Proteasen ein, da diese nicht durch die Viren selbst synthetisiert werden sondern durch den jeweiligen Wirt. Matrize kann dabei entweder virale DNA oder (bei Retroviren) RNA sein; letztere wird zunächst durch eine Reverstranskriptase in DNA „umgeschrieben“. Auch bei den viralen Proteasen kommen alle Proteasetypen hinsichtlich des Katalysemechanismus vor (Rawlings *et al.* 2006). Die viralen Proteasen sind für die Prozessierung der „Polyproteinpräkursoren“ in funktionale (Struktur-)Proteine der reifen Viren erforderlich. Diese zentrale Rolle lässt sie (neben z.B. der Reverstranskriptase und der Integrase) daher auch als geeignetes Target für Therapien erscheinen, was zur Entwicklung zahlreicher Proteasehemmer geführt hat (Debouck 1992; Rao *et al.* 1998; Eron 2000).



### 3.3 Proteasen *in vitro*

#### 3.3.1 Biotechnologische Nutzung von Proteasen

Aufgrund ihrer besseren Verfügbarkeit (isolierbare Menge, Stabilität) finden in technischen Prozessen v.a. extrazelluläre Proteasen Verwendung. Insbesondere Proteasen aus so genannten extremophilen (besser: extremotoleranten) Mikroorganismen stellen durch ihre Robustheit bzw. ein Aktivitätsoptimum außerhalb der üblichen Bedingungen (37°C, pH 6–8) interessante Werkzeuge für industrielle Applikationen dar. Bezüglich der Substratspezifität lässt sich feststellen, dass v.a. Endoproteasen verwendet werden (Poldermans 1990). Derzeit beträgt der Jahresumsatz industriell genutzter Enzyme ca. 1 Mrd US-Dollar, von denen ca. 60% auf Proteasen entfallen (Rao *et al.* 1998). Ca. 40% der Proteasen finden Verwendung in Waschmitteln bzw. -lösungen. Das erste Proteasen enthaltende Waschmittel kam bereits 1913 unter dem Handelsnamen „Burnus“ auf den Markt und bestand aus Natriumcarbonat und einen Pankreasrohextrakt (Poldermans 1990). Inzwischen sind die meisten in Waschmitteln verwendeten Proteasen bakteriellen Ursprungs (v.a. aus *Bacillus*-Stämmen). Weitere bedeutende technologische Anwendungsgebiete von Proteasen stellen die Lederindustrie (Entfernen von Nichtstrukturproteinen sowie Haaren; Ersetzen der Behandlung mittels Natriumsulfid und extrem alkalischen Lösungen), Molkereiindustrie (Proteasen wie Rennin, dem Pepsinanalogen aus Kälbermagen oder mikrobielle Proteasen), die Backindustrie (*Aspergillus oryzae*-Proteasen zum Abbau des pflanzlichen Speicherproteins Gluten), die Getränkeindustrie (Papain zur Entfernung von Trübungen) oder auch die Lebensmittelindustrie (Geschmacksverbesserung von Proteinhydrolysate enthaltenden Lebensmitteln) dar (Poldermans 1990; Rao *et al.* 1998).

Im medizinischen Bereich finden Proteasen ebenfalls bedeutende direkte Anwendungen, wie z.B. bei der Wundbehandlung, der Regulation der Blutgerinnung (bei Hämophilie) bzw. dem Auflösen von Blutgerinnseln oder der Unterstützung von Verdauungsprozessen (Flohé and Günzler 1990). Indirekte Verwendung finden Proteasen bei der Herstellung von Therapeutika wie z.B. für die C-terminale Amidierung bioaktiver Peptidpräkursoren (Bongers and Heimer 1994) oder für die Umwandlung von Schweine-Insulin in menschliches Insulin (Zündorf and Dingermann 2001; dieses Verfahren hat sich im industriellen Maßstab allerdings nicht durchsetzen können).

Obwohl Proteasen in ihrer natürlichen Funktion Peptidbindungen hydrolysieren, sind sie prinzipiell auch in der Lage, die Umkehrreaktion, d.h. die Synthese von (Poly)Peptiden zu katalysieren (*reverse proteolysis*, Bordusa 2002). Prominentestes Beispiel für eine

proteasekatalysierte Synthese ist der Süßstoff Aspartam, der durch die Verknüpfung von L-Aspartat und L-Phenylalanin durch die immobilisierte Protease Thermolysin aus *Bacillus thermoproteolyticus* entsteht (Poldermans 1990; Rao *et al.* 1998); L-Aspartyl-L-phenylalaninmethylester, Handelsname u.a. NutraSweet). Da Aspartam ca. 180 Mal süßer als „normaler“ Zucker ist, wird es weit verbreitet als Süßstoff verwendet, allerdings ist es nicht hitzestabil, so dass es nicht beim Backen verwendet werden kann. Synthesen mittels Proteasen können thermodynamisch oder (günstiger) kinetisch kontrolliert ablaufen (Ullmann and Jakubke 1999). Häufig finden wasserarme organische oder gefrorene Reaktionsmedien Anwendung. Zudem ist eine Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts durch Manipulation der „Abgangsgruppen“, die die Umkehrungsreaktion (Hydrolyse) verhindern, erreichbar (Bongers and Heimer 1994; Ullmann and Jakubke 1999; Wehofsky *et al.* 2003). Auf diese Weise ist es nicht nur möglich, einzelne Aminosäuren sondern auch (chemisch synthetisierte oder durch Proteolyse erhaltene) Peptide miteinander zu verknüpfen (Fragmentkondensation). Beispiele hierfür sind das *delta sleep-inducing peptide*, das *cholecystokinin* Oktapeptid, das Leu-Enkephalin, ein Analogon des *gonadotropin-releasing hormone* und die membranaktiven antibiotischen Peptide emerimicin III and IV (für Reviews s. Bongers and Heimer 1994; Gill *et al.* 1996). Selbst Proteine sind auf diese Weise erzeugbar, wobei im Zuge der Synthese der Peptide mittels Festphasensynthese (*solid phase peptide synthesis*, SPPS) auch nichtnatürliche Aminosäuren oder Module „eingebaut“ werden können. Durch sechs Ligationsschritte konnten RNase A-Derivate mit Fluor-substituierten Histidinen (H12 und/oder H119) hergestellt werden; die Gesamtausbeute lag bei 15% (Jackson *et al.* 1994). Durch Fragmentkondensation mittels *Staphylococcus aureus* V8-Protease wurde  $\alpha$ -Globin erzeugt, welches funktionales Hämoglobin lieferte (Sahni *et al.* 1989). Mit derselben Protease wurde auch die C-terminale Domäne von Thermolysin (Aminosäurereste 205–316) aus dem Fragment 205–302 und chemisch synthetisierten Peptidensequenzen 303–316 wiederhergestellt (De Filippis and Fontana 1990). Neben Proteasen in ihrer Wildtypform finden häufig auch durch *protein engineering* erzeugte Varianten Anwendung, bei denen die Potenz zur Synthese gegenüber der Hydrolyse gesteigert wurde (Jackson *et al.* 1994; Rao *et al.* 1998).

### 3.3.2 Proteasen zur biochemischen Charakterisierung von Proteinen

#### 3.3.2.1 Proteinsequenzierung/ peptide mapping

Eine grundlegende Charakterisierung von Proteinen basiert auf der Bestimmung ihrer Primärstruktur, d.h. ihrer Aminosäuresequenz. Hierzu wird üblicherweise ein nach seinem Erfinder Pehr Edman benanntes Verfahren verwendet, bei dem schrittweise die jeweils N-terminale Aminosäure modifiziert, vom Restprotein abgespalten und mittels *high performance liquid chromatography* (HPLC) analysiert wird (Edman and Begg 1967). Limitierungen dieser Methode bestehen v.a. in der Länge der analysierbaren Sequenzen (durch nicht 100%ige Umsätze bei den einzelnen Reaktionsschritten, Analyseschwierigkeiten bei Aminosäurewiederholungen, N-terminale Blockierungen u.a.). Trotz gewaltiger Fortschritte auf dem Gebiet der Massenspektrometrie (z.B. durch Einführung der Tandem-Massenspektrometrie, MS/MS), die nicht nur eine Massebestimmung sondern auch eine Sequenzierung insbesondere von Peptiden ermöglichen, existieren auch hier Limitierungen hinsichtlich der Länge der zu analysierenden Proteine. Eine sehr effiziente Methode zum spezifischen „Zerkleinern“ größerer Proteine ist die limitierte Proteolyse, bei der unter Verwendung von meist spezifischen Proteasen Proteinfragmente erhalten werden (im Gegensatz zur vollständigen Proteolyse, die einzelne Aminosäuren liefert). Nach Trennung (üblicherweise mittels *reversed-phase* HPLC, RP-HPLC) können diese Fragmente durch Proteinsequenzierung und/oder Massenspektrometrie analysiert werden (Kellermann 1999). Durch Verwendung von Proteasen mit unterschiedlicher Substratspezifität (in Parallelreaktionsansätzen) kommt es zu unterschiedlichen Fragmentierungen; aufgrund überlappender Bereiche in den erhaltenen Primärstrukturdaten ist ein „Zusammensetzen“ der Aminosäuresequenz möglich (in ähnlicher Weise wird bei der DNA-Sequenzierung durch die Verwendung von Restriktionsendonucleasen vorgegangen, Price and Johnson 1990; Kellermann 1999).

Um eine Beeinträchtigung des proteolytischen Abbaus durch die Ausbildung einer stabilen Tertiärstruktur des zu untersuchenden Proteins zu vermeiden, werden i.d.R. die im Protein enthaltenen Disulfidbrücken gespalten (mit Dithiothreitol, DTT, *Cleland's reagent*) und durch Modifizierung der entstandenen Thiolgruppen (mit Iodessigsäure oder Iodacetamid) ihre Wiederausbildung verhindert. Bei Verwendung von Proteasen, die auch in Gegenwart von Denaturanzien aktiv sind, kann eine Strukturbildung zusätzlich durch Zugabe von Denaturanzien verhindert werden (Welinder 1988). Häufig in diesem Zusammenhang verwendete Proteasen sind die spezifischen Proteasen Trypsin (spaltet C-terminal von Lys und Arg) oder die *Staphylococcus aureus* V8-Protease (spaltet C-terminal

von Glu), aber auch unspezifische Proteasen wie Thermolysin. Während erstere eine übersichtliche Anzahl von Fragmenten liefern, erzeugen letztere zwar leichter analysierbare Fragmente, deren „Zusammensetzen“ jedoch aufgrund der größeren Anzahl problematischer ist.

### 3.3.2.2 Lokalisierung flexibler Strukturbereiche

Trotz des Vorhandenseins entsprechender Aminosäurereste sind viele Proteine unter nativen Bedingungen gegen Proteasen resistent oder werden nur an wenigen ausgewählten Positionen gespalten. So sollte – rein statistisch – z.B. Trypsin ca.10% aller Peptidbindungen in einem Protein spalten, jedoch erfolgen auch in großen Proteinen – wenn überhaupt – nur einige wenige Spaltungen (Hubbard *et al.* 1998). Neben der eingangs des Kapitels ausgeführten Substratspezifität sind für einen erfolgreichen proteolytischen Angriff noch weitere Kriterien entscheidend. Zunächst und selbstverständlich muss die Protease unter den gegebenen Reaktionsbedingungen aktiv sein, d.h. der pH-Wert und die Temperatur müssen dem Aktivitätsprofil der Protease entsprechen und eventuell enthaltene Denaturanzien oder Komponenten (z.B. Chelatbildner bei Metalloproteasen, oxidierende Agenzien bei Cysteinproteasen u.ä.) dürfen die Aktivität der Protease nicht signifikant beeinträchtigen. Zudem müssen die aufgrund der Substratspezifität „potenziellen Spaltstellen“ sterisch zugänglich sein, d.h. sie dürfen nicht durch Einbettung in Sekundärstrukturelemente oder durch die Nähe von Disulfidbrücken, Glykosylierungen, Lipidierungen o.ä. gegen einen proteolytischen Angriff abgeschirmt sein. Daraus folgt auch, dass proteolytische Spaltungen zunächst an oberflächenlokalisierten Peptidbindungen erfolgen. Da i.d.R. nicht nur das Peptidrückgrat sondern auch die Seitenketten der Aminosäurereste in die Bindung an die Protease involviert sind, gilt obige Aussage zur Abschirmung ebenso für diese. Und letztendlich muss die Region des Proteins, in der die Spaltung erfolgen soll, eine ausreichende Flexibilität besitzen, um eine effiziente Bindung an das aktive Zentrum und die Nebenbindungsstellen der Protease zu ermöglichen (Novotný and Brucoleri 1987; Hubbard 1998). Dementsprechend werden primäre Spaltstellen in nativen Proteinen üblicherweise in flexiblen *loop*-Regionen gefunden. Primäre Spaltstellen sind gekennzeichnet durch das gleichzeitige Auftreten von einem N-terminalen ( $Xaa_N$ - $Xaa_{P1}$ ) und dem komplementären C-terminalen Fragment ( $Xaa_{P1'}$ - $Xaa_C$ ). Das Ausmaß der Interaktionen zwischen Protein und Protease (diese begrifflich vereinfachte Unterscheidung soll hier getroffen werden, auch wenn selbstredend Proteasen ebenfalls Proteine sind) ist sehr unterschiedlich. Hubbard *et al.* (Hubbard *et al.* 1994) ermittelten durch Analyse des

Trypsin-Trypsininhibitor-Komplexes und verschiedener bekannter Trypsinspaltstellen in Proteinen, dass für Trypsin beiderseits der zu spaltenden Peptidbindung wenigstens jeweils 6 Aminosäurereste in die Bindung involviert sind. Jedoch sind die Anforderungen für verschiedenen Proteasen sehr unterschiedlich. Das aktive Zentrum der Proteinase K liegt nahe der Moleküloberfläche und in die Substratbindung ist praktisch nur das Peptidrückgrat des Proteins involviert (Wolf *et al.* 1991); zudem besitzt Proteinase K ein sehr breites Substratspektrum. Daher ist Proteinase K häufig in der Lage, native Proteine abzubauen. Thermolysin besitzt ebenfalls ein breites Substratspektrum, jedoch liegt das aktive Zentrum dieser Protease in einer tiefen Spalte zwischen zwei Domänen (Colman *et al.* 1972; Holland *et al.* 1992). Eine Spaltung kann daher nur in ausgedehnten *loops* nativer Proteine erfolgen, was erklärt, warum viele kleine Proteine unter nativen Bedingungen resistent gegen Thermolysin sind. Dies und die hohe Thermostabilität dieser Protease macht sie sehr interessant für Stabilitätsuntersuchungen (s.u.).

Die Restriktionen für einen proteolytischen Abbau können genutzt werden, um flexible Bereiche der Proteinstruktur zu identifizieren, denn nur diese sollten angreifbar sein (zumindest deutlich besser als die kompakten Bereiche) – vorausgesetzt, dass sie potenzielle Spaltstellen enthalten. Durch Analyse der entstehenden Fragmente (s.o.) kann die Spaltstelle ermittelt werden. Zu beachten ist jedoch, dass für eine derartige Analyse der Flexibilität des Proteinmoleküls nur primäre Spaltstellen (s.o.) herangezogen werden können. Durch einen erfolgreichen proteolytischen Angriff wird das Protein i.d.R. destabilisiert (*nicked protein*, Fassina *et al.* 1986), so dass es leichter zu einer (weiteren) Entfaltung kommt, was zu verbesserten Substrateigenschaften für die Protease und damit verbunden zu einem weiteren Abbau führt (Arnold *et al.* 1996). Aus den Fragmenten  $Xaa_N-Xaa_i + Xaa_{i+1}-Xaa_j + Xaa_{j+1}-Xaa_C$  lässt sich nicht feststellen, welche der beiden Peptidbindungen  $Xaa_i-Xaa_{i+1}$  und  $Xaa_j-Xaa_{j+1}$  primäre Spaltstellen darstellen. Nur die Identifizierung der beiden Paare jeweils komplementärer Fragmente  $Xaa_N-Xaa_i + Xaa_{i+1}-Xaa_C$  bzw.  $Xaa_N-Xaa_j + Xaa_{j+1}-Xaa_C$  erlaubt ihre Beschreibung als primäre Spaltstellen. Die durch den Folgeabbau auftretenden neuen Fragmente bzw. Spaltstellen spiegeln also nicht unbedingt flexible und zugängliche Bereiche des intakten Proteinmoleküls wider und sind daher für eine Beschreibung des nativen Moleküls nicht geeignet.

Bekannte Beispiele für eine Fragmentierung nativer Proteine sind RNase A, aus der nach Inkubation in Gegenwart von Subtilisin die Fragmente Lys1-Ala20 und Ser21-Val124 entstehen (Richards and Vithayathil 1959), Cytochrom c, dessen Peptidbindung 56-57 in Gegenwart der Hämkomponente durch Proteinase K spezifisch gespalten wird (Spolaore *et al.* 2001) oder auch Apomyoglobin, das durch Thermolysin spezifisch zwischen den

Aminosäureresten 88 und 89 gespalten wird (Musi *et al.* 2004). Mitunter erfolgen auch zwei (oder mehr) Spaltungen im intakten Proteinmolekül parallel, was durch die Identifizierung aller jeweils komplementären Fragmente nachgewiesen werden kann wie im Fall von Thermolysin, bei welchem (bei autolytischem Verdau) parallel die Peptidbindungen 196–197 und 204–205 gespalten werden (Fassina *et al.* 1986). Oftmals kann jedoch durch das Fehlen bestimmter komplementärer Fragmente nicht entschieden werden, ob es sich um parallele oder Folgereaktionen handelt (s.o.). Nach Inkubation von RNase A in Gegenwart von Elastase (das Produkt wurde in Analogie zum Verdau mittels Subtilisin RNase E genannt) wurden die Fragmente Lys1–Ala19 und Ser21–Val124 identifiziert (Klee 1965). Es wurde ein sequenzieller Abbau durch primäre Spaltung der Peptidbindung Ala19–Ala20 gefolgt vom exoproteolytischen Abbau zum Fragment Ser21–Val124 postuliert. Durch den Einsatz von MS, Proteinsequenzierung und *genetic engineering* (RNase A-Varianten A20P-RNase A bzw. S21P-RNase A) konnte durch Arbeiten unserer Arbeitsgruppe diese These widerlegt werden – der Abbau beginnt durch Spaltung von Ser21–Ser22 gefolgt von der Abspaltung der dann C-terminalen Reste Ser21 und Ala20 (Anlagen **A2** und **A3**, s. Kapitel 5.2.1).

Aus experimentell bestimmten tatsächlichen Spaltungsereignissen und Strukturdaten bzw. -parametern wurden verschiedene Algorithmen entwickelt, um proteolyseempfindliche Bereiche vorhersagen zu können (Hubbard *et al.* 1998). Eine Kombination aus der Analyse der Solvenz Zugänglichkeit und der Temperaturfaktoren (Yuan *et al.* 2003) ergab dabei die beste Vorhersagemöglichkeit.

### **3.3.2.3 Subzelluläre Lokalisierung von Proteinen und Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen**

Zelluläre Proteine können löslich in den verschiedensten Zellkompartimenten vorkommen, sie können jedoch auch mit Membranen assoziiert bzw. sogar integraler Bestandteil von Membranen sein. Insbesondere die Charakterisierung von Membranproteinen ist häufig mit großen Schwierigkeiten verbunden (lösliche Expression, Kristallisation etc.). Mittels limitierter Proteolyse ist es zumindest möglich, durch Abbau der Bereiche, die nicht in die entsprechende Membran eingebettet sind, die Topologie zu bestimmen (Butler 1990; Pratt 1990). Nach einem Zellaufschluss werden die einzelnen subzellulären Fraktionen mittels Ultrazentrifugation isoliert (Schröter *et al.* 1999; Isolierung von jeweils Lumen und Membranfraktion). Die löslichen Proteine können nachfolgen wie oben beschrieben charakterisiert werden. Durch den Vergleich des Abbaus der Proteine in den jeweiligen Membranfraktionen mit dem Abbau nach Inkubation mit Lösungen erhöhter Ionenstärke

oder veränderten pH-Wertes zum Ablösen membranassoziierter Proteine bzw. nach Inkubation in Gegenwart von Detergenzien (z.B. Triton X-100) zum Auflösen der Membranstruktur lassen sich weitere Informationen zur Topologie der entsprechenden Proteine gewinnen (Butler 1990). Darüber hinaus ist es durch vergleichenden proteolytischen Abbau möglich, Interaktionen von Liganden mit membranassozierten Rezeptoren zu detektieren. Nach der Proteinbiosynthese kann auch der Verlauf posttranslationaler Modifizierungsreaktionen (im endoplasmatischen Retikulum und/oder im Golgi-Apparat) und die Oberflächenpräsentation von exprimierten Proteinen verfolgt werden (Pratt 1990; Naim 1999). Zum Einsatz kommen hier v.a. Proteinase K (aufgrund der großen Toleranz gegen Additive) und Trypsin (aufgrund der hohen Substratspezifität) (Pratt 1990).

## 4 Ribonuclease A

### 4.1 Ribonuclease A als Modellprotein

Ribonucleasen finden sich in relativ hohen Konzentrationen im Pankreas von Wiederkäuern, was zu ihrer frühzeitigen Entdeckung (Jones 1920) und Isolierung führte. Ende der 1950er Jahre produzierte die Schlachtereier Armour Co. (Chicago, IL) 1 kg reine RNase A und stellte diese kostenlos Wissenschaftlern in aller Welt zur Verfügung. Dies machte RNase A zum Modellprotein für die Grundlagenforschung für die nächsten Jahrzehnte. Wie es mehrfach in dem Kapitel zur Proteinstabilität und Proteinfaltung angeklungen ist, diente RNase A als Modellprotein für eine Vielzahl von bedeutenden Experimenten

- zur Proteinstabilitäts- und -faltungsproblematik (verbunden mit der Verleihung des Nobelpreises für Chemie 1972 an Christian B. Anfinsen)
- zur Chemie der Proteinsynthese (Nobelpreis für Chemie 1984 an Robert B. Merrifield)
- zur Enzymologie (Nobelpreis für Chemie 1972 an Stanford Moore und William H. Stein)
- zur Methodenentwicklung (NMR Spektroskopie, Saunders *et al.* 1957; H-D-Austausch NMR Spektroskopie zur Verfolgung von Faltungsprozessen, Udgaonkar and Baldwin 1988; Inkorporation nicht-natürlicher Strukturmimetika mittels *intein-mediated protein ligation*, Evans *et al.* 1998)
- zur Untersuchung von Evolutionsprozessen (RNase A-Superfamilie; Beintema *et al.* 1997; Beintema and Kleinedam 1998)
- zur Entwicklung von proteinbasierten Therapeutika (Raines 1999)
- und zu Studien, den proteolytischen Abbau von Proteinen betreffend (s.u.).