Acta histochemica, Suppl.-Bd. XVIII, S. 153–158 (1977)

Zur Spezifität und Empfindlichkeit des Proteasen-Substratfilmtests auf Gelatinebasis

Von H.-W. Denker

(Abteilung Anatomie der Medizinischen Fakultät der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen)

Mit einer Abbildung und einer Tabelle im Text

Proteasen-Substratfilmtests auf Gelatinebasis haben sich insbesondere in Untersuchungen über Blastozysten- und Spermien-Proteasen bewährt (Denker 1969, 1971 b, 1974 a und b; Wendt et al. 1975; weitere Literaturhinweise s. Denker 1974 a). Üblicherweise werden sie als allgemeine Proteasentests von geringer Spezifität angesehen, mit denen eine Vielzahl verschiedener Proteasen nachgewiesen werden kann.

In der vorliegenden Mitteilung werden Modellversuche besprochen, die zeigen, daß die Gelatinefilme gegenüber verschiedenen Proteasen durchaus eine verschiedene Empfindlichkeit besitzen. Am Beispiel der Protease von Kaninchen-Blastozysten wird demonstriert, wie der Substratfilmtest eingesetzt werden kann, um Enzyme, für die (zunächst) chromogene Substrate nicht bekannt sind, zu untersuchen und durch ihre Interaktion mit Serien von Inhibitoren von bekannter Spezifität zu charakterisieren und zu differenzieren.

Material und Methodik

Angewendet wurde eine bereits beschriebene hochempfindliche Version des Gelatine-Substratfilmtests (Denker 1974 a). Die Gelatinemenge pro Objektträger betrug 0,15 ml der 5 %-Lösung, die Inkubationsdauer durchweg $1^3/_4$ Std. bei 38 °C. Nach der Inkubation wurde, abweichend von der Originalvorschrift, nicht in Formollösung, sondern in gesättigter wäßriger $HgCl_2$-Lösung bei 4 °C fixiert, da hierbei ein unerwünschtes Loslösen der Substratfilme vom Objektträger besser vermieden werden kann. Außerdem ist die Protease der Kaninchen-Blastozyste durch $HgCl_2$ sicher hemmbar (Denker 1971 b).

Unter Verwendung dieses allgemeinen Testprinzips (Abb. 1) wurden die folgenden Experimente durchgeführt.

Modellversuche mit aufgetropften Enzymlösungen: Von einer Serie verschiedener Endo- und Exopeptidasen wurden Verdünnungsreihen hergestellt, jeweils 10 μl auf die Substratfilme

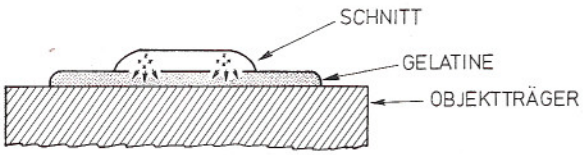

Abb. 1. Schematische Darstellung des Prinzips eines Substratfilmtests. Ein Kryostat-Nativschnitt wird direkt auf dem Substratfilm montiert. Nachzuweisende Enzyme (Kreuze) müssen diffusibel sein: Sie penetrieren in den Gelatinefilm (Pfeile) und hydrolysieren ihn während der Inkubation.

aufgetropft und wie oben angegeben in der feuchten Kammer inkubiert. Testansätze: Trypsin vom Rind (EC 3.4.21.4; Serva Nr. 37260, frei von Chymotrypsin, 180 EU/mg, ca. 2500 Anson-E/mg) in 0,067 m Phosphatpuffer *p*H 7,6 mit 0,005 m $CaCl_2$; α-Chymotrypsin vom Rind (EC 3.4.21.1; Serva Nr. 17160, ca. 45 BTEE-E/mg, ca. 600 Anson-E/mg) in 0,05 m Tris-Puffer *p*H 8,0 mit 0,025 m $CaCl_2$; Elastase (aus Pankreas; EC 3.4.21.11; Merck Nr. 24552, 80 E/mg gegenüber Orcein-Elastin als Substrat) in 0,05 m Tris-Puffer *p*H 8,8; Kollagenase (EC 3.4.24.3; Calbiochem Nr. 234136, 83 U/mg gegenüber Kollagen als Substrat, Gehalt an unspezifischen Proteasen: 0,01 %) in 0,05 m Tris-Puffer *p*H 7,2 mit 0,1 m $CaCl_2$; Papain aus Papaya carica (EC 3.4.22.2; Boehringer/Mannheim Nr. 15464, ca. 30 U/mg gegenüber BAEE) in 0,05 m Tris-Puffer *p*H 8,0 mit 0,005 m Cystein und 0,002 m EDTA; Pepsin vom Schwein (EC 3.4.23.1; Boehringer/Mannheim Nr. 15445, ca. 2500 Anson-E/mg) in 0,01 und 0,1 n Natriumacetat-HCl-Puffer *p*H 1,8; Plasmin (EC 3.4.21.7; AB KABI, Stockholm, ca. 15 casein units/mg protein) in 0,067 m Phosphatpuffer *p*H 7,6 mit 0,02 m Lysin-HCl; Leucinaminopeptidase aus Schweinenieren (α-Aminoacylpeptide hydrolase, cytosol, EC 3.4.11.1; Sigma Nr. L-1503, Type V, 132 U/mg gegenüber L-Leucinamid, frei von BAEE-, BTEE- oder TAME-spaltender Aktivität) in 0,05 m Tris-Puffer *p*H 8,5 mit 0,004 m $MgCl_2$; Aminosäure-Arylamidase aus Schweinenieren (α-Aminoacyl-peptide hydrolase, microsomal, EC 3.4.11.2; Boehringer/Mannheim Nr. 15075, ca. 4 U/mg gegenüber L-Leucin-p-nitranilid) in 0,067 m Phosphatpuffer *p*H 7.2; Carboxypeptidase A aus Rinderpankreas (EC 3.4.12.2; Boehringer/Mannheim Nr. 15441, ca. 35 U/mg gegenüber Hippuryl-L-phenylalanin, Gehalt an Chymotrypsin und Trypsin nicht nachweisbar) in 0,05 m Tris-Puffer *p*H 7,6 mit 0,1 m NaCl und 0,007 m $CoCl_2$; Carboxypeptidase B aus Schweinepankreas (EC 3.4.12.3; Boehringer/Mannheim Nr. 15265, ca. 150 U/mg gegenüber Hippuryl-L-arginin, Fremdaktivitäten: Carboxypeptidase A < 2 %, nach Behandlung mit DFP Chymotrypsin und Trypsin nicht nachweisbar) in 0,05 m Tris-Puffer *p*H 7,6 mit 0,1 m NaCl.

Inhibitorversuche an der Blastozysten-Protease vom Kaninchen: Kaninchen-Uteri mit Blastozysten wurden 7 Tage post coitum gewonnen, mit flüssigem Stickstoff eingefroren, am Kryostaten nativ 14 μm dick geschnitten und die Schnitte für den Test direkt auf den Gelatinefilmen montiert (vgl. auch Denker 1971b, 1974a und b, 1975). Die Substratfilme wurden vor der Montage der Schnitte mit Inhibitorlösung durchtränkt und anschließend luftgetrocknet, und zwar auf folgende Weise:

1. Wasserlösliche Inhibitoren wurden in 0,1 m Phosphatpuffer *p*H 7,0 gelöst. Die Hälfte des Substratfilms wurde mit 0,2 ml Inhibitorlösung 5 min lang bedeckt, dann wurde die Lösung abgegossen und der Film an der Luft getrocknet. Die andere Hälfte des Films wurde als Kontrolle nur mit Puffer in der gleichen Weise behandelt. Rinderserumalbumin, dem Kontroll-Puffer in der gleichen molaren Konzentration wie in den entsprechenden Inhibitorlösungen zugesetzt, blieb ohne jeden Einfluß auf den Ausfall der Reaktion.

2. Im Fall von wasserunlöslichen Inhibitoren wurde der ganze Substratfilm zunächst wie beschrieben mit reinem Phosphatpuffer (0,4 ml) durchtränkt; nach der Lufttrocknung wurde dann die Hälfte des Films mit der Inhibitorlösung (Lösungsmittel: N,N-Dimethylformamid, Methanol, Äthanol) und die andere Hälfte mit dem Lösungsmittel allein bedeckt und schließlich wieder getrocknet.

Getestete Inhibitoren: Trypsininhibitor aus Sojabohnen (Kunitz; Merck Nr. 24020); Trypsin-Kallikrein-Inhibitor vom Rind (Trasylol®; Bayer AG); Trypsin-Akrosin-Inhibitor aus Seminalplasma vom Schwein, Gemisch aus den Fraktionen SSPI-I und II; sekretorischer Trypsininhibitor aus Rinderpankreas (PSTI); Leupeptin, Antipain, Chymostatin und Pepstatin (H. Umezawa, Tokyo); (die letzteren 6 Inhibitoren wurden freundlicherweise von Herrn Prof. H. Fritz, München, zur Verfügung gestellt); α_1-Antitrypsin und α_1-Antichymotrypsin (Behringwerke, Marburg); p-Nitrophenyl-p-Guanidinobenzoat (NPGB; Merck Nr. 10562); 2-Hydroxy-5-nitro-α-toluolsulfonsäuresulton. Weitere Angaben zu den Inhibitoren vgl. Denker (1975).

Ergebnisse

Die Ergebnisse der Modellversuche mit aufgetropften Enzymlösungen sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Zu beachten ist, daß die unter „Material und Methodik" angegebenen spezifischen Aktivitäten der verschiedenen Enzympräparate mit Ausnahme der in Anson-Einheiten angegebenen nicht ohne weiteres vergleichbar sind, sondern sich auf den Umsatz sehr verschiedener Substrate unter verschiedenen Bedingungen beziehen. Eine Einheit der Proteasenaktivität, die für alle diese sehr verschiedenen Enzyme gelten würde, existiert nicht. Der Vergleich muß daher in erster Linie auf der Basis der Enzymkonzentration (in mg/ml) durchgeführt werden und kann nur einen groben Anhalt liefern. Es zeigt sich dennoch, daß die Gelatine-Substratfilme durch Trypsin, Papain, Elastase und Chymotrypsin leicht und durch Kollagenase, Plasmin und Pepsin weniger leicht lysiert werden. Gegenüber den Exopeptidasen Leucinaminopeptidase, Arylamidase und Carboxypeptidase A sind sie erwartungsgemäß resistent. Das verwendete Carboxypeptidase-B-Präparat ergab zwar in den Konzentrationen 1 und 5×10^{-1} mg/ml eine Lysis, doch war diese Aktivität durch 10^{-1} m Diisopropylfluorphosphat (DFP) hemmbar, so daß man davon ausgehen muß, daß sie von Verunreinigungen durch Serin-Endopeptidasen verursacht wurde, auf die die Herstellerfirma bereits hinweist (s. Material und Methodik).

Tabelle 1
Empfindlichkeit des Gelatine-Substratfilmtests für verschiedene Proteasen

	Nachweisbarkeitsgrenze (vollständige Lysis)[1] (mg/ml)
Trypsin	1×10^{-4}
Papain	1×10^{-4}
Chymotrypsin	1×10^{-3}
Elastase	1×10^{-3}
Plasmin	5×10^{-2}
Kollagenase	1×10^{-2}
Pepsin	1×10^{-2}
Leucinaminopeptidase	∅
Arylamidase	∅
Carboxypeptidase A	∅
Carboxypeptidase B	∅[2]

∅: Das Enzym lysiert auch in der höchsten getesteten Konzentration, d. i. 1 mg/ml, die Gelatine-Substratfilme nicht.

[1] In höheren Verdünnungsstufen, hier nicht angegeben, findet sich noch eine unvollständige Lysis.

[2] Nach Behandlung des Enzympräparates mit 0,1 m DFP.

Versucht man eine grobe Abschätzung der absoluten Empfindlichkeit des Substratfilmtests für Trypsin, und geht man dabei von der gefundenen vollständigen Lyse durch eine Trypsinkonzentration von 1×10^{-4} mg/ml (bei einer spezifischen Aktivität des Präparates von 2500 Anson-E/mg) aus, so entspräche dies in einem

histochemischen Test bei einem angenommenen Areal von z. B. 10 μm $\times$ 10 μm und einer Schnittdicke von 14 μm einer Trypsinmenge von ca. 1×10^{-13} mg Trypsin entsprechend $3{,}5 \times 10^{-10}$ Anson-Einheiten.

Die Protease sich implantierender Kaninchen-Blastozysten zeigt im Gelatine-Substratfilmtest sehr starke Lysiseffekte (zu weiteren Details vgl. Denker 1971b, 1974a und b). Von den getesteten Inhibitoren hemmen dieses Enzym sehr stark, d. h. im Konzentrationsbereich von 1×10^{-6} bis 5×10^{-5} m (Konzentration in der für die Durchtränkung des Substratfilms verwendeten Lösung): Sojabohnen-Trypsininhibitor, Trasylol®, SSPI — I + II, Leupeptin, Antipain, PSTI, α_1-Antitrypsin und NPGB. Schwächere, aber noch eindeutig positive Hemmeffekte zeigen α_1-Antichymotrypsin (1×10^{-4} m) und Chymostatin (1×10^{-3} m). Pepstatin und 2-Hydroxy-5-nitro-α-toluolsulfonsäuresulton sind ohne nachweisbare Hemmwirkung.

Diskussion

Wie die Modellexperimente mit aufgetropften Enzymlösungen zeigen, sind die Gelatine-Substratfilme leicht durch die Exopeptidasen Trypsin, Papain, Elastase und Chymotrypsin abzubauen; für Pepsin, Plasmin und Kollagenase sind die Gelatinefilme nur ein mäßig gutes Substrat. Zu beachten ist, daß das Kriterium hier die vollständige Lysis, d. h. das Zerlegen in diffusible Bruchstücke ist. Damit kommt dem Ort des Angriffs im Protein-Gerüstwerk (der bei verschiedenen Endopeptidasen verschieden ist) eine wesentliche Bedeutung zu, und es können durchaus Diskrepanzen bestehen zu einer Aktivitätsbestimmung, die sich etwa auf die Zahl der freigesetzten Aminogruppen stützen würde. Unter diesen Voraussetzungen entspricht es der Erwartung, daß Exopeptidasen (Leucinaminopeptidase, Arylamidase, Carboxypeptidasen) die Substratfilme nicht lysieren.

Über die Zuordnung der Blastozysten-Protease vom Kaninchen, die die Gelatinefilme sehr leicht angreift, können andererseits auf Grund der Inhibitorversuche jetzt erste Aussagen gemacht werden. Das Enzym wird stark gehemmt durch SSPI, Leupeptin, Antipain, PSTI und NPGB, welche eine ausgeprägte Spezifität für Trypsin zeigen und Chymotrypsin nicht hemmen. Das aktive Zentrum des Blastozysten-Enzyms muß dem des Trypsins sehr ähnlich sein. Andererseits weist der zwar schwächere, aber eindeutige Effekt von α_1-Antichymotrypsin und Chymostatin darauf hin, daß auch eine Beziehung zu Chymotrypsin besteht, obwohl 2-Hydroxy-5-nitro-α-toluolsulfonsäuresulton ohne Wirkung blieb. Das Inhibitorspektrum schließt eine Einordnung als kollagenase- oder pepsin(kathepsin-D)-ähnlich aus (z. B. kein Effekt von Pepstatin). Interessanterweise spaltet das Enzym aber typische synthetische Trypsin- und Chymotrypsin-Substrate (wie BAEE, BANA, GPNA, ATEE) nicht in meßbaren Raten. Es ist daher möglicherweise eher mit Elastase verwandt, obwohl auf Grund des Inhibitorspektrums sicher nicht identisch mit Pankreas-Elastase oder elastase-ähnlichen Enzymen aus Leukozyten (Denker 1975, Denker und Fritz, in Vorbereitung). Auch gelang es bisher nicht, eine Aktivität gegenüber Orcein-Elastin zu zeigen (Denker, unveröffentlicht). Es ist andererseits auffällig, daß die Gelatinefilme durch Pankreas-Elastase leicht abgebaut werden, wie die Modellexperimente zeigen.

Bei Auftrennung der Blastozysten- und Uterussekret-Proteasen des Kaninchens in der Mikro-Disc-Elektrophorese erweist sich, daß mit Benzoylarginin-β-naphthyl-

amid (BANA) und Glutarylphenylalanin-β-naphthylamid (GPNA) andere Fraktionen die Hauptaktivität zeigen als mit Gelatinefilmen als Substrat (Denker und Petzoldt, in Vorbereitung). Es erscheint daher sinnvoll, sich bei Proteasenuntersuchungen nicht nur auf die Verwendung von chromogenen Substraten zu stützen. Wenn auch Enzyme erfaßt werden sollen, für die geeignete Amid- oder Estersubstrate nicht oder noch nicht bekannt sind, ist die Anwendung eines Gelatine-Substratfilmtests unerläßlich. Dabei muß beachtet werden, daß mit Substratfilmtests grundsätzlich nur diffusible Enzyme nachgewiesen werden (Daoust 1961, Denker 1971 a), im Gegensatz zur Situation bei Verwendung diffusibler chromogener Substrate im flüssigen Inkubationsmedium. Im letzteren Fall werden bekanntlich in erster Linie entweder primär oder durch Fixierung strukturgebundene Enzyme dargestellt, während die diffusiblen Fraktionen ins Inkubationsmedium hinein verlorengehen. Membranmethoden dürften eine Mittelstellung einnehmen.

Fräulein Gerda Bohr sei für ihre ausgezeichnete technische Assistenz herzlich gedankt. Herrn Prof. Dr. H. Fritz, München, danken wir für wertvolle Ratschläge, und ihm und Herrn Prof. Dr. H. G. Schwick sowie Herrn Dr. N. Heimburger, Behringwerke Marburg, und Herrn Dr. E. Truscheit, Bayer AG, Wuppertal, für die Überlassung von Inhibitoren.

Diese Untersuchungen wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt (De 181/4).

Summary

Highly sensitive gelatin substrate films prepared according to a recent variant of the procedure are studied for their susceptibility to the action of various endopeptidases and exopeptidases. Trypsin, papain, elastase, and chymotrypsin are found to hydrolyze the gelatin films most easily, while higher enzyme concentrations are required in case of pepsin, plasmin and collagenase. The exopeptidases, i.e. leucine aminopeptidase, amino acid arylamidase and carboxypeptidases A and B do not cause lysis of gelatin substrate films.

The example of a rabbit blastocyst protease involved in implantation is given to demonstrate the application of gelatin substrate film tests for studies of enzymes which have no or little activity against known synthetic substrates (like BANA or GPNA) but hydrolyze gelatin films. Studies of interactions of this blastocyst protease with various inhibitors of known specificity, however, show that the active center of this enzyme nevertheless has striking similarities to trypsin (and also to chymotrypsin). The enzyme is possibly related to elastase. It is emphasized that, besides this, there are a number of different protease type enzymes in rabbit blastocyst and uterine tissues, some of which can be demonstrated only with chromogenic substrates and some only by gelatin methods. Aspects of applicability of the two types of protease tests are briefly discussed.

Literatur

Daoust, R.: Localization of desoxyribonuclease activity by the substrate film method. In: General Cytochemical Methods (Danielli, J. F. = ed.) Bd. **2**, pp. 153–170. New York & London: Academic Press, 1961.

Denker, H.-W.: Substratfilmtest für den Proteasennachweis. 13. Sympos. Ges. f. Histochemie, Graz 1969. Acta histochemica Suppl. **X**, 303–305 (1971).

Denker, H.-W.: Enzym-Topochemie von Frühentwicklung und Implantation des Kaninchens. I. Glykogenstoffwechsel. Histochemie **25**, 256–267 (1971 a).

Denker, H.-W.: Enzym-Topochemie von Frühentwicklung und Implantation des Kaninchens. III. Proteasen. Histochemie **25**, 344–360 (1971 b.)

Denker, H.-W.: Protease substrate film test. Histochemistry (Histochemie) **38**, 331–338 und **39**, 193 (1974a).

Denker, H.-W.: Trophoblastic factors involved in lysis of the blastocyst coverings and in implantation in the rabbit: observations on inversely orientated blastocysts. J. Embryol. Exp. Morph. **32**, 739–748 (1974b).

Denker, H.-W.: Interaction of proteinase inhibitors with blastocyst proteinases involved in implantation. In: Protides of the Biological Fluids. Proceedings of the XXIIIrd Colloquium, Brugge 1975 (Peeters, H. = ed.). Oxford etc.: Pergamon Press (im Druck).

Denker, H.-W., and U. Petzoldt: Micro-disc electrophoretic separation of rabbit blastocyst and uterine secretion proteinases. (In Vorbereitung.)

Wendt, V., W. Leidl and H. Fritz: The lysis effect of bull spermatozoa on gelatin substrate film. Methodical investigations. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. **356**, 315–323 (1975).

Anschrift des Verfassers:
Dr. Dr. H.-W. Denker, Abteilung Anatomie der Medizinischen Fakultät der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen, 51 Aachen, Melatener Straße 211.

Anmerkungen zu:

Denker, H.-W.: Zur Spezifität und Empfindlichkeit des Proteasen-Substratfilmtests auf Gelatinebasis. Acta histochem. (Jena) Suppl. XVIII, 153-158 (1977)

Wie sich aus Hemmversuchen mit TLCK und Antipain ergibt, ist der beschriebene Lysiseffekt von Chymotrypsin vorwiegend auf in dem verwendeten Präparat enthaltene Spuren von Trypsin zurückzuführen. Gegenüber reinem Chymotrypsin sind die Gelatine-Substratfilme weitgehend stabil.