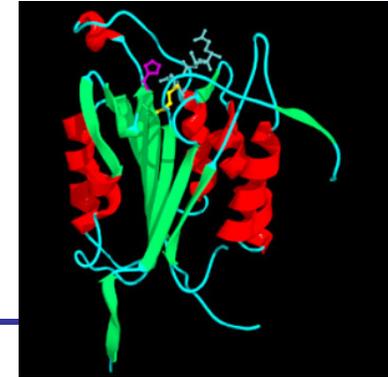


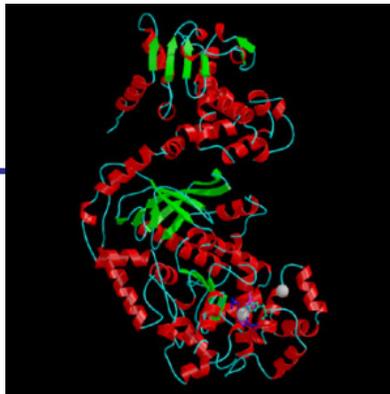
Retropepsin...



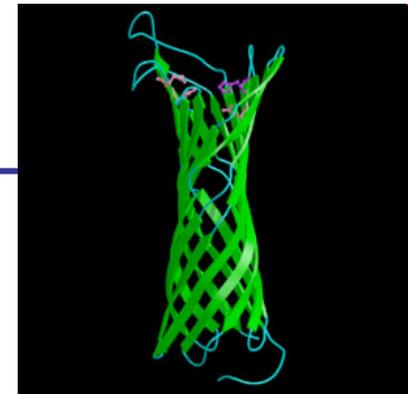
Caspase

Proteasen

(Peptidasen =
Peptidbindungshydrolylasen =
Proteasen = Proteinasen =
proteolytische Enzyme)



Anthrax lethal factor



Omptin

Wozu Proteolyse?

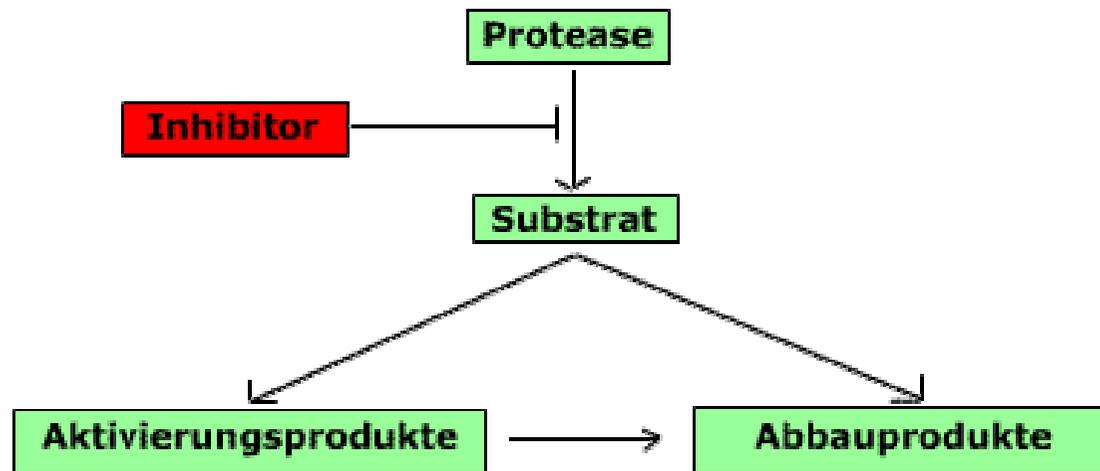
- Proteolysis is used by the cell for several purposes. They include:
- Removal of N-terminal methionine residues after translation.
- Removal of the signal sequence of peptides after their transport through a membrane.
- Separation of viral proteins that were translated from a polycistronic mRNA
- Digestion of proteins from foods as a source of amino acids
- Conversion of predecessor-proteins (proenzymes, zymogens, prehormones) into their final structures.
- Degradation of cyclins at different stages of the cell cycle.
- Proteolysis is also used in research and diagnostic applications:
- In gel digestion of proteins after separation by gel electrophoresis for the identification by mass spectrometry
- Digestion of proteins in solution for proteome analysis by LC-MS.

„Geschichte“ und Aufgaben von Proteasen

- Beginn der Enzymforschung in 1833, als der französische Chemiker Anselme Diastase das erste Enzym überhaupt entdeckte.
- Enzymspezifität wurde von Emil Fischer entdeckt, er postulierte, dass Enzyme und ihr Substrat sich wie Schlüssel und Schloss zueinander verhalten.
- 1897 entdeckte Eduard Buchner anhand der alkoholischen Gärung, dass Enzyme auch ohne die lebende Zelle katalytisch wirken können.
- Anfang des 20. Jahrhunderts geschah sehr viel in der Enzymforschung: Der bedeutendste Wissenschaftler dieser Zeit war der deutsche Chemiker Otto Röhmer. Er isolierte erstmals Enzyme und entwickelte Verfahren zur enzymatischen Ledergerbung.
- Leonor Michaelis und Maud Menten leisteten Pionierarbeit in der Erforschung der Enzymkinetik.

Bei der proteolytischen Spaltung findet eine Hydrolyse von Peptidbindungen statt.

Ablauf einer Proteolyse



PROTEASEN in general...

- Proteasen sind Enzyme, die die Peptidbindungen eines Proteins hydrolysieren, es findet also eine Proteolyse statt.
- Eine Untergruppe der Proteasen sind die Endoproteasen, die Peptidbindungen innerhalb einer Peptidkette spalten. Sie werden unterschieden von den Exopeptidasen oder Peptidasen, die außen liegende Bindungen hydrolysieren.
- Proteasen werden nach ihren Aktivitäten, nach in ihren aktiven Zentren vorhandenen funktionellen Gruppen und nach ihrem Katalysemechanismus in vier Klassen unterteilt: Serin-, Cystein-, Aspartat- und Metallo-Proteasen.

Biotechnologie in Waschmitteln

„Die Strategie von Henkel sieht vor, die Möglichkeiten der Bio- und Gentechnologie immer dann zu nutzen, wenn damit ein ökologischer Zugewinn, ein höherer Nutzen für die Verbraucher und ökonomische Vorteile für Henkel verbunden sind. Aufgrund der beschriebenen Vorteile und Möglichkeiten wird der Einsatz von Enzymen in Wasch- und Reinigungsmitteln als Paradebeispiel für die sinnvolle Nutzung der so genannten Weißen Gentechnik betrachtet.“



Exopeptidasen

Exopeptidasen spalten die Polypeptidkette von den Enden her.

N-Terminal angreifende Peptidasen werden je nach abgespaltenem Fragment als **Aminopeptidasen** (Abspaltung einer einzelnen Aminosäure), **Dipeptidyl-Peptidasen** (Freisetzung eines Dipeptids) oder **Tripeptidyl-Peptidasen** (Freisetzung eines Tripeptids) bezeichnet.

Am C-Terminus agierende Exopeptidasen setzen einzelne Aminosäuren (**Carboxipeptidasen**) oder Dipeptide (**Peptidyl-Dipeptidasen**) frei. Darüber hinaus gibt es Exopeptidasen, die spezifisch Dipeptide spalten (**Dipeptidasen**) oder endständige substituierte, zyklisierte oder über Isopeptidbindungen verknüpfte Aminosäuren entfernen können (**Omega-Peptidasen**).

Endopeptidasen

Endopeptidasen spalten meist an sehr spezifischen Stellen innerhalb der Polypeptidkette.

Die Länge der zu spaltenden Polypeptidkette kann bei Endopeptidasen in einem weiten Bereich variieren. Meist sind Proteine die Substrate. Es gibt jedoch auch eine Untergruppe von Endopeptidasen, die auf kürzere Peptide als Substrat spezialisiert sind (**Oligopeptidasen**).

Eine Klassifizierung anhand der Spezifität ist nicht möglich, deshalb erfolgt die Unterteilung basierend auf den verschiedenen, aktiven Zentren.

Peptidase-Typ

Aminopeptidasen

Dipeptidasen

Dipeptidyl-Peptidasen

Peptidyl-Dipeptidasen

Serin-Carboxypeptidasen

Metallo-carboxypeptidasen

Cystein-

Carboxypeptidasen

Omegapeptidasen

Serin-Endopeptidasen

Cystein-Endopeptidasen

Aspartat-Endopeptidasen

Metalloendopeptidasen

Threonin-Endopeptidasen

Endopeptidasen

unbekannten Typs

Art des aktiven Zentrums (MEROPS)

<http://merops.sanger.ac.uk/>

Peptidasen haben, wie alle Enzyme, ein aktives Zentrum, das die jeweilige Reaktion – in diesem Fall die Hydrolyse von Peptidbindungen – ermöglicht.

Innerhalb dieser Zentren sind einige bzw. Gruppen von Aminosäuren von entscheidender Bedeutung für die Funktionalität. Daher werden Peptidasen in der MEROPS-Datenbank anhand der chemischen Beschaffenheit ihrer katalytischen, aktiven Zentren in sechs Gruppen klassifiziert.

MEROPS

- **MEROPS: the peptidase database**

Neil D. Rawlings*, **Alan J. Barrett** and **Alex Bateman** The Wellcome Trust Sanger Institute,
Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridgeshire, CB10 1SA, UK

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +44 1223 494983; Fax: +44 1223 494919;
Email: ndr@sanger.ac.uk

Received September 11, 2009. Revised October 12, 2009. Accepted October 14, 2009.

Peptidases, their substrates and inhibitors are of great relevance to biology, medicine and biotechnology. The *MEROPS* database (<http://merops.sanger.ac.uk>) aims to fulfil the need for an integrated source of information about these. **The database has a hierarchical classification in which homologous sets of peptidases and protein inhibitors are grouped into protein species, which are grouped into families, which are in turn grouped into clans.** The classification framework is used for attaching information at each level. An important focus of the database has become distinguishing one peptidase from another through identifying the specificity of the peptidase in terms of **where it will cleave substrates and with which inhibitors it will interact.** We have collected **over 39 000 known cleavage sites** in proteins, peptides and synthetic substrates.

These allow us **to display peptidase specificity and alignments of protein substrates to give an indication of how well a cleavage site is conserved, and thus its probable physiological relevance.** While the number of new peptidase families and clans has only grown slowly the number of complete genomes has greatly increased. This has allowed us to add an analysis tool to the relevant species pages to show significant gains and losses of peptidase genes relative to related species.

MEROPS

Funktionelle Aminosäure bzw. aktives Zentrum	Hauptartikel	Beispiel	Inhibitor
A Asparaginsäure	Aspartylproteasen	Pepsin , Cathepsin E	Pepstatin
C Cystein	Cysteinproteasen	Papain , Cathepsin K , Caspase , Calpain	Iodacetat , Iodacetamid , Z-Phe-Phe-diazomethylketon ^[1]
G Glutaminsäure		Scytalidoglutamische Peptidase	1,2-Epoxy-3-(p-nitrophenoxy)propan (EPNP)
M Metallo (Metallkomplex)	Metalloproteasen	Thermolysin , Collagenase (bei Wirbeltieren), Carboxypeptidase A u. B	EDTA , 1,10-Phenanthrolin
S Serin	Serinproteasen	Chymotrypsin , Plasmin , Thrombin , Trypsin	APMSF , PMSF , AEBSF , Aprotinin , Diisopropylfluorophosphat , α1-Antiproteinase (α1-Antitrypsin)
T Threonin	Threonylprotease n	Proteasom	(Lactacystin)
U Unbekannt		gpr-Endopeptidase , Prepilin Typ IV Peptidase	Keiner der Obengenannten

Kontrollierte Aktivität

der Proteasen...

Limitierte Proteolyse

Limitierte Proteolyse



z.B.
Gerinnungsfaktoren
Hormonaktivierung

- **Bei der limitierten Proteolyse wird die inaktive Vorstufe eines Enzyms gespalten und dadurch in die aktive Form überführt.** Die Spaltung führt zu einer Konformationsänderung, die das aktive Zentrum des Enzyms für das Substrat zugänglich macht. Beispiele für proteolytische Spaltungen bei Enzymen sind die Verdauungsenzyme wie Trypsin, bzw. dessen Vorstufe Trypsinogen, und Chymotrypsin mit seiner Vorstufe Chymotrypsinogen. Die Vorstufen werden auch Zymogene genannt.
- Andere Beispiele für Proteine oder Polypeptide, die durch Hydrolyse aus inaktiven Vorstufen entstehen, sind Hormone (z.B. Proinsulin/Insulin), Bindegewebsproteine (z.B. Procollagen/Collagen) und Proteine der Blutgerinnung (z.B. Fibrinogen/Fibrin). Proteolytische Spaltungen sind irreversibel.
- Ein durch proteolytische Spaltung aktiviertes Enzym wird daher durch die Bindung inhibitorischer Proteine inaktiviert, die an das aktive Zentrum binden.

Prominente Vertreter der limitierten Proteolyse

Serin Proteasen

Serin-Proteasen sind wie die Cystein-, Aspartat- und Metallo-Proteasen eine Untergruppe der Proteasen.

Zu den Serin-Proteasen gehören die Verdauungsenzyme des Pankreas, zum Beispiel Chymotrypsin, Trypsin und Pepsin.

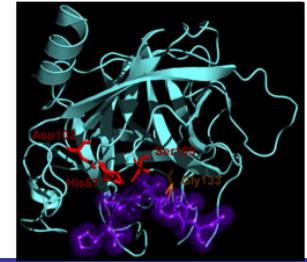
Diese Enzymgruppe besitzt strukturelle Gemeinsamkeiten, die grundlegenden Einfluss auf die katalytische Aktivität haben:

1. Kennzeichnend für das aktive Zentrum des Enzyms ist ein aktiver Serin-Rest, der - in Verbindung mit zwei weiteren Aminosäuren - die so genannte katalytische Triade der Serin-Proteasen bildet. Dieser Serin-Rest ist namensgebend für diese Enzymgruppe.
2. Bei der Bindung des Substrates und seiner Hydrolyse bildet sich ein tetraedrisches Übergangsprodukt aus dem Substrat und dem aktiven Serin-Rest, das kovalent an das Enzym gebunden wird. Die Ausbildung dieses Zwischenproduktes stabilisiert den Komplex durch Besetzung des Oxyanion-Lochs und ist wesentlich für die katalytische Aktivität des Enzyms.
3. Der tetraedrische Übergangszustand ermöglicht die Ausbildung von Wasserstoff-Brücken. Das bedeutet, dass das Übergangsprodukt mit höherer Affinität an das Enzym bindet als das Ausgangssubstrat. Serin-Protease-Inhibitoren mit tetraedrischen Phosphat-Gruppen (z.B. DIPF) bilden ein Analogon zum Übergangszustand und hemmen damit die Katalyse irreversibel.

Serinproteaseninhibitoren

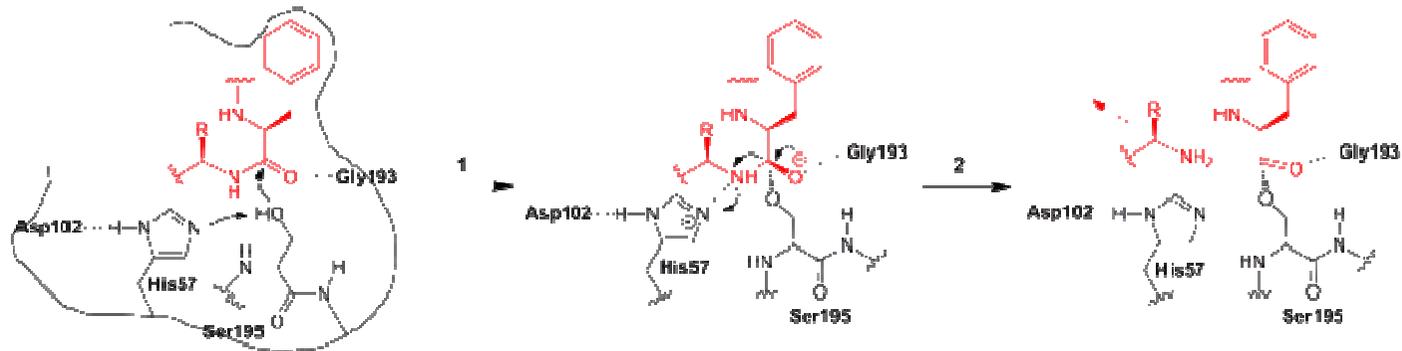
- Die Reaktion mit Diisopropylfluorphosphat (DIPF) gilt als diagnostischer Test für das Vorhandensein eines aktiven Serin-Restes in Serin-Proteasen wie Chymotrypsin oder der Acetylcholin-Esterase. Das Enzym wird dabei irreversibel gehemmt, da DIPF über eine tetraedrische Phosphat-Gruppe verfügt, die ein Analogon zum Übergangszustand bei der Katalyse darstellt und damit den Platz für das Substrat besetzt. Andere Serin-Reste im Enzym reagieren nicht mit DIPF. Durch die organische Phosphat-Gruppe und deren irreversible inhibitorische Wirkung auf die Acetylcholin-Esterase, wirkt DIPF als starkes Neurotoxin.

Chymotrypsin

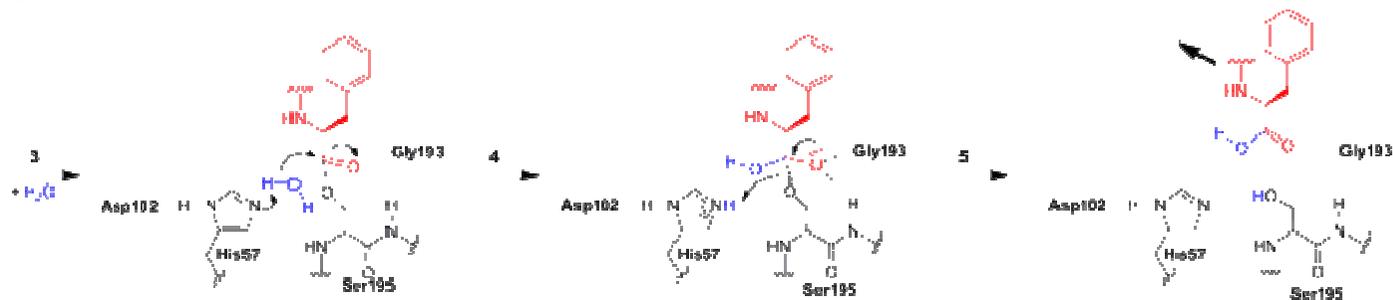


Das Enzym Chymotrypsin wird als typisches Beispiel einer Serin-Protease beschrieben. Ferner behandelt das Modul die Zymogen-Aktivierung von Chymotrypsinogen, die reversible Hemmung des Enzyms durch den Chymotrypsin-Inhibitor und beschreibt die Struktur des aktiven Chymotrypsins und seiner Strukturmerkmale, d.h. die katalytische Triade und das Oxyanionloch.

Chymotrypsin

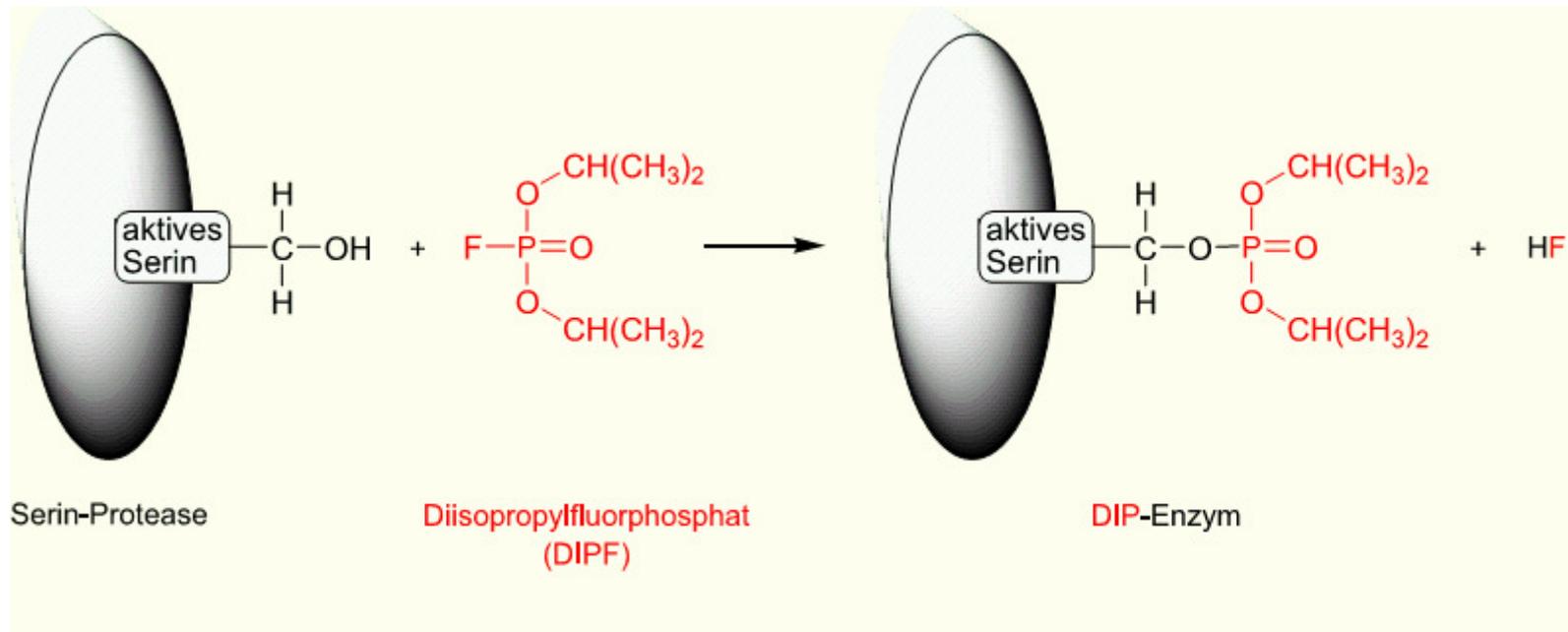


Im ersten Reaktionsschritt (1) erfolgt ein nukleophiler Angriff des katalytischen Serins (Ser195) an die Peptidbindung, die gespalten werden soll. Das Histidin-57 (His-57) fungiert hierbei als Base, da es ein Proton von Ser195 entzieht. Dabei entsteht ein kurzlebiger, tetrahedraler Übergangszustand, bei dem anschließend eine Bindungsspaltung zum restlichen Substratpeptid erfolgt (2). Dieses verlässt das Enzym. Das übriggebliebene Acyl-Enzym-Intermediat ist hingegen stabil und kann auch mit Hilfe von Substratanaloga isoliert werden.[\[3\]](#)



Durch Einlagerung von Wasser (Schritt 3, blau) reagiert dieses als nukleophiles Agens und greift den Carbonylkohlenstoff des Intermediates an. His57 fungiert hierbei als Base und nimmt ein Proton des Wassers auf. Es bildet sich wieder ein tetrahedraler Übergangszustand (4). Dieser ist kurzlebig (5). Dieser setzt das restliche Polypeptid frei und regeneriert infolgedessen das Ser195. Ein neuer Zyklus kann beginnen.

Inhibierung von Serin-Proteasen mit Diisopropylfluorophosphat



Zymogene

Unter dem Begriff Zymogene fasst man inaktive Enzymvorstufen zusammen, die erst durch Spaltung ihrer Peptidkette an bestimmten Stellen in die aktiven Formen überführt werden.

Zur Kennzeichnung fügt man an den Namen des aktiven Enzyms häufig die Endsilbe "-ogen" an. Beispielsweise ist Pepsinogen das Zymogen von Pepsin.

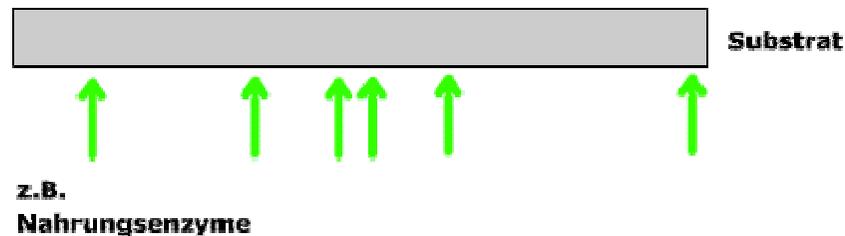
Eine bekannte Gruppe von Enzymen, die zunächst als Zymogene vorliegen, sind die Verdauungsenzyme wie z.B. Pepsin und Trypsin. Die produzierenden Zellen und Gewebe schützen sich vor dem Selbstverdau durch die unspezifischen Verdauungsenzyme, indem sie die katalytisch inaktiven Zymogene produzieren, die erst am physiologisch vorgesehenen Wirkungsort, z.B. im Magen oder Darm, in die aktiven Enzyme umgewandelt werden.

Die zur Aktivierung notwendigen Spaltungsreaktionen können durch spezielle Proteasen, durch das aktive Enzym selbst (so kann Trypsin seine Vorstufe Trypsinogen aktivieren) oder durch die chemische Umgebung (z.B. kann das saure Milieu im Magen Pepsinogen zu Pepsin aktivieren) durchgeführt werden.

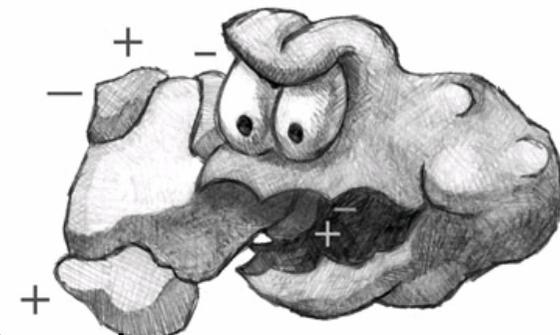
Ein weiteres Beispiel für das Auftreten von Zymogenen sind die verschiedenen Blutgerinnungsfaktoren, die im Verlauf einer Kaskade schrittweise durch proteolytische Spaltungen aktiviert werden.

Unspezifische Proteolyse

Unspezifische Proteolyse

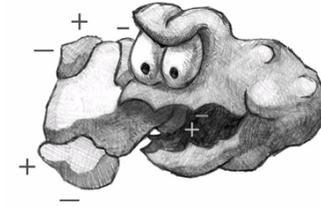


Bei der unspezifischen Proteolyse findet quasi ein Totalverdau eines Ziel-Proteins statt.



(Credit: Adrian LeCesne)

Proteinase K



- **Proteinase K** (also **protease K** or **endopeptidase K**) is a broad-spectrum serine protease.
- The enzyme was discovered in 1974 in extracts of the fungus *Engyodontium album* (formerly *Tritirachium album*). Proteinase K is able to digest native keratin (hair), hence, the name "Proteinase K".
- The predominant site of cleavage is the peptide bond adjacent to the carboxyl group of aliphatic and aromatic amino acids with blocked alpha amino groups. It is commonly used for its broad specificity.

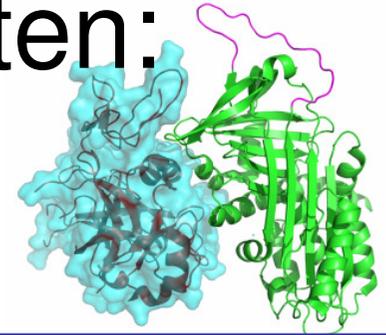
Ein Beispiel für ein Zusammenwirken von Proteasen und Porenbildnern: Granzyme und Perforin

Granzyme (von Granulum und Enzym) sind Serin-Proteasen, die in den intrazellulären Granula (Typ 1-Granula) von Abwehrzellen des Immunsystems vorhanden sind, vor allem in cytotoxischen T-Zellen (CTL) und Killer (NK)-Zellen.

Unterstützt von dem Enzym Perforin, das die Zellwand durchlöchert, dringen die Granzyme in die Zelle ein und induzieren den programmierten Zelltod (Apoptose) der Zielzelle. Perforin ist ein Protein, das mit Membranflächen polymerisiert und eine ringförmige Struktur einsetzt, die dem membrane attack complex (MAC) gleicht. Es wurden zwei verschiedene Perforine isoliert: P1, das breite Läsionen (16 nm) in Zielzellen hinterlässt, und P2, das schmale Läsionen (6 nm) in Zielzellen bricht und für NK-Zellen typisch ist. Beide Perforine kommen in den Typ I-Granula der CTLs und in NK-Zellen vor. Sowohl Granzyme als auch Perforin werden für eine Lyse der Zelle und die Induktion der Apoptose benötigt.

Granzyme werden nach Restimulation durch Antigene de novo synthetisiert. Zuerst wird eine Prä-Pro-Protease gebildet, von der die Leader-Sequenz abgespalten wird. Die Propeptide sind in der Regel Dipeptide (mit Ausnahme des Granzym M, das wahrscheinlich ein Hexapeptid als Propeptid besitzt). Bisher wurden über 11 verschiedene Granzyme identifiziert. Sie sind weitgehend homolog und weisen eine katalytische Triade, z.B. His 57 (blau) - Asp 102 (rot) - Ser 195 (grün), im aktiven Zentrum auf.

Regulation von Proteaseaktivitäten: Serpine



Serpin: eine Familie von Serin-Protease-Inhibitoren. Die Mitglieder dieser Familie zeichnen sich durch eine ähnliche, komplexe, gut konservierte Tertiärstruktur aus drei β -Faltblättern und neun α -Helices aus und sind in Eukaryonten, Pflanzen und Viren weit verbreitet, u.a. als nicht-inhibitorisches Serpin-Ovalbumin im Hühnereiweiß oder als Z-Protease-Inhibitor in der Gerste.

Im menschlichen Blutplasma sind die Serpine die wichtigsten Protease-Inhibitoren und machen etwa 10 % des Gesamteiweißes aus: Antithrombin kontrolliert die proteolytische Gerinnungskaskade, der C1-Inhibitor kontrolliert die Komplement-Aktivierung, die Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren PAI-1 and PAI-2 kontrollieren die Fibrolyse und Alpha-Antitrypsin moduliert die Rekonstruktion des Bindegewebes. Andere Serpine wie das Angiotensinogen, das Thyroxin und die Corticosteroid-Bindungsglobuline TBG und CBG haben ihre hemmende Funktion verloren, dafür aber andere Aufgaben übernommen.

Das wichtigste Strukturelement der Serpine ist eine bewegliche, reaktive Schleife. Durch diese kann das Molekül seine Konformation radikal verändern (Serpine = (**serine protease inhibitors**)), um damit an ein Protein in einem irreversiblen Komplex zu binden. Speziell die zwischen dem Serpin und dem Zielprotein liegenden Aminosäuren reagieren miteinander. Diese Bindung wird gespalten und das zentrale β -Faltblatt des Serpins durchläuft eine ausgeprägte Konformationsänderung. Die neue Sequenz (ca. 70 Å weit) wird in das zentrale β -Faltblatt eingegliedert, das damit einen neuen Strang bildet.

Metalloproteasen

- **Metalloproteasen** (auch **Metallopeptidasen** genannt) sind Enzyme, die die Peptidbindungen eines Proteins (*Eiweiß*) spalten können (Proteolyse), wobei ein Molekül Wasser verbraucht wird (Hydrolyse) und das Wassermolekül von einem oder zwei Metallkationen in Position gehalten wird. Das Metallion ist an zum Enzym gehörenden Aminosäuren-Seitenresten gebunden.

Matrix-Metalloproteinasen

Eine spezielle Art Metalloproteasen sind Matrix-Metalloproteasen.
Deren Einteilung erfolgt in :

Kollagenasen
Gelatinasen
Stromelysine

Metalloproteases are proteases where the water molecule that is used for hydrolysis is complexed to a metal ion in the catalytic center of the enzyme. For example, they are involved in extracellular matrix degradation.

The metal ion is itself hold in position by several amino acid residues.

The metalloproteases are one of seven superc
the UniProt/MEROPS classification.

