

# Quantitativer kolorimetrischer Test auf Kollagenase

Von

**Wolfgang Graßmann und Arnold Nordwig\***

Aus dem Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, München

(Der Schriftleitung zugegangen am 5. Oktober 1960)

Kollagenase ist ein proteolytisches Enzym, das aus Kulturfiltraten von *Clostridium histolyticum*<sup>1</sup> durch Ammoniumsulfat-Fällung<sup>2</sup>, Zonen-elektrophorese<sup>3, 4</sup> oder durch Adsorption an  $Al_2O_3 \cdot C\gamma^5$  angereichert werden kann. Es verdaut ausschließlich Kollagen und Gelatine und verfügt somit über eine auffallend eng gefaßte Spezifität.

Die bisher beschriebenen Methoden des quantitativen Tests benutzten Suspensionen oder Lösungen von Kollagen als Substrat. Nach einer von Gallop und Mitarbeitern<sup>3</sup> gegebenen Vorschrift („Suspensions-Test“) inkubiert man Ichthyocol (Karpfenschwimmblasen-Kollagen) in Trispuffer mit dem Enzym. Nach Filtrieren wird in einem aliquoten Anteil die gelöste Menge Protein nach der Anfärbemethode von Lowry<sup>6</sup> bestimmt. Als eine Kollagenase-Einheit (1 KE) wurde diejenige Enzymmenge definiert, die unter den Versuchsbedingungen 1 mg der eingesetzten 8 mg Ichthyocol löst. Aus kinetischen Gründen hat der Test aber nur Gültigkeit, wenn 4 mg Ichthyocol oder weniger verdaut werden.

Um in homogenem Medium arbeiten zu können, wird in einem anderen Verfahren<sup>3</sup> die Abnahme der spezifischen Viskosität einer Lösung von Ichthyocol in Calciumchlorid bei Einwirkung von Kollagenase gemessen. Bei halblogarithmischer Auftragung der Meßdaten gegen die Verdauungszeit erhält man Gerade; der Quotient aus den Steigungsfaktoren dieser Geraden und den eingesetzten Kollagenase-Einheiten ist eine Konstante. Geeicht wird nach dem Suspensionstest.

In unserem Institut wurde anfangs eine Methodik benutzt, die sich eng an die Gallopschen Vorschläge anlehnt<sup>7</sup>. Wir verwendeten 0,05*m* Phosphatpuffer vom  $pH$  7,4 und 2 ml einer Prokollagen-Suspension (Konzentration: 4 mg/ml; hergestellt im Homogenisator der Fa. Bühler, Reutlingen). Das Endvolumen des Ansatzes betrug nach Zugabe des Enzyms 2,5 ml. Nach 20 Min. Inkubation (jede Minute umrühren mit dem Glasstab) wurde filtriert und in 0,1 ml des Filtrats das in Lösung gegangene Prokollagen nach der Mikro-Kjeldahl-Methode von Cleghorn und Jendrassik<sup>8</sup> bestimmt.

\* Teil der Dissertation A. Nordwig, Universität München 1961.

<sup>1</sup> I. Mandl, J. D. Mac Lennan u. E. L. Howes, J. clin. Invest. **32**, 1317, 1323 [1953].

<sup>2</sup> R. De Bellis, I. Mandl, J. D. Mac Lennan u. E. L. Howes, Nature [London] **174**, 1191 [1954].

<sup>3</sup> P. M. Gallop, S. Seifter u. E. Meilman, J. biol. Chemistry **227**, 891 [1957].

<sup>4</sup> H. Noda, persönl. Mitteilung.

<sup>5</sup> S. Seifter, P. M. Gallop, Le Roy Klein u. E. Meilman, J. biol. Chemistry **234**, 285 [1959].

<sup>6</sup> O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr u. R. J. Randall, J. biol. Chemistry **193**, 265 [1951].

<sup>7</sup> W. Graßmann, H. Hörmann u. A. Nordwig, unveröffentlicht.

<sup>8</sup> R. A. Cleghorn u. L. Jendrassik, Biochem. Z. **274**, 189 [1934].

Die beschriebenen Bestimmungen von Kollagenase sind aber nicht nur zeitraubend und mühsam in der Durchführung. Ihnen haften auch alle Nachteile und Fehlerquellen an, die einer Untersuchungsmethode in heterogener Phase eigen sind. Auch der homogene viskosimetrische Test übernimmt die bei der Eichung mit der Suspensionsmethode erhaltenen Ungenauigkeiten.

Voraussetzung für einen Enzymtest mit synthetischen Substraten war die Kenntnis der genauen Spezifität des Enzyms. Sie wurde 1959 in drei kurz aufeinanderfolgenden Mitteilungen beschrieben<sup>9, 10</sup> und läßt sich dahingehend zusammenfassen, daß Kollagenase aus *Cl. histolyticum*

nur Sequenzen der Art  $X-\underset{1}{P}-\underset{2}{R}-\underset{3}{Gly}-\underset{4}{P}-Y$  spaltet<sup>10</sup>. Hierbei bedeuten P Prolin oder Hydroxyprolin, R eine Aminosäure, X und Y Schutzgruppen oder Aminoacylreste.

Spezifitätsbestimmend in dieser Sequenz sind die beiden Iminosäuren in 1,4-Stellung sowie der Glycylrest. Daß in synthetischen Produkten Prolin in Stellung 1 durch Hydroxyprolin ersetzbar ist, konnten wir durch Spaltung von Cbo-Hydro-

Gly-Gly-Pro-OCH<sub>3</sub> zeigen<sup>10</sup>, das gleiche bewiesen für Position 4 Noda und

Mitarbeiter<sup>11</sup> an Gly-Pro-Leu-Gly-Hydro. Dagegen fanden die japanischen Forscher synthetische Substrate, in denen Glycin in Stellung 3 durch Leucin ausgetauscht ist, als nichtspaltbar<sup>11</sup>. Noch nicht untersucht wurde, ob beide Prolylreste zu gleicher Zeit hydroxyliert sein dürfen. Die Schutzgruppe X muß in der spaltbaren Folge sicher vorhanden sein<sup>10, 11</sup>, während Substrate mit Leucin in Position 2 die Schutzgruppe Y nicht benötigen<sup>11</sup>; offenbar handelt es sich hierbei um eine Parallele zu früheren Ergebnissen an Dipeptidase, deren Affinität zu Glycin-, Alanin- und Leucinpeptiden in dieser Reihenfolge stark ansteigt<sup>12</sup>. Der Rest R der kollagenespaltbaren Sequenz schließlich läßt vorerst sowohl an synthetischen wie auch an kollagenen Substraten<sup>9, 13, 14</sup> noch wenig Spezifität erkennen.

Unter Zugrundelegung dieser, auch von der Struktur des Kollagens her gesehen, gut verständlichen Spezifitätsregel<sup>14</sup> sollte eine kolorimetrische Bestimmung der Kollagenase auf folgende Weise möglich sein: Setzt man zur Untersuchung ein Carbobenzoxy-Peptid ein, das den Spezifitätsanforderungen genügt, so ist vor und nach Kollagenase-Einwirkung das ursprüngliche Aminoende des Peptids blockiert, also nicht anfärbbar mit Ninhydrin. Die zu einem blauen Farbstoff führende Ninhydrin-Reaktion der Aminosäuren, Peptide und Proteine beruht ja auf einer Umsetzung mit den freien Aminogruppen dieser Stoffe<sup>15</sup>. Farb-

<sup>9</sup> Y. Nagai u. H. Noda, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **34**, 298 [1959]; K. Heyns u. G. Legler, *diese Z.* **315**, 288 [1959].

<sup>10</sup> W. Graßmann, H. Hörmann, A. Nordwig u. E. Wunsch, *diese Z.* **316**, 287 [1959].

<sup>11</sup> Y. Nagai, S. Sakakibara, H. Noda u. S. Akabori, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **37**, 567 [1960].

<sup>12</sup> W. Graßmann, L. Klenk u. T. Peters-Mayr, *Biochem. Z.* **280**, 307 [1935].

<sup>13</sup> S. Michaels, P. M. Gallop, S. Seifter u. E. Meilman, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **29**, 450 [1958].

<sup>14</sup> W. Graßmann, A. Nordwig u. H. Hörmann, *diese Z.*, im Druck.

<sup>15</sup> S. Ruhemann, *J. chem. Soc. [London]* **97**, 1438, 2025 [1910]; **99**, 792, 1486 [1911].

positiv ist nur die durch Spaltung in Freiheit gesetzte Aminogruppe des Glycins. Die Voraussetzung für eine quantitative Führung der Ninhydrin-Methodik ist von der Rockefeller-Gruppe um Moore und Stein<sup>16</sup> geschaffen worden.

### Ergebnisse

Als Substrat dient das Carbobenzoxy-Hexapeptid Cbo—Gly—Pro—Gly—Gly—Pro—Ala<sup>17</sup>. Es bringt neben seiner sehr guten Löslichkeit in wäßrigen Puffern noch eine andere wichtige Voraussetzung für die Problemstellung mit. Das bei der Spaltung entstehende Tripeptid Gly—Pro—Ala tendiert nicht wie Dipeptide, bzw. Dipeptidester oder -amide zur Anhydridbildung, wodurch es sich dem Nachweis mit Ninhydrin entziehen würde (vgl. l. c.<sup>10</sup>).

Auch an diesem Substrat ergaben qualitative Untersuchungen eine glatte Spaltung nach 3- und 6stündiger Inkubation mit Kollagenase in Pyridin-Acetat-Ca<sup>2+</sup>-Puffer vom  $p_H$  6,3. Das mit Ninhydrin anfärbbare Bruchstück war in den Systemen Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:5 und Phenol/Wasser 3:1 mit mitgelaufenem Gly—Pro—Ala identisch ( $R_F$  0,22 bzw. 0,83.)

Ein weiterer Vorversuch ergab, daß die Intensität der Ninhydrin-anfärbung des nach Spaltung zu erwartenden Bruchstücks Gly—Pro—Ala in Citratpuffer vom  $p_H$  5,0 und  $p_H$  6,3 (Abb. 1) eine lineare Funktion der eingesetzten Peptidkonzentration darstellt.

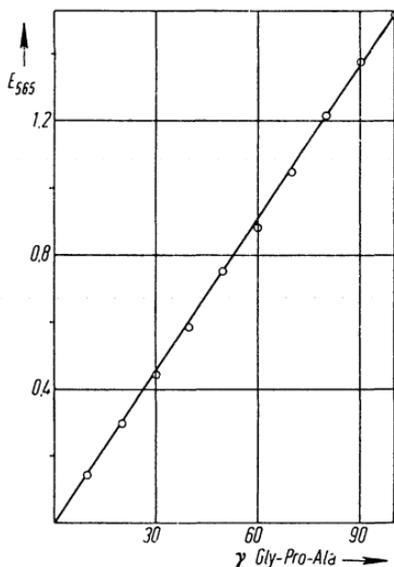


Abb. 1. Anfärbung von Gly—Pro—Ala mit Ninhydrin. Schichtdicke 1 cm. Substanz gelöst in 0,5 ml 0,1 m Citratpuffer,  $p_H$  6,3, der 0,01 m Calciumacetat enthält.

<sup>16</sup> S. Moore u. W. H. Stein, J. biol. Chemistry **176**, 367 [1948].

<sup>17</sup> E. Wünsch, diese Z., in Vorbereitung.

Bei Inkubation des Cbo-Hexapeptids mit steigenden Mengen Kollagenase in Citratpuffer vom  $p_H$  6,3 bei  $37^\circ$  erwies sich nach Abstoppen der Reaktion mit Trichloressigsäure die gemessene Extinktion ebenfalls als geradlinig abhängig von der Enzymkonzentration (Abb. 2). Die zeitliche Verfolgung der Reaktion mit unterschiedlichen Mengen Kollagenase ergab den für Enzymreaktionen typischen Kurvenverlauf; dabei werden nach 3 Stdn. bei einem Enzym/Substrat-Verhältnis von 1:44 89% des eingesetzten Substrats gespalten (Abb. 3), nach 8 Stdn. etwa 98%.

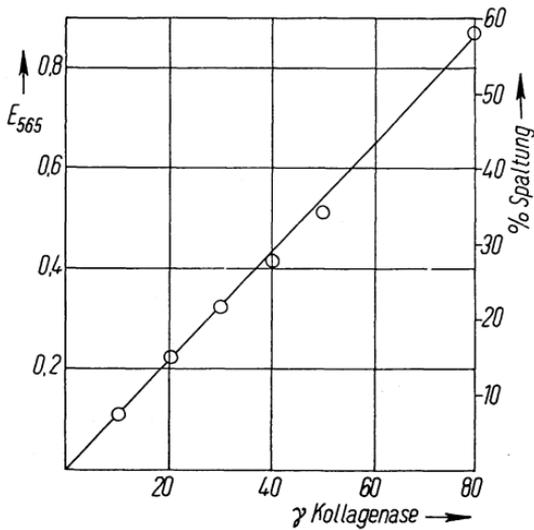


Abb. 2. Eichgerade zur Kollagenase-Bestimmung. Anfärbung des bei Spaltung von Cbo-Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Ala mit Kollagenase entstehenden Spaltstücks mit Ninhydrin.

Testbedingungen: 2,0 mg Substrat in 2,5 ml 0,08 m Citratpuffer,  $p_H$  6,3, der 0,01 m Calciumacetat enthält; Inkubation 15 Min. bei  $37^\circ$ . Anfärbt wurden 0,3 ml nach Zusatz von 0,1 ml Trichloressigsäure.

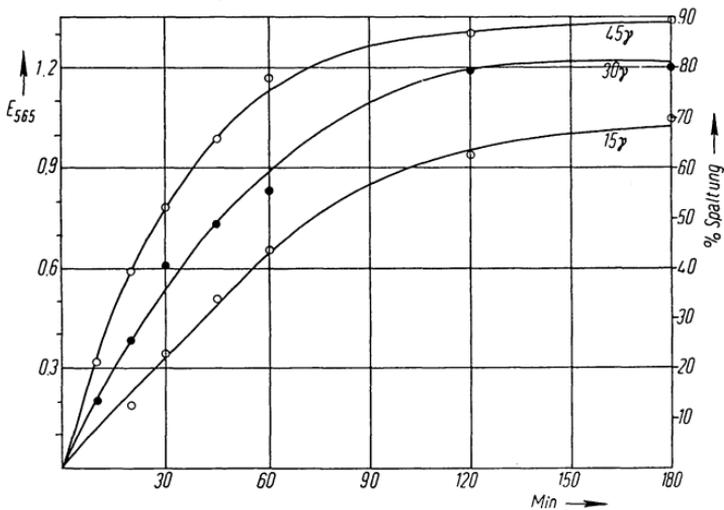


Abb. 3. Spaltung von Cbo-Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Ala mit verschiedenen Mengen Kollagenase. Bedingungen wie Abb. 2.

Gemessen wurde jeweils gegen eine unter gleichen Bedingungen mitgelaufene enzymfreie Blindprobe. Wie eine Bestimmung ergab, wird das Substrat ohne enzymatische Einwirkung nach 15 Min. nur zu 2%, nach 3 Stdn. zu etwa 5% gespalten.

Als Standardmethode für die quantitative Bestimmung der Kollagenase nach diesem Verfahren wird die Versuchsdurchführung vorgeschlagen, die im experimentellen Teil ausführlich beschrieben ist. Als Einheit wird diejenige Enzymmenge definiert, die unter den Testbedingungen eine Spaltung von 10%, entsprechend einer Extinktion von 0,150 bei 565 m $\mu$ , ergibt. Diese Menge löst 0,605 mg Prokollagen unter den auf S. 267 aufgeführten Versuchsbedingungen.

Die Durchführung der quantitativen Bestimmung ist auf das erwähnte Puffermedium beschränkt. In Citratpuffer vom p $H$  5,0 kann nicht gemessen werden, weil man zu weit vom Optimum der Enzymwirkung (p $H$  6–8 in Phosphatpuffer) entfernt ist. In anderen Puffern aber ergab die Ninhydrinanfärbung von Gly—Pro—Ala keine lineare Abhängigkeit der gemessenen Extinktion zur Konzentration des Tripeptids. Sowohl in Pyridin-Acetat-Ca<sup>20</sup>-Puffer (p $H$  6,3) als auch in Veronalpuffer (p $H$  7,4), Borsäurepuffer (p $H$  7,6) und Hydrogencarbonatpuffer (p $H$  8,8) wurde eine nach oben gekrümmte Kurve gefunden, was auch bei Glycin und Gly—Gly—Ala der Fall war. Einen gleichartigen Kurvenverlauf erhält man schon bei Zusatz von 10% der erwähnten Puffersubstanzen zum Citratpuffer. Auch Variieren der zur Anfärbung verwendeten Mengen Ninhydrin und der Entwicklungszeit des Farbstoffs brachte keine Änderung dieser Befunde. Dagegen verursacht ein Zusatz des für die Aktivierung von Kollagenase wichtigen<sup>3,18</sup> Ca-Acetats keine Abweichung vom geraden Verlauf.

Bei der Durchführung des Tests ist man also trotz der schwachen Komplexbildung des Citrats mit den Ca<sup>20</sup>-Ionen auf diesen Puffer angewiesen.

Das Verfahren ist streng spezifisch für Kollagenase. Für eine proteolytische Spaltung des Substrats kommt allenfalls noch Carboxypeptidase A in Frage. Wie aber nach Befunden an Insulin<sup>19</sup> zu erwarten war, wird von diesem Enzym Alanin als direkt vor Prolin stehende Aminosäure nicht abgespalten. Nach dreistündiger Inkubation des Cbo-Hexapeptids mit Carboxypeptidase (Verhältnis 50:1) in Phosphatpuffer vom p $H$  7,5 bei 37° konnte gegenüber einem mitgelaufenen Blindwert ohne Enzym keine Ninhydrinextinktion gemessen werden. Das gleiche Ergebnis hatte ein identischer Ansatz mit Cbo—Gly—Pro—Gly, während unter den gleichen Bedingungen Alanin aus der Sequenz Cbo—Gly—Phe—Ala rasch abgespalten wird, wie qualitative Versuche mit der geschilderten Ninhydrin-Methodik ergaben.

Herrn Dr. E. Wünsch sind wir für die Überlassung des Substrates zu Dank verpflichtet. Fräulein Christa Gaul möchten wir für ihre geschickte technische Hilfe ebenfalls herzlich danken.

## Versuchsbeschreibung

### Materialien

1. Kollagenase: Ammoniumsulfat-Fällung des Kulturfiltrats von *Cl. histolyticum* nach l. c.<sup>2</sup>. Hersteller: Sigma Chem. Comp., St. Louis, Miss., USA (deutscher Lieferant: Serva-Entwicklungslabor, Heidelberg).

<sup>18</sup> I. Mandl, H. Zipper u. L. T. Ferguson, Arch. Biochem. Biophysics **74**, 465 [1958].

<sup>19</sup> J. I. Harris u. C. H. Li, J. Amer. chem. Soc. **74**, 2944, 2945 [1952].

2. Citratpuffer: Man löst 21,02 g Citronensäure · H<sub>2</sub>O (0,1 Mol) und 1,58 g Calciumacetat (0,01 Mol) in etwa 500 ml dest. Wasser, gibt unter Rühren solange 1*n* NaOH zu (290 ml), bis ein  $p_H$  von 6,3 erreicht ist, und füllt auf 1 l auf.

3. Ninhydrinreagenz nach Moore und Stein<sup>16</sup>: 20 g Ninhydrin werden in 750 ml Methylglykol gelöst. Nach Zusatz von 0,4 g SnCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O schüttelt man gut durch, versetzt mit 250 ml 4*n* Acetatpuffer und überschichtet anschließend mit Paraffin. Während der ganzen Herstellung wird Stickstoff durch die Lösungen geleitet. Acetatpuffer: 1360 g Natriumacetat · 3 H<sub>2</sub>O in 2,25 l dest. Wasser lösen und 250 ml Eisessig zufügen.

#### Durchführung der Versuche

Man bereitet sich eine Lösung des Cbo-Hexapeptids in Citratpuffer (Konzentration: 1,0 mg/ml). Pro Testansatz werden 2 ml verwendet, die in einem kleinen Reagenzglas 5 Min. bei 37° zum Temperatenausgleich in einen Thermostaten gestellt werden. Das Enzym löst man in 0,5 ml 0,01*m* Calciumacetat und präinkubiert es vor dem Zusammengießen beider Lösungen gleichfalls 5 Min. bei 37°. Als Blindprobe dient ein gleichartiger enzymfreier Ansatz. Nach genau 15 Min. werden diesen Lösungen je 0,3 ml entnommen und in 0,1 ml 1*m* Trichloressigsäure einpipettiert. Man gibt 1 ml Ninhydrinreagenz zu, schüttelt gut durch, kocht 20 Min. am Wasserbad, läßt abkühlen und verdünnt mit Propanol/Wasser 1:1 auf 5 ml. Messen bei 565 m $\mu$  im Spektralphotometer Beckman, Modell B, gegen die enzymfreie Blindprobe als Bezugswert.

Für die Eichung löst man Gly-Pro-Ala in Citratpuffer und färbt in gleicher Weise an.

#### Zusammenfassung

Die Aktivität von Kollagenase wird nach Inkubation mit dem synthetischen Substrat Cbo—Gly—Pro—Gly—Gly—Pro—Ala in Citratpuffer durch kolorimetrische Messung des mit Ninhydrin angefärbten Spaltproduktes Gly—Pro—Ala spezifisch bestimmt.

#### Summary

The activity of collagenase is determined by incubation with the synthetic substrate Cbo—Gly—Pro—Gly—Gly—Pro—Ala in citrate buffer, followed by colorimetric measurement of the cleavage product Gly—Pro—Ala with ninhydrin.

*Prof. Dr. W. Graßmann, Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, München 15, Schillerstr. 46.*