

# Übersicht und Anwendungsempfehlungen zu Proteaseinhibitoren

## Mechanismen der Enzyminhibition

Abhängig von der Bindung des Inhibitors findet man eine reversible und eine irreversible Inhibition. Bei der **reversiblen** Enzymhemmung bindet der Inhibitor nicht fest an das Enzym und kann in Folge wieder abgespalten oder verdrängt werden. Er senkt dessen Aktivität bzw. die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion des Substrates zum Produkt und zwischen den Enzym-Inhibitor Komplexen mit bzw. ohne Substrat stellt sich ein Gleichgewicht ein. Natürliche Beispiele sind viele Stoffwechselprozesse, die je nach physiologischem Status der Zelle stärker ablaufen oder inhibiert werden.

**Kompetitive** Inhibitoren sind Substanzen, die mit dem Substrat (A) um die Bindungsstelle im aktiven Zentrum des Enzyms konkurrieren und die Michaelis-Menten-Konstante des Enzyms erhöhen. Sie haben entweder hohe Ähnlichkeit mit dem Substrat (werden aber nicht umgesetzt und können vom Substrat wieder verdrängt werden) oder stellen sogar ein zweites Substrat dar, das somit kompetitiv die Umsetzung des Substrates A inhibiert.

Bei der **nicht-kompetitiven** Hemmung bindet der Inhibitor nicht im aktiven Zentrum, sondern verändert durch seine Bindung die Tertiärstruktur des Enzyms soweit, dass kein Produkt mehr erzeugt/freigesetzt werden kann.

Die **unkompetitive** Hemmung ist ein Spezialfall, bei dem der Inhibitor nur mit dem Enzym-Substratkomplex interagieren kann und sowohl die MM-Konstante, als auch die Maximalreaktionsgeschwindigkeit verändert.

Bei der **partiell kompetitiven** Hemmung senkt die Bindung des Inhibitors die Affinität des Enzyms zum Substrat, ohne dass die Geschwindigkeitskonstanten beeinflusst werden.

Bei der **irreversiblen** Hemmung bindet der Inhibitor so fest, dass er nicht mehr vom Enzym abgespalten werden kann und die Aktivität des Enzyms für immer gemindert oder zerstört wird. Natürliche Beispiele hierfür sind Proteinsynthese hemmende Antibiotika oder "Suizid-Substrate", die kovalent an das aktive Zentrum binden.



Guter Rat ist Roth.

## Technische Info

Protease-Inhibitor	Best. Nr.	Löslichkeit	Konz. der Stocklg	Stabilität der Stocklg. <sup>(1,2,3)</sup>	Arbeitskonz.	Zielmoleküle/Applikation
AEBSF-Hydrochlorid	2931	H <sub>2</sub> O	5 - 50 mg/ml (20 - 200 mM)	bei -20 °C max. 6 Monate	0,1 - 5 mM	Serinproteasen. Irreversible Hemmung von Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin, Kallikrein, Thrombin. Durch geringe Toxizität gute Alternative zu PMSF. Alkali-labil, ein pH-Wert von 7 darf nicht überschritten werden.
Amastatin-Hydrochlorid	2932	H <sub>2</sub> O, Methanol	1 mM (511 µg/ml)	bei -20 °C max. 1 Monat	1 - 10 µM	Amino-peptidasen (AP). Langsam, aber fest bindender Inhibitor der Cytosolischen Amino-peptidase, microsomalen Amino-peptidase M und bakteriellen Leucin-Amino-peptidase. Geringere Inhibition von Amino-peptidase A.
Amino-benzamidin-Dihydrochlorid	CN71	H <sub>2</sub> O, Ethanol	100 - 200 mg/ml (0,5 - 1 M)	bei -20 °C wenige Tage	0,5 - 2 mM	Serin/Cysteinproteasen, Trypsin-ähnliche Proteasen. Kompetitive Inhibition von Trypsin, Trypsin-ähnlichen Enzymen, Thrombin, Plasmin. Oxidationssensitiv! Stocklösungen frisch ansetzen und nur kurz lagern!
Antipain-Dihydrochlorid	2933	H <sub>2</sub> O, DMSO, Ethanol	50 mg/ml (75 mM)	bei -20 °C max. 1 Monat	10 - 50 µg/ml (15 - 75 µM)	Serin/Cysteinproteasen, Trypsin-ähnliche Proteasen. Reversible Inhibition von Papain, Trypsin, Cathepsin A, B, D, Plasmin, Chymotrypsin, Pepsin, Calpain I. Ähnliche Wirkung wie Leupeptin.
Aprotinin	A162	H <sub>2</sub> O	10 mg/ml (1,54 mM)	bei +4 °C ca. 1 Monat, bei -20 °C mehrere Jahre	1 - 10 µg/ml	Serinproteasen, Esterasen. Kompetitive, reversible Inhibition von Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin, Kallikrein. pH-Optimum: 7-8. Aktivität: ≥3,0 PEU/mg (Ph. Eur. Units). 1 PEU entspricht 1950 KIU (Kallikrein inhibitorische Units). 1 PEU entspricht ca. 1,5 TIU (Trypsin-inhibitorische Units). 1 TIU entspricht ca. 1300 KIU.
Bacitracin	5655	H <sub>2</sub> O, Ethanol	100 - 1000 mg/ml (68 - 680 mM)	bei -20 °C einige Monate	0,1 - 1 mg/ml (0,07 - 0,7 mM)	Inhibitor spezieller Proteasen wie Glutathion-Insulin-Transhydrogenase, einiger Endopeptidasen. Stabil bei pH 4-5, instabil bei pH >5 bei Raumtemperatur.
Benzamidin-Hydrochlorid	CN38	H <sub>2</sub> O, Ethanol	100 - 150 mg/ml (0,65 - 1 M)	bei -20 °C wenige Tage	1 - 5 M (150 - 750 µg/ml)	Trypsin, Trypsin-ähnliche Enzyme, Serinproteasen. Starke, kompetitive, reversible Inhibition von Trypsin, Thrombin, Plasmin. Oxidationssensitiv! Stocklösungen frisch ansetzen und nur kurz lagern!
Bestatin-Hydrochlorid	2937	Methanol	1 - 15 mM (0,35 - 5 mg/ml)	bei -20 °C max. 1 Monat	10 - 100 µM	Amino-peptidasen. Kompetitive und spezifische Inhibition von Amino-peptidase B, Leucin-Amino-peptidasen, Triamino-peptidasen. Keine Inhibition von Amino-peptidase A, Trypsin, Chymotrypsin, Elastase, Papain, Pepsin, Thermolysin. Nicht antibakteriell, nicht fungizid, wenig toxisch.
Calpain Inhibitor I	2934	DMSO, Methanol	10 mg/ml (25 mM)	bei -20 °C wenige Tage	0,1 - 10 µM	Calpain (Calcium-abhängige Cysteinproteasen). Starker, kompetitiver Inhibitor von Calpain I und Calpain II (geringere Inhibition), Papain, Cathepsin B und L. Keine Inhibition von Trypsin.
E-64	2935	H <sub>2</sub> O, DMSO, Ethanol	1 mM (360 µg /ml)	bei -20 °C max. 3 Monate	1 - 20 µM	Cysteinproteasen. Irreversible, starke und hochselektive Inhibition. Keine Inhibition von Serinproteasen (Ausnahme: Trypsin). Durch die geringe Toxizität und hohe Zellpermeabilität gute Alternative zu Leupeptin oder Antipain.



Guter Rat ist Roth.

# Technische Info

Protease-Inhibitor	Best. Nr.	Löslichkeit	Konz. der Stocklg	Stabilität der Stocklg. <sup>(1,2,3)</sup>	Arbeitskonz.	Zielmoleküle/Applikation
EDTA	8043	H <sub>2</sub> O	0,5 M (186 mg/ml)	autoklaviert bei RT ca. 1 Jahr	1 - 10 mM	Metalloproteasen. Inhibition durch Chelatierung zweiwertiger Metallionen (z.B. Calcium Ca <sup>2+</sup> , Magnesium Mg <sup>2+</sup> ). Reversible Inhibition von allen Enzyme, die bivalente Ionen zur Funktion benötigen (Metalloproteasen, DNAsen etc.).
EGTA	3054	H <sub>2</sub> O	0,5 M (190 mg/ml)	autoklaviert bei RT ca. 1 Jahr	1 - 10 mM	Unspezifischer Protease-Inhibitor. Reversible Inhibition durch Chelatierung zweiwertiger Metallionen (z.B. Calcium Ca <sup>2+</sup> , Magnesium Mg <sup>2+</sup> ). Reversible Inhibition von allen Enzyme, die bivalente Ionen zur Funktion benötigen (Metalloproteasen, DNAsen etc.). pK <sub>a</sub> Calcium (pH 7): ca. 6,9
Genistein	0716	DMSO	100 mg/ml (370 mM)	bei +4 °C ca. 6 Monate, bei -20 °C ca. 1 Jahr	1 - 100 µg/ml	Tyrosin-spezifische Proteinkinasen. Kompetitive Inhibition der ATP-Bindung. Insulinrezeptor-Tyrosinkinase und Serin-/Threonin-spezifische Proteasen werden nicht inhibiert. Weiterhin Inhibition der Topoisomerasen I und II.
Leupeptin-Hemisulfat	CN33	H <sub>2</sub> O, Ethanol	1 - 10 mM (0,5 - 5 mg/ml)	bei +4°C für max 7 Tage, bei -20 °C für 6 Monate	1 - 100 µM	Serin- und Cysteinproteasen, Trypsin-ähnliche Proteasen. Kompetitive Inhibition von Calpain, Cathepsin B, Kallikrein, Papain, Plasmin und Trypsin. Die Inhibition von Thrombin wird diskutiert. Wenig oder nicht inhibierend für Pepsin, Cathepsin A und D und Chymotrypsin. Hinweis: die Arbeitslösungen sind nur wenige Stunden stabil. Leupeptin kann in Proteinquantifizierungen die Messwerte verändern.
Pefabloc <sup>®(4)</sup>	A154	H <sub>2</sub> O	5-50 mg/ml (20 - 200 mM)	bei -20 °C max. 6 Monate	0,1 - 5 mM	Serinproteasen. Irreversible Breitband-Inhibition von u.a. Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin, Kallikrein, Thrombin. Durch geringe Toxizität gute Alternative zu PMSF. Alkali-labil, ein pH-Wert von 7 darf nicht überschritten werden.
Pepstatin A	2936	DMSO, Methanol <sup>(5)</sup>	1 mM (685 µg/ml)	bei -20 °C max. 1 Monat, bei +4 °C max. 1 Woche	1 - 100 µM	Saure Proteasen, Aspartatproteasen. Starke, hochselektive Inhibition von Pepsin, Renin, Cathepsin D, Chymosin, Protease B, retrovirale Protease. Inhibiert nicht Thiolproteasen, Neutrale Proteasen und Serinproteasen.
Phosphoramidon	-	DMSO, Methanol, (H <sub>2</sub> O, Ethanol)	bis 17 mM (10 mg/ml)	bei -20 °C für max. 1 Jahr	1 - 10 µM	Thermolysin und andere bakterielle Metalloendopeptidasen. Säuger-Enkephalinase und einige Säuger-Metalloendopeptidasen. Schwache Inhibition der Kollagenase. Keine Inhibition von Trypsin, Chymotrypsin, Papain, oder Pepsin.





Guter Rat ist Roth.

## Technische Info

Protease-Inhibitor	Best. Nr.	Löslichkeit	Konz. der Stocklsg	Stabilität der Stocklsg. <sup>(1,2,3)</sup>	Arbeitskonz.	Zielmoleküle/Applikation
PMSF	6367	Ethanol, Methanol	100 mM (17,4 mg/ml) <sup>(6)</sup>	bei +4 °C für max. 6 Monate, bei -20 °C für max. 2 Jahre	0,1 - 1 mM	Serin- und Cystein-Proteasen. Irreversible Inhibition von Chymotrypsin, Trypsin und Thrombin und für die Dystin-Protease Papain. Reversible Inhibition der Cysteinproteasen. Nicht stabil in wässrigen Lösungen. Immer frisch zusetzen. Aktivität ist reduziert bei hohen Salzkonzentrationen.
Trypsin-Inhibitor	5279 und 2949	H <sub>2</sub> O	1 - 10 mg/ml	bei -20 °C ca. 3 Jahre	1 - 100 µg/ml <sup>(7)</sup>	Trypsin und Trypsin-ähnliche Proteasen. Starke Inhibition von Trypsin, schwächere Inhibition von Chymotrypsin. Schwach inhibierend für Plasmin, Kallikrein, Thrombin. pH-Optimum: 8,0.

- <sup>(1)</sup> Wir empfehlen die Lagerung in kleinen Aliquots. Mehrfaches Auftauen / Einfrieren ist in jedem Fall zu vermeiden!
- <sup>(2)</sup> Bei voller Aktivitätserhaltung. Eine längere Lagerung kann im Einzelfall möglich sein unter Inkaufnahme von Aktivitätsverlusten.
- <sup>(3)</sup> Durch Lagerung bei -80 °C kann die Haltbarkeit weiter verlängert werden. Grenzwerte sind hier nicht genau bekannt.
- <sup>(4)</sup> Eingetragenes Warenzeichen der Pentapharm AG, Basel.
- <sup>(5)</sup> Ein Zusatz von 10-50% Essigsäure kann notwendig sein, um Pepstatin A vollständig zu lösen.
- <sup>(6)</sup> Höher konzentrierte Stocklösungen wie z.B. 200 – 250 mM sollten zum Lösen für ca. 30 min auf 30 °C erwärmt werden.
- <sup>(7)</sup> Für das Abstoppen von Zellkulturtrypsinierungen: Stocklösung 1 mg/ml, Arbeitskonzentration: 0,5 mg/ml

gh 02/2020