

Sonderdruck aus
Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie
Walter de Gruyter & Co., Berlin 30

HOPPE-SEYLER'S Z. PHYSIOL. CHEM.
Bd. 351, S. 1344—1352, November 1970

Isolierung von Trypsininhibitoren und Trypsin-Plasmin-Inhibitoren aus den Samenblasen von Meerschweinchen*

HANS FRITZ**, EDWIN FINK, RENATE MEISTER und GERNOT KLEIN

Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Universität München

(Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Werle)

(Der Schriftleitung zugegangen am 28. August 1970)

Zusammenfassung: Aus Samenblasen von Meerschweinchen wurde mit wasserunlöslichem Trypsinharz ein Gemisch von Trypsin- und Trypsin-Plasmin-Inhibitoren isoliert. Durch Gradientenchromatographie an Sulfoäthyl-Sephadex gelang es, das Gemisch in folgende Hauptfraktionen aufzutrennen:

1. Einen Trypsininhibitor b mit intakter Polypeptidkette und
2. einen Trypsininhibitor a mit derselben Aminosäurezusammensetzung wie Inhibitor b (s. Tab. 1), jedoch mit einer gespaltenen Arg-X-Bindung innerhalb der Peptidkette.

Inhibitor a entsteht aus Inhibitor b sowohl bei dessen Kontakt mit dem Trypsinharz als auch bei Inkubation mit 2,3 Mol-% Trypsin. Bei Einwirkung von Carboxypeptidase B und von Maleinsäureanhydrid (letzteres in genügendem Überschuß) wird Inhibitor a inaktiviert, die Hemmwirkung von Inhibitor b bleibt dagegen erhalten. Der Argininrest bzw. die Arg-X-Bindung stellt

demnach das reaktive Zentrum des Inhibitors bei der Komplexbildung mit Trypsin dar. Die Spaltung dieser Bindung findet bevorzugt im pH-Bereich zwischen 2 und 4 statt. Beide Inhibitoren zeigen temporäres Hemmverhalten.

3. Einen Trypsin-Plasmin-Inhibitor d mit *N*-terminalem Valinrest (Aminosäurezusammensetzung s. Tab. 1) und

4. vier (e_1 und e_2 , f_1 und f_2) sich davon ableitende Trypsin-Plasmin-Inhibitoren mit um 1–5 Aminosäurereste verlängertem *N*-Terminus (s. Tab. 2).

Das Hemmverhalten der unter 3. und 4. genannten Inhibitoren ist identisch. Durch Trypsin werden die Trypsin-Plasmin-Inhibitoren sehr viel langsamer inaktiviert (temporäres Hemmverhalten) als die Trypsininhibitoren.

Alle genannten Inhibitoren bilden in stöchiometrischer Weise 1:1-Komplexe mit den betreffenden Enzymen, deren Assoziationskonstanten K_{ass} über 10^8 liegen. Die Aktivitäten von Chymotrypsin, Kallikrein aus Schweinepankreas und Throm-

* Herrn Prof. Dr. Dr. F. WERLE sind wir für großzügige Förderung sehr dankbar.

** Postanschrift: Priv.-Doz. Dr. H. FRITZ, D-8 München 15, Nußbaumstraße 20.

Enzyme:

Carboxypeptidase B, Peptidyl-L-lysin-Hydrolase (EC 3.4.2.2)

Chymotrypsin (EC 3.4.4.5)

Kallikrein (EC 3.4.4.21)

Plasmin (EC 3.4.4.14)

Thrombin (EC 3.4.4.13)

Trypsin (EC 3.4.4.4).

Abkürzungen:

IU = Inhibitoreinheit, entspricht der Verminderung der Substratspaltung (s. Legende zu Abb. 2) um $1\mu\text{Mol/min}$.

NIH = National Institute of Health

TPCK = Chlor-[*N-p*-toluolsulfonyl-phenylalanyl]methan.

Weitere Abkürzungen sind im Text erklärt.

bin (Rind) werden, gemessen mit synthetischen Substraten, durch die Inhibitoren nicht gehemmt.

Die physiologische Funktion der in den Samenblasen vorkommenden Inhibitoren wird diskutiert.

Summary: *The isolation of trypsin-inhibitors and trypsin-plasmin-inhibitors from the seminal vesicles of guinea pigs.* A mixture of trypsin- and trypsin-plasmin-inhibitors was isolated from the seminal vesicles of guinea pigs with the aid of water-insoluble trypsin resin. The mixture was separated into the following main fractions by gradient elution from sulphoethyl Sephadex:

1. A trypsin-inhibitor *b* with an intact polypeptide chain.
2. A trypsin-inhibitor *a* with the same amino acid composition as inhibitor *b* (see Table 1), but with a cleaved Arg-X-linkage within the peptide chain. Inhibitor *a* is produced from inhibitor *b* both by contact with the trypsin resin and by incubation with 2.3 mol% trypsin. Inhibitor *a* is inactivated by the action of carboxypeptidase B or by maleic anhydride (in sufficient excess), but the inhibitory action of inhibitor *b* is unaffected. Thus the arginine residue or the Arg-X bond is the active centre of the inhibitor for complex formation with trypsin. The cleavage of this bond occurs preferentially in

the pH range 2–4. Both inhibitors show temporary inhibition.

3. A trypsin-plasmin-inhibitor *d* with an *N*-terminal valine residue (see Table 1 for the amino acid composition).

4. Four (e_1 and e_2 , f_1 and f_2) trypsin-plasmin-inhibitors derived from inhibitor *d* and possessing an *N*-terminus extended by 1–5 amino acid residues (see Table 2).

The inhibitory behaviour of the inhibitors mentioned under 3. and 4. is identical. The trypsin-plasmin-inhibitors are inactivated much more slowly by trypsin (temporary inhibition) than are the trypsin inhibitors.

All the above inhibitors form stoichiometric 1:1 complexes with the appropriate enzymes, with association constants K_{ass} above 10^8 . The activities of chymotrypsin, kallikrein from pig pancreas and bovine thrombin, measured with synthetic substrates, are not affected by the inhibitors.

The physiological function of the inhibitors from the seminal vesicles is discussed.

Die Konzentration von Trypsininhibitoren in Samenblasen von Mensch, Schaf, Hamster, Schwein, Rind, Ratte, Maus und Meerschweinchen steigt in der angegebenen Reihenfolge von ca. 0,07 IU/g (beim Menschen) bis auf ca. 4,2 IU/g beim Meerschweinchen^{1–3}. Testes und Epididymis enthalten nur etwa 10% der in den Samenblasen nachweisbaren Inhibitoraktivität². Nach Untersuchungen bei Mensch, Rind und Schwein werden die wahrscheinlich in den Vesiculardrüsen synthetisierten Inhibitoren in das Sperma sezerniert^{1,2}. Von ZANEVELD und Mitarb. wurde das Vorkommen von Trypsininhibitoren im Rattensperma bestätigt⁴; den Autoren gelang auch deren Anreicherung mit Hilfe eines wasserunlöslichen Trypsinharzes⁵.

Die von uns früher aus Samenblasen von Meerschweinchen und Mäusen isolierten Inhibitoren^{2,3} stellen Gemische verschiedener Trypsin- und Trypsin-Plasmin-Inhibitoren dar. Im Rahmen dieser Arbeit beschreiben wir nun die Reindarstellung und biochemischen Eigenschaften der Proteaseinhibitoren aus Meerschweinchensamenblasen. Eine kürzere Mitteilung erfolgte bereits⁶.

Methodik und Ergebnisse

1. Aufarbeitung der Samenblasen

Nach Tötung der Tiere entnommene und bis zur Aufarbeitung tiefgefrorene Samenblasen wurden durch wiederholtes Homogenisieren der unlöslichen Gewebsbestandteile und anschließende Zentrifugation mehrmals mit dest. Wasser und 3proz. Perchlorsäure erschöpfend extrahiert. Die vereinigten wäßrigen Überstände wurden auf 3proz. Perchlorsäure-Konzentration

¹ H. HAENDLE, H. FRITZ, I. TRAUTSCHOLD u. E. WERLE, diese Z. **343**, 185 [1965].

² H. HAENDLE, Dissertat., I. Med. Fakultät d. Univ. München 1968.

³ H. FRITZ, I. TRAUTSCHOLD, H. HAENDLE u. E. WERLE, Ann. New York Acad. Sci. **146**, 400 [1968].

⁴ L. J. D. ZANEVELD, P. N. SRIVASTAVA u. W. L. WILLIAMS, J. Reprod. Fert. **20**, 337 [1969].

⁵ L. J. D. ZANEVELD, R. T. ROBERTSON, M. KESSLER,

P. N. SRIVASTAVA u. W. L. WILLIAMS, Federat. Proc. **29**, Nr. 2, Abstr. Nr. 2243 [1970].

⁶ E. FINK, in 7th int. Congr. Clin. Chem., Geneva/Evian 1969, Band 2 (Clin. Enzymology), Karger-Verlag, Basel 1970.

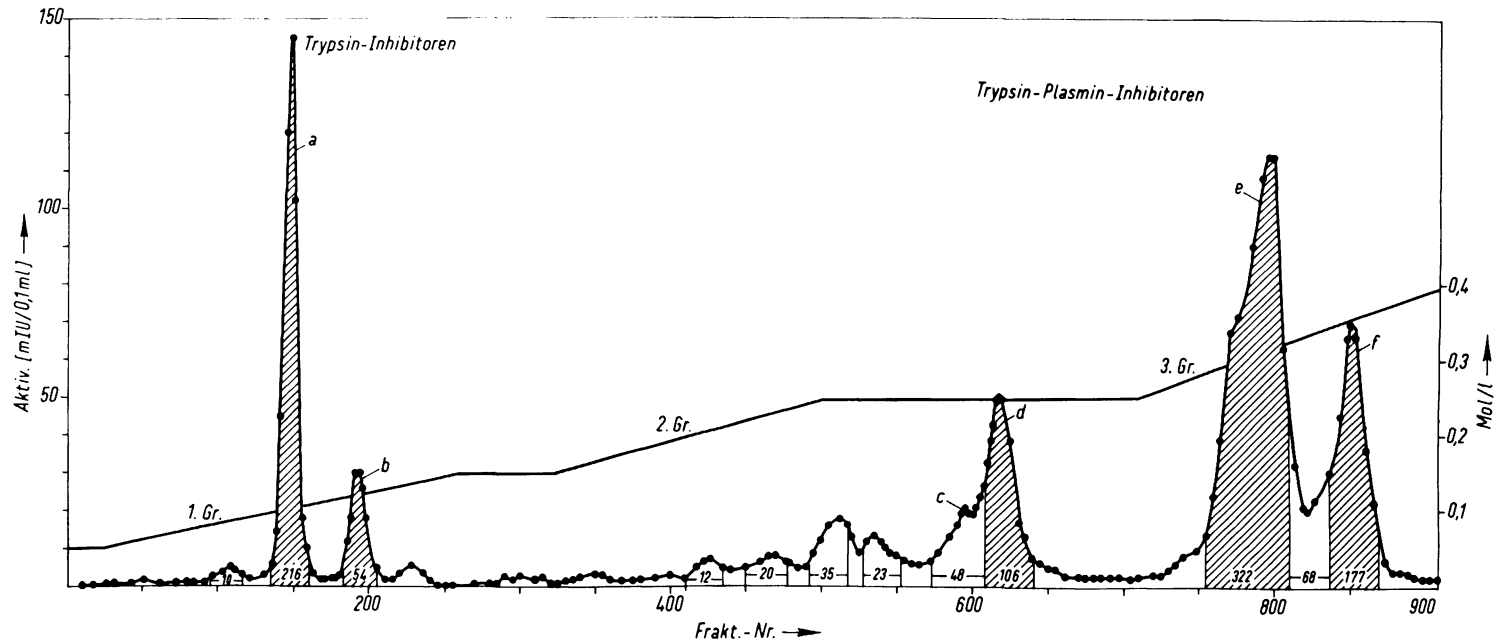


Abb. 1. Fraktionierung des Inhibitorgemisches an Sulfoäthyl-Sephadex C-25.

Linke Ordinate: Inhibitoraktivität in mIU für Trypsin je 0,1 ml. Die Ziffern in den Gipfeln bezeichnen die Gesamt-Inhibitoraktivität aller Fraktionen des jeweils angegebenen Bereiches in IU. Rechte Ordinate: Molarität des Elutionspuffers.

Bedingungen: Auf eine mit 0,05M Ammoniumacetat, pH 5,4, äquilibrierte Sulfoäthyl-Sephadex-C-25-Säule (1,8 × 120 cm) wurden 377 mg des Inhibitorpräparates (2,9 IU/mg, s. Text) aufgetragen. Die Elution erfolgte mit Ammoniumacetatpuffern, pH 5,4, der angegebenen Molarität bzw. mit linearen Gradienten aus Puffern entsprechender Molarität. Die Puffermengen betragen beim 1. Gradienten 1,5 l, beim 2. 0,8 und beim 3. Gradienten 1,0 l. Die Elutionsgeschwindigkeit lag konstant bei 10 cm/h und das Fraktionsvolumen bei ca. 10 ml.

gebracht, der entstandene Eiweißniederschlag wurde abzentrifugiert und der saure Überstand durch Kaliumcarbonat-Zugabe neutralisiert (vgl. I. c.⁷). Die inhibitorhaltige Lösung wurde vom Kaliumperchlorat dekantiert und auf eine Salz-Puffer-Konzentration von 0,15M KCl und 0,05M Triäthanolamin/HCl, pH 7,8, eingestellt.

Der wäßrige Extrakt von 700—800 g Samenblasen enthielt 2050—2800 IU für Trypsin, nach Säurebehandlung nur noch 1060—1600. Der Verlust von ca. 45% der Hemmaktivität ist auf die Säurelabilität des Trypsininhibitors (Frakt. a und b in Abb. 1) zurückzuführen: Im sauren Extrakt beträgt das Mengenverhältnis Trypsinhemmstoffe: Trypsin-Plasmin-Hemmstoffe (Frakt. c—f in Abb. 1) etwa 1:2,6, im nicht säurebehandelten neutralen Extrakt dagegen 3,5:1. Der Verlust an säurelabilem Trypsininhibitor läßt sich unter veränderten Arbeitsbedingungen vermeiden^{8,9}.

2. Anreicherung der Inhibitoren über wasserunlösliches Trypsinharz und durch anschließende Gelfiltration

Diese Isolierungsschritte wurden von uns in I. c.¹⁰ S. 134, Abschnitt 5c) bzw. 5a) bereits beschrieben. Bezogen auf den Proteingehalt (Biuret-Methode) wurde dabei eine nahezu 20fache Steigerung der spezifischen Aktivität (von 0,15 auf 2,9 IU/mg) der Inhibitorpräparate erzielt.

3. Fraktionierung des Inhibitorgemisches an Sulfoäthyl-Sephadex

Das Inhibitorgemisch (ca. 2,9 IU/mg Protein, s. o.) ließ sich durch Chromatographie an Sulfoäthyl-Sephadex C-25 in mehrere Fraktionen auftrennen, die bei der Rechromatographie unter identischen Bedingungen wieder bei derselben Salz-Puffer-Konzentration eluiert wurden. Von der auf die Säule aufgetragenen Inhibitoraktivität (ca. 1200 IU, 377 mg Festsubstanz) wurden einschließlich der Aktivität von einigen in Abb. 1 zahlenmäßig nicht angegebenen Vor- und Zwischenfraktionen 1158 IU wieder eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden durch Gelfiltration an Sephadex G-25 „fine“ bzw. Biogel P-2 mit 5proz. Essigsäure als Elutionsmittel entsalzt und anschließend lyophilisiert.

Tab. 1 enthält die Aminosäureanalysenwerte der einheitlichen Frakt. a (Trypsininhibitor) und d

⁷ s. I. c.¹³, S. 153/154, sowie I. c.¹⁰, S. 134, Abschnitt 5c).

⁸ E. FINK, Dissertat. d. Naturwiss. Fakultät d. Univ. München 1970.

⁹ E. FINK u. H. FRITZ, in Vorbereitung.

¹⁰ H. FRITZ, M. GEBHARDT, E. FINK, W. SCHRAMM u. E. WERLE, diese Z. 350, 129 [1969].

(Trypsin-Plasmin-Inhibitor) von Abb. 1. Die ebenfalls einheitliche Frakt. b besitzt dieselbe Aminosäurezusammensetzung wie Frakt. a, der Trypsininhibitor a besitzt jedoch im Gegensatz zu Inhibitor b eine Spaltstelle innerhalb der Peptidkette (s. u.). Die Fraktionen e und f stellen jeweils ein Gemisch zweier einheitlicher Inhibitoren e_1 und e_2 bzw. f_1 und f_2 dar, die gegenüber Inhibitor d am N-Terminus um den in Tab. 2 angegebenen Aminosäure- bzw. Peptidrest verlängert sind. Die ausführlichen experimentellen Daten dazu sind in I. c.^{8,9} angegeben.

Die aus den Analysenwerten berechneten Molekulargewichte für die Inhibitoren a und d (Tab. 1) stimmen recht gut mit den mit der Molekularsiebmethode¹¹ (Sephadex G-75; 0,05M Citratpuffer, pH 2,5 als Elutionsmittel) ermittelten Werten von 6600—6800 überein⁸.

4. Hemmverhalten gegenüber Enzymen

Trypsin und Plasmin: Abb. 2 zeigt die Hemmkurven des Trypsin- (Frakt. a) und des Trypsin-Plasmin-Inhibitors (Frakt. d) bei Verwendung von N^α -Benzoyl-DL-arginin-*p*-nitroanilid als Substrat. Unter denselben Bedingungen verursachen 1,2—1,9 nMol des Trypsininhibitors a keine Verminderung der Plasminaktivität. Qualitativ und quantitativ gleiche Ergebnisse erhält man mit Azokasein als Substrat (0,2 nMol Trypsin bzw. 2,3 nMol Plasmin plus entsprechende Mengen der Inhibitoren in 1,0 ml Puffer, pH 7,8, inkubiert, plus 2 ml 2proz. Azokaseinlösung, vgl. I. c.¹²). — Die Trypsinhemmkurve von Frakt. b (Abb. 1) stimmt mit der von Inhibitor a überein, die Hemmkurven von Frakt. c, e und f mit der von Inhibitor d.

Beide Inhibitoren hemmen temporär: Bei Inkubation von 32 nMol Trypsin mit 42 nMol des Trypsininhibitors a bzw. 36 nMol des Trypsin-Plasmin-Inhibitors d in 5 ml Puffer, pH 7,8, bei 37°C beträgt die Zeitspanne bis zur 50proz. Inaktivierung (Verlust von 50% der Hemmwirkung) für Inhibitor a nur 48 min, für Inhibitor d dagegen 23 h.

α -Chymotrypsin: Auch in Gegenwart der 1—2,4-fachen molaren Menge von jedem der Inhibitoren

¹¹ H. FRITZ, I. TRAUTSCHOLD u. E. WERLE, diese Z. 342, 253 [1965].

¹² H. FRITZ, I. TRAUTSCHOLD u. E. WERLE, in H.-U. BERGMAYER: Methoden d. enzymat. Analyse, S. 1021, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1970.

Tab. 1. Aminosäureanalysenwerte eines Trypsininhibitors (Frakt. a) und eines Trypsin-Plasmin-Inhibitors (Frakt. d) aus Samenblasen von Meerschweinchen (vgl. dazu Abb. 1).

Die Proben wurden 20, 70 und 120 h, sowie nach Oxidation mit Perameisensäure 20 h in 6N HCl bei 110°C hydrolysiert und mit Hilfe des Aminosäureanalysators „Unichrom“ der Fa. Beckman analysiert.

Aminosäuren	Trypsininhibitor (Fraktion a)			integr. Wert	Trypsin-Plasmin-Inhibitor (Fraktion d)			integr. Wert
	Hydrolysenzeit [h]				Hydrolysenzeit [h]			
	20	70	120		20	70	120	
O ₃ H Cys	5,90 ^a			(6)	5,92 ^a			(6)
Asp	5,96	6,01	6,01	6	6,00	6,00	6,05	6
MetO ₂	0,00 ^a			(0)	0,93 ^a			(1)
Thr	1,04	0,99	1,01	1	3,91	3,78	3,74	4
Ser	2,15	1,91	1,91	2	5,00	4,63	4,26	5
Glu	10,26	10,30	10,26	10	4,11	4,21	4,28	4
Pro	5,16	5,11	5,14	5	2,11	2,25	2,10	2
Gly	6,10	6,17	6,26	6	5,14	5,17	5,27	5
Ala	1,03	1,04	1,11	1	0,16	0,23	0,16	0
Cys	5,16	5,21 ^b	4,22 ^b	6	5,17	5,35 ^b	4,96 ^b	6
Val	1,82	2,77	2,96	3	2,63	2,96	2,99	3
Met	0,00	0,00	0,00	0		0,84		1
Ile	2,57	3,81	3,87	4	0,96	1,21	1,36	1
Leu	5,11	5,11	5,14	5	3,13	3,11	3,15	3
Tyr	1,68	1,43	1,32	2	3,66	3,52	3,42	4
Phe	0,00	0,00	0,00	0	2,67	2,86	2,92	3
Lys	0,91	0,97	1,03	1	4,13	4,08	4,04	4
His	1,19	1,25	1,25	1 ^e	2,89	2,92	2,94	3
Arg	5,96	5,98	5,94	6	3,93	3,92	3,98	4
Trp ^c	0,2			0	0,2			0
Summe				59				58
Ber. Mol.-Gew. ^d				6635				6687

^a Nach Oxidation mit Perameisensäure bestimmt. ^b Diese Hydrolysen wurden unabhängig von den 20-h-Hydrolysen durchgeführt. ^c Spektrophotometrisch bestimmt. ^d Ohne Berücksichtigung des Amidierungsgrades. ^e Bei einigen Präparationen wurden 2 His-Reste gefunden.

ist die chymotryptische Spaltungsaktivität gegenüber *N*-(3-Carboxypropionyl)-*L*-phenylalanin-*p*-nitroanilid^{12,18} und Azokasein¹² nicht vermindert.

Kallikrein und Thrombin: 1,9–2,2 nMol der Inhibitoren a und b hemmen die *N*²-Benzoyl-*L*-argininäthylester-spaltende Aktivität von 0,02 nMol Kallikrein aus Schweinepankreas nicht (Inkubationsvolumen: 1,0 ml); ebensowenig 0,2 nMol beider Inhibitoren die Spaltungsaktivität von 2 NIH-Einheiten Thrombin.

¹⁸ H. FRITZ, F. WOITINAS u. E. WERLE, diese Z. **345**, 168 [1966].

Tab. 2. *N*-terminale Peptidsequenz einiger Inhibitorfraktionen (s. Abb. 1 u. Text), bestimmt mit der Dansyl-EDMAN-Technik.

Inhibitorfraktion	<i>N</i> -Terminus
a	Glx-
b	Glx-
d	Val-
f ₁	Lys-Val-
f ₂	Ser-Lys-Val-
e ₁	Ala-Pro-Ser-Lys-Val-
e ₂	Phe-Ala-Pro-Ser-Lys-Val-

^a Experimentelle Einzelheiten s. l. c. 7. *

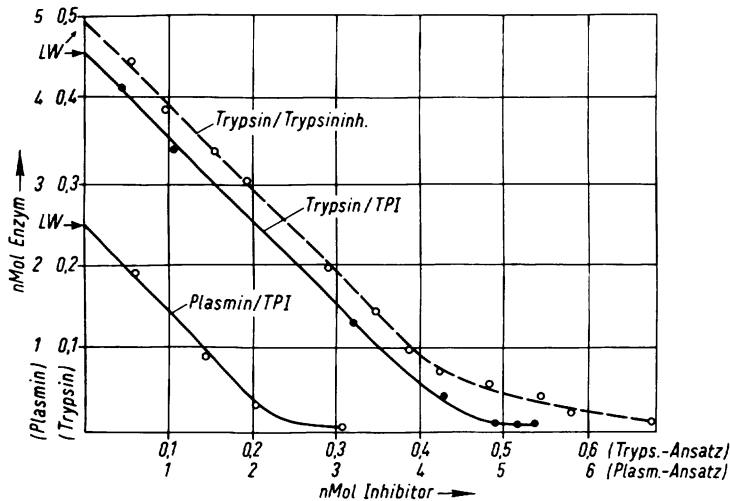


Abb. 2. Hemmkurven des Trypsin- und Trypsin-Plasmin-Inhibitoren.

Ordinate: Verbleibende Aktivität in nMol Trypsin bzw. Plasmin nach Zugabe entsprechender Inhibitormengen (s. Abszisse); Abszisse: Zum Ansatz mit Trypsin bzw. mit Plasmin zugegebene Mengen Inhibitor in nMol; Ansatzvolumen: 3 ml; LW = Leerwert; TPI = Trypsin-Plasmin-Inhibitor.

a) *Trypsin-Hemmkurven*: Als Substrat diente *N*^α-Benzoyl-DL-arginin-*p*-nitroanilid¹³; die Versuchsbedingungen entsprechen denen in l. c.^{12,14}. Die Inkubationszeit für die Komplexbildung (Trypsin plus Inhibitor plus Pufferlösung) betrug durchweg 5 min; benötigt werden weniger als 20 sec mit dem Trypsin-Plasmin-Inhibitor bzw. mindestens 1 min mit dem Trypsininhibitor. Die Normalität der für die Testansätze verwendeten Trypsinlösung wurde nach CHASE und SHAW titriert¹⁵; 10 µg des krist. Trypsins (Novo) enthielten danach 0,336 ± 0,07 nMol aktives Trypsin, die 9,6 mU bei der Substratspaltung entsprachen. Zur Berechnung der Molarität der Inhibitorlösungen wurden die in Tab. 1 angegebenen Molekulargewichte unter Berücksichtigung des Feuchtigkeits- und Salzgehaltes der eingewogenen Präparate verwendet.

b) *Plasmin-Hemmkurve*: Als Substrat diente ebenfalls *N*^α-Benzoyl-DL-arginin-*p*-nitroanilid¹²; die Versuchsbedingungen entsprechen denen in l. c.¹⁶, S. 1536. Die Inkubationszeit für die Komplexbildung betrug 5 min. Die Normalität der für die Testansätze verwendeten Plasminlösung wurde durch Hemmversuche mit einer Lösung des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors aus Rinderorganen bekannter Molarität (eingestellt gegen eine titrierte Trypsinlösung, s. o.) bestimmt¹⁷. 3 mU bei der Substratspaltung entsprechen 1,58 nMol Plasmin, d. s. ca. 0,7 Novo-Einheiten Plasmin (Novo).

5. Reaktive Zentren

Trypsininhibitor: Wird Frakt. a des Trypsininhibitors erschöpfend acyliert bzw. mit Carboxypepti-

¹³ H. FRITZ, G. HARTWICH u. E. WERLE, diese Z. **345**, 150 [1966].

¹⁴ H. FRITZ, I. HÜLLER, M. WIEDEMANN u. E. WERLE, diese Z. **348**, 405 [1967].

¹⁵ T. CHASE Jr. u. E. SHAW, Biochem. biophysic. Res. Commun. **29**, 508 [1967].

¹⁶ H. FRITZ, H. SCHULT, R. MEISTER u. E. WERLE, diese Z. **350**, 1531 [1969].

¹⁷ H. FRITZ, R. MEISTER u. M. GEBHARDT, unveröffentlicht.

dase B genügend lange inkubiert, so bleiben maximal 6,2% bzw. 5–6% der Hemmaktivität erhalten (Tab. 3). Unter denselben Bedingungen bleibt die Aktivität des durch Ionenaustauschchromatographie, also ohne (!) Trypsinharz isolierten Trypsininhibitors^{8,9}, sowie die von Frakt. b voll (104% nach Zugabe von Maleinsäureanhydrid) bzw. nahezu vollständig (94–98% nach Inkubation mit Carboxypeptidase B) erhalten (s. Tab. 3). Außerdem nimmt bei Inkubation von Frakt. a mit Carboxypeptidase B die Hemmaktivität des Ansatzes parallel zur Freisetzung von *Arginin* ab; beim Endwert (5–6% Restaktivität, Tab. 3) erreicht die aus 1 µMol Inhibitor freigesetzte Argi-

Tab. 3. Reaktives Zentrum des Trypsininhibitors. TI*: modifizierter Trypsininhibitor (Frakt. a in Abb. 1 mit gespaltener Arg-X-Bindung. TI: nativer Trypsininhibitor (Frakt. b in Abb. 1) mit intakter Arg-X-Bindung.

Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid (MA): Die Inhibitorlösung (1,0 ml/0,5M NaHCO₃, Aktivität s. Tab.) wurde mit den angegebenen Mengen Maleinsäureanhydrid versetzt und 10 min unter Eiskühlung lebhaft geschüttelt. Danach wurden aliquote Teile zur Aktivitätsbestimmung entnommen. In zwei Fällen wurden die Ansätze mit weiteren 10 mg Maleinsäureanhydrid versetzt, erneut wie vorher geschüttelt und gemessen. Ein Absinken des pH-Wertes unter 8 wurde durch Zuzufügen kleiner Mengen krist. Natriumhydrogencarbonat verhindert. Weitere methodische Einzelheiten wie in l. c.¹⁹.

Inkubation mit Carboxypeptidase B: Die Inhibitorlösung (0,4 ml Triäthanolaminpuffer, pH 8,0, Aktivität s. Tab.) wurde mit 22,8 µg Carboxypeptidase B (DFP-behandelt, von Sigma Chemical Comp., USA) in 0,03 ml Puffer versetzt und der Ansatz 16 h bei 25°C inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten während der Inkubation und danach wurden in aliquoten Teilen des Ansatzes die Inhibitoraktivität und parallel dazu die freigesetzten basischen Aminosäuren (Aminosäureanalysator Unichrom der Fa. Beckman mit Mikroküvette) bestimmt. Vgl. Text.

Inhibitor	Inhib.-Menge im Ansatz [mIU]	zugegebene Menge MA [mg]	verbleibende Hemmaktivitäten in [%]
<i>Bei der Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid</i>			
TI*	2450	10	32 ^a
	1205	15	15,0
		+10	6,9
	724	20	9,0
		+10	6,2
TI	752	20	104
<i>Bei Inkubation mit Carboxypeptidase B</i>			
TI*	1206		5,0
	422		6,0
TI	541		98
	541		94,1

^a Entspricht dem Wert in l. c.¹⁹, S. 937 und 939, Tab. 2 und 4 vom Inhibitor aus Meerschweinchensamenblasen I.

ninmenge 0,9 µMol gegenüber nur 0,19 µMol freigesetzten Lysins.

Diese Befunde sind nur durch die Annahme erklärbar, daß Inhibitor a in modifizierter Form (mit einer gespaltenen Arg-X-Bindung innerhalb der Peptidkette) vorliegt, Inhibitor b und der durch Ionenaustauschchromatographie isolierte Inhibitor dagegen in der nativen Form (mit intakter Arg-X-Bindung). Offensichtlich erfolgt die Modifizierung im Kontakt mit dem wasserunlöslichen Trypsinharz.

Der native Trypsininhibitor wird auch in Gegenwart katalytischer Mengen Trypsin modifiziert. Nach 25stdg. Inkubation mit 2,3 Mol-% Trypsin liegt der Anteil der modifizierten Form im pH-Bereich 2,5–4 bereits bei 60% (Abb. 3).

Trypsin-Plasmin-Inhibitor: Der nahezu vollständige Verlust der Hemmwirkung gegenüber beiden Enzymen bei der Acylierung spricht dafür, daß im reaktiven Zentrum dieses Inhibitors ein Lysinrest

vorhanden ist¹⁹. Der Komplex des Inhibitors mit Plasmin besitzt keine Hemmaktivität mehr gegen Trypsin.

Diskussion

Zur physiologischen Funktion

Das Akrosom des Spermiums enthält eine lysosomale Enzymausstattung^{20,21}. Mindestens zwei dieser Enzyme sind beim Eindringen des Spermiums in das Ei, also beim Befruchtungsprozeß maßgebend beteiligt, nämlich das „*Corona penetrating enzyme*“ (CPE) und eine Protease mit trypsin-

¹⁹ H. FRITZ, E. FINK, M. GEBHARDT, K. HOCHSTRASSER u. E. WERLE, diese Z. **350**, 933 [1969].

²⁰ z. B. H. M. DOTT, in J. T. DINGLE u. H. B. FELL: *Lysosomes in Biology and Pathology*, Band 1, S. 330, North-Holland Publ. Comp., Amsterdam 1969.

²¹ s. l. c.²³ Tab. 1, S. 426.

ähnlicher Spezifität (TLE: „*Trypsin-like enzyme*“) ^{4,22-24}. Mit Hilfe des CPE durchdringt das Spermium die Corona radiata, mit Hilfe des TLE die Zona pellucida des Ovars. Für beide Enzyme sind in der Samenflüssigkeit (Spermaplasma) Hemmstoffe vorhanden, der „*Decapacitation faktor*“ (DF) für CPE^{22,25} und, nach den Ergebnissen dieser Arbeit zu schließen, Trypsin- und/oder Trypsin-Plasmin-Inhibitoren für die trypsinähnliche Protease TLE.

Die Hemmstoffe bleiben beim raschen Vordringen der Spermien im weiblichen Genitaltrakt zurück, wodurch die Spermien erst ihre Befruchtungsfähigkeit erlangen^{4,25}, ein Vorgang, der als „*Capacitation*“ bezeichnet wird. In Gegenwart beider (DF und Trypsin-Inhibitoren) oder von einem der beiden Hemmstoffe bzw. Hemmstoffgruppen findet keine Befruchtung statt (in vitro) bzw. ist die Befruchtungsfähigkeit in vivo signifikant vermindert^{4,5,22-25}; die freigesetzten evtl. noch membrangebundenen²³ Enzyme werden offensichtlich durch die Hemmstoffe sofort blockiert. Nach der Capacitation besitzen die Spermien nicht nur die Fähigkeit in das Ovar einzudringen, sie können dann auch von Leukozyten im Uterus phagozytiert werden und Zell- und Gewebsschichten des Uterus durchdringen^{25,26}. Dies bis zu einem gewissen Zeitpunkt nach der Ejakulation zu unterbinden, könnte eine wichtige Funktion des DF und der Trypsin-Inhibitoren sein.

Zur Biochemie

Durch die Verwendung wasserunlöslicher Trypsinharze gestaltet sich zwar die Isolierung der Protease-Inhibitoren relativ einfach, man erhält jedoch durch enzymatische Spaltungen während des Enzymharzschrittes zusätzliche Inhibitorerivate: Beim überwiegenden Teil des Trypsininhibitors wurde eine Arg-X-Bindung, die das reaktive Zentrum bei der Komplexbildung mit Trypsin darstellen dürfte (s. u.), gespalten. Der Trypsininhibitor aus Schweinepankreas wird unter ähnlichen

Bedingungen nur zu einem sehr viel geringeren Prozentsatz modifiziert²⁷. Beim Trypsin-Plasmin-Inhibitor wird die Vielfalt der isolierten Formen (Tab. 2) sowohl auf die Wirkung des Trypsinharzes (Spaltung der Lys-Val-Bindung) als auch auf die von Aminopeptidasen während der Herstellung des Ausgangsextraktes zurückzuführen sein. Inwieweit einzelne Inhibitorformen genetisch bedingt sind (vgl. dazu l. c.^{28,29}), versuchen wir z. Z. zu klären.

Die Assoziationskonstanten der Enzym-Inhibitor-Komplexe liegen zwar in derselben Größenordnung (berechnet nach GREEN³⁰ aus Abb. 2), für den Komplex mit dem Trypsininhibitor bei 5×10^8 und für die Komplexe des Trypsin-Plasmin-Inhibitors mit Trypsin bei $3,5 \times 10^9$ und mit Plasmin bei 3×10^8 ; trotzdem wird der Trypsininhibitor durch Trypsin vergleichsweise sehr viel rascher abgebaut (temporäre Hemmung!) als der Trypsin-Plasmin-Inhibitor. Voraussetzung dafür ist wahrscheinlich die relativ rasch erfolgende Modifizierung, d. h. Spaltung einer Arg-X-Bindung im Trypsininhibitor. Dies und die glatt verlaufende Abspaltung des durch die Modifizierung entstandenen C-terminalen Argininrestes durch Carboxypeptidase B machen den Inhibitor, sobald seine Primärstruktur geklärt ist, zu einem idealen Modell für eingehende Untersuchungen über die der Komplexbildung und der temporären Hemmung zugrunde liegenden Reaktionsmechanismen. Gegenüber den beim Inhibitor aus Sojabohnen³¹ und den Inhibitoren aus Rinder-³² und Schweinepankreas²⁷ erhaltenen Befunden fällt vor allem das relativ breite Modifizierungsmaximum (Abb. 3) des Trypsininhibitors auf. Versuche zur Bestimmung des Mengenverhältnisses nativer zu modifizierter Inhibitor im Gleichgewichtszustand, d. h. bei genügend langer Inku-

²⁷ H. TSCHESCHE u. H. KLEIN, diese Z. **349**, 1645 [1968]; s. a. H. TSCHESCHE, E. WACHTER u. G. KALLUP, diese Z. **350**, 1662 [1969].

²⁸ L. J. GREENE, J. J. DICARLO, A. J. SUSSMAN, D. C. BARTELT u. D. E. ROARK, J. biol. Chemistry **243**, 1804 [1968].

²⁹ H. TSCHESCHE, E. WACHTER, S. KUPFER u. K. NIEDERMEIER, diese Z. **350**, 1247 [1969].

³⁰ N. M. GREEN u. E. WORK, Biochem. J. **54**, 347 [1953].

³¹ C. W. NIEKAMP, H. F. HIXSON Jr. u. M. LASKOWSKI Jr., Biochemistry [Washington] **8**, 16 [1969]; s. dort weitere Lit.

³² M. RIGBI u. L. J. GREENE, J. biol. Chemistry **243**, 5457 [1968].

²² L. J. D. ZANEVELD u. W. L. WILLIAMS, Biology of Reprod. **2** [1970]; siehe dort weitere Literatur.

²³ R. STAMBAUGH u. J. BUCKLEY, J. Reprod. Fert. **19**, 423 [1969]; Science [Washington] **161**, 585 [1968].

²⁴ H. HAENDLE, H. INGRISCH u. E. WERLE, Klin. Wschr. **48**, 824 [1970].

²⁵ M. C. PINSKER u. W. L. WILLIAMS, Arch. Biochem. Biophysics **122**, 111 [1967].

²⁶ B. L. REID, Austral. J. Zool. **13**, 525 [1965].

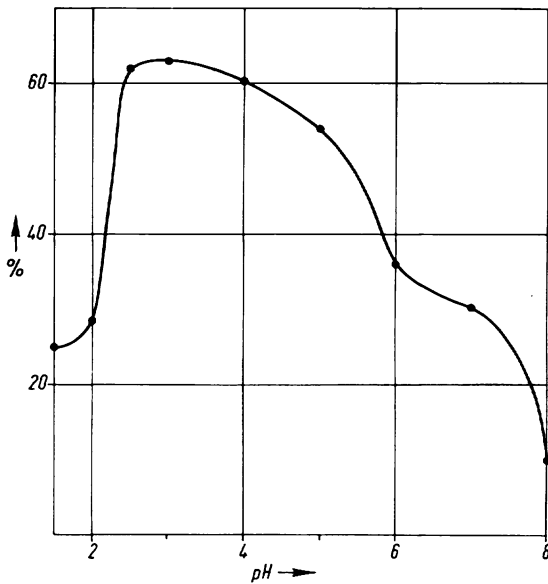


Abb. 3. Modifizierung des nativen Trypsininhibitors mit 2,3 Mol-% Trypsin.

Ordinate: Prozentualer Anteil des modifizierten Inhibitors nach Inkubation mit Carboxypeptidase B. Abszisse: pH-Wert der Inkubationslösung.

Versuchsdurchführung:

a) *Modifizierung*: 0,05 ml der Inhibitorlösung, enthaltend 1,5 IU bzw. 53 nMol des nativen Trypsininhibitors in 0,1M NaCl, wurden versetzt mit 0,037 ml Trypsinlösung, enthaltend 37 µg bzw. 1,15 nMol TPCK-behandeltes Trypsin der Fa. Merck und 0,213 ml 0,04M CaCl₂/0,02M Pufferlösung des entsprechenden pH-Wertes (pH 1,5–2,0:0,02M KCl/HCl; pH 5,0 und 6,0:0,02M Natriumacetat; pH 7,0 und 8,0:0,02M Tris-HCl). Nach der Bestimmung der Inhibitoraktivität wurden die Ansätze 23,5 h bei 25°C inkubiert. Die Inhibitoraktivität war nach der Inkubation in allen Ansätzen unverändert.

b) *Inkubation mit Carboxypeptidase B*: Die Modifizierungsansätze wurden nun mit je 0,3 ml 0,2M Tris-HCl, pH 8,0, und 22,8 µg DFP-behandelter Carboxypeptidase B in 0,03 ml Lösung (vgl. Tab. 3) versetzt und die Mischung nochmals 18 h bei 25°C inkubiert. Danach wurde ihre Hemmaktivität gegenüber Trypsin bestimmt. Aus dem Verlust an Hemmaktivität (in mIU) im Ansatz wurde der prozentuale Anteil des modifizierten Inhibitors berechnet (vgl. Tab. 3).

bation mit katalytischen Trypsinmengen sowie zur Resynthese der gespaltenen Arg-X-Bindung (im modifizierten Inhibitor) entsprechend den von LASKOWSKI jr. u. Mitarb.^{31,33} entwickelten Vor-

³³ M. LASKOWSKI jr. u. R. W. SEALOCK in *The Enzymes* II, [1971] im Druck; M. LASKOWSKI Jr. in M. OTTESEN, *Proc. of the Int. Symp. on Structure — Funktion Relationships of Proteolytic Enzymes*, im Druck. Munksgaard, Copenhagen 1970.

stellungen über den Reaktionsmechanismus der Komplexbildung sind im Gange.

Unser Dank gilt dem SONDERFORSCHUNGSBEREICH 51, München, für Sach- und Personalmittel, Fräulein FRIEDERIKE BÜRGER, Marburg, für die Sammlung der Samenblasen und den Behringwerken, Marburg, für das zur Verfügung gestellte Tiermaterial und für Personalmittel.