

KURZMITTEILUNG

**Charakterisierung einer Trypsin-ähnlichen Proteinase (Akrosin) aus Eberspermien durch ihre Hemmbarkeit mit verschiedenen Protein-Proteinase-Inhibitoren, I**

**Seminale Trypsin-Inhibitoren und Trypsin-Kallikrein-Inhibitor aus Rinderorganen**

Hans Fritz\*, Bruni Förg-Brey, Edwin Fink, Hans Schießler, Eugen Jaumann und Marianne Arnholt

(Der Schriftleitung zugegangen am 31. Mai 1972)

*Characterization of a trypsin-like proteinase (acrosin) from boar spermatozoa by inhibition with different protein proteinase inhibitors, I: Seminal trypsin inhibitors and the trypsin-kallikrein inhibitor from bovine organs*

**Summary:** The trypsin inhibitor II from human sperm plasma and the trypsin-plasmin inhibitor from boar sperm plasma are strong inhibitors for boar acrosin, too. The affinity of the trypsin inhibitor and the trypsin-plasmin inhibitor from guinea pig seminal vesicles to boar acrosin is somewhat lower. In contrast, dissocia-

tion of the complex of the trypsin-chymotrypsin inhibitor I from human sperm plasma with boar acrosin is considerably higher. The affinity of the bovine trypsin-kallikrein inhibitor to boar acrosin is extremely low. Cf. Figures 1 and 2.

Das Akrosom des Spermiums enthält eine Proteinase mit Trypsin-ähnlicher Spezifität<sup>[1-3]</sup>, genannt Akrosin<sup>[2]</sup>, mit deren Hilfe das Spermium die Zona pellucida des Ovum zu durchdringen vermag<sup>[1-6]</sup>. Die im Spermaplasma vorkommenden Trypsininhibitoren<sup>[7-11]</sup>

stammen überwiegend aus dem Sekret der Vesicular-drüsen<sup>[7]</sup>. Nach den im wesentlichen von Zaneveld und Mitarb.<sup>[2,3,12-14]</sup> entwickelten Vorstellungen wird bei der Ejakulation das Akrosin im Spermienakrosom durch die Trypsininhibitoren aus dem Sekret der Samenblasen „maskiert“, d. h. durch Komplexbildung inhibiert. Bei der Wanderung der Spermien durch den weiblichen Genitaltrakt werden die Inhibitoren wieder abgetrennt, so daß die vorher nicht zur Befruchtung befähigten Spermien wieder ihre Befruchtungsfähigkeit erlangen. Aufgrund der Bedeutung der Trypsin-Akrosin-Inhibitoren aus Samenblasen und Spermaplasma für die Physiologie des Befruchtungsvorganges als auch für eine evtl. antienzymatische Kontrazeption haben wir deshalb die Hemmwirkung verschiedener Protein-Proteinase-Inhibitoren auf Akrosin näher untersucht.

\* *Adresse:* PD Dr. H. Fritz, Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Universität München, D-8 München 2, Nußbaumstr. 20.

<sup>1</sup> Stambaugh, R. & Buckley, J. (1969) *J. Reprod. Fert.* **19**, 423–432; Stambaugh, R. & Buckley, J. (1970) *Biol. Reprod.* **3**, 275–282.

<sup>2</sup> Zaneveld, L. J. D., Polakoski, K. L., Robertson, R. T. & Williams, W. L. (1971) in Proc. Int. Res. Conf. on Proteinase Inhibitors (Fritz, H. & Tschesche, H., Hrsg.), S. 236–244, W. de Gruyter, Berlin.

<sup>3</sup> Übersichts-literatur s. Fritz, H., Fink, E. & Marx, R. (1971) in Sexualhormone und Blutgerinnung (Marx, R. & Thies, H. A., Hrsg.), S. 33–49, Schattauer Verlag, Stuttgart.

<sup>4</sup> Zaneveld, L. J. D., Robertson, R. T., Kessler, M. & Williams, W. L. (1971) *J. Reprod. Fert.* **25**, 387–392.

<sup>5</sup> Stambaugh, R., Brackett, B. G. & Mastroianni, L. (1969) *Biol. Reprod.* **1**, 223–227.

<sup>6</sup> Gould, K. G., Srivastava, P. N., Cline, E. M. & Williams, W. L. (1971) *Contraception* **3**, 261–267.

<sup>7</sup> Haendle, H., Fritz, H., Trautschold, I. & Werle, E. (1965) *diese Z.* **343**, 185–188.

<sup>8</sup> Fritz, H., Fink, E., Meister, R. & Klein, G. (1970) *diese Z.* **351**, 1344–1352.

<sup>9</sup> Fink, E., Klein, G., Hammer, F., Müller-Bardorff, G. & Fritz, H. (1971) in Proc. Int. Res. Conf. on Proteinase

Inhibitoren (Fritz, H. & Tschesche, H., Hrsg.) S. 225–235, W. de Gruyter, Berlin.

<sup>10</sup> Fink, E., Jaumann, E., Fritz, H., Ingrisch, H. & Werle, E. (1971) *diese Z.* **352**, 1591–1594.

<sup>11</sup> Partiiell gereinigte Seminalinhibitoren sind auch in l. c.<sup>[2,4]</sup> beschrieben.

<sup>12</sup> Zaneveld, L. J. D., Srivastava, P. N. & Williams, W. L. (1970) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **133**, 1172–1174.

<sup>13</sup> Zaneveld, L. J. D., Polakoski, K. L. & Williams, W. L. (1972) *Biol. Reprod.*, im Druck.

<sup>14</sup> Polakoski, K. L., Zaneveld, L. J. D. & Williams, W. L. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, im Druck.

### Material und Methodik

**Verwendete Substanzen:** Trypsin-Plasmin-Inhibitor aus Ebersperma<sup>[9]</sup>, 2,0 IU/mg; Trypsininhibitor II aus Humansperma<sup>[10]</sup>, 2,17 IU/mg; Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor I aus Humansperma<sup>[10]</sup>, 1,73 IU/mg; Trypsin-inhibitor aus Meerschweinchensamenblasen<sup>[8,9]</sup>, Fraktion b, 3,1 IU/mg; Trypsin-Plasmin-Inhibitor aus Meerschweinchensamenblasen<sup>[8,9]</sup>, Fraktion e, 3,6 IU/mg; Trypsin-Kallikrein-Inhibitor aus Rinderorganen, 2,9 IU/mg von Farbenfabriken Bayer, Wuppertal-Elberfeld; Akrosin aus Ebersperma, isoliert nach Fink und Mitarb. (in Vorbereitung), 5 U (Substrat: BAPA) per mg Protein.

**Meßmethodik:** Die genannten Inhibitoren sind durch ihre Trypsin-Hemmaktivität charakterisiert, die mit Hilfe des Substrates *N*-Benzoyl-DL-arginin-*p*-nitroanilid (BAPA) bestimmt wurde<sup>[15]</sup>. Die Titration des Akrosins mit den in der Abbildung angegebenen Inhibitoren wurde ebenfalls mit derselben, von uns für die Messung der Trypsinhemmung verwendeten Methodik durchgeführt: Konstante Akrosinmengen (ca. 10 pMol, 9–12 mU) wurden mit steigenden Inhibitormengen bei 25°C in 2,0 ml/0,2M Triäthanolamin-HCl, pH 7,8, die zur Erreichung des Hemmgleichgewichts benötigte Zeitspanne (s. Abb.) in silikonisierten Glasküvetten inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde danach durch Zugabe der Substratlösung (1 mg BAPA in 1,0 ml/dest. Wasser) gestartet. Die Akrosinlösungen wurden nur in Plastikgefäßen aufbewahrt, alle Verdünnungen wurden mit Plastikpipetten (Eppendorf-System) hergestellt.

### Ergebnisse und Diskussion

In Abb. 1 sind die Hemmkurven dargestellt, die bei Titration des Eber-Akrosins mit Seminalinhibitoren erhalten wurden. Der Trypsininhibitor II aus Humanspermaplasma und der Trypsin-Plasmin-Inhibitor aus Eberspermaplasma sind danach sehr starke Akrosin-hemmstoffe. Die beiden Inhibitoren dürften deshalb aus physiologischer Sicht die für die Hemmung der Akrosinaktivität zuständigen Inhibitoren sein (vgl. dazu I. c.<sup>[2,3,13,14]</sup>).

Die Dissoziation der Akrosin-Inhibitor-Komplexe ist aus dem Kurvenverlauf (Abweichung vom idealen, geraden Verlauf bei größeren Inhibitormengen) bereits deutlich ersichtlich. Dies ist darauf zurückzuführen, daß die Messung infolge der hohen spezifischen Aktivität des Akrosins gegenüber BAPA bei sehr niedriger Konzentration der Reaktionspartner erfolgt (die Akrosinkonzentration im Meßansatz liegt bei  $3 \times 10^{-9}$ M; bei Trypsinaktivitätsmessungen im Vergleich dazu bei

<sup>15</sup> Fritz, H., Trautschold, I. & Werle, E. (1970) in Methoden d. Enzymat. Analyse (Bergmeyer, H. U., Hrsg.) S. 1021–1038, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr.

$1 \times 10^{-7}$ M!), so daß sich die Dissoziation auch bei niedrigen  $K_i$ -Werten der Komplexe bereits stark bemerkbar macht.

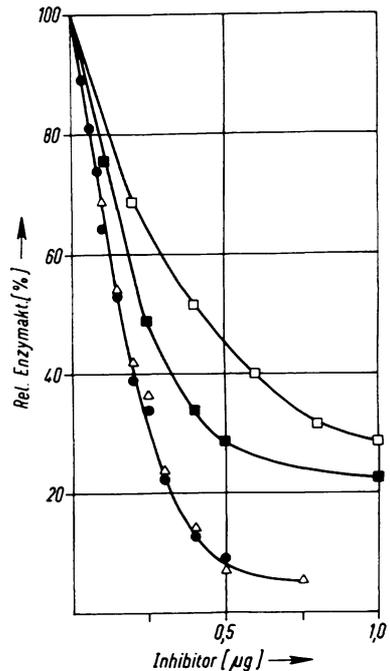


Abb. 1. Titration von Eber-Akrosin mit Seminalinhibitoren.

Symbol	Inhibitor aus	Inkubationszeit* [min]
△—△	Humanspermaplasma, II (Trypsin-Chymotrypsin-Inh.)	30
●—●	Eberspermaplasma (Trypsin-Plasmin-Inh.)	30
■—■	Meerschweinchensamenblasen (Trypsininhibitor b)	30
□—□	Meerschweinchensamenblasen (Trypsin-Plasmin-Inh. e)	15

\* Inkubationszeit (Akrosin plus Inhibitor) vor Zugabe des Substrates. Meßbedingungen s. Material und Methodik.

Die Proteinase-Inhibitoren aus Meerschweinchensamenblasen hemmen das Akrosin ebenfalls noch relativ stark (Abb. 1). Die etwas schwächere Hemmwirkung gegenüber den zuerst genannten Inhibitoren ist evtl. nur auf speziesbedingte Strukturunterschiede zurückzuführen.

Im Gegensatz zum Trypsininhibitor II aus Humanspermaplasma ist die Hemmwirkung des Trypsin-

Chymotrypsin-Inhibitoren I desselben Ursprungs auf Eber-Akrosin um ein Vielfaches geringer\* (Abb. 2). Dies ist ein Hinweis dafür, daß Inhibitor I eine andere Aufgabe hat als die Hemmung des Akrosins. Evtl. ist seine physiologische Funktion in der Hemmung der Chymotrypsin-ähnlichen Proteinase<sup>[16,17]</sup> zu suchen, die neuerdings aus Humansperma isoliert wurde<sup>[18]</sup>. Diese Frage wird von uns z. Z. noch geprüft.

Auffallend ist die nur sehr geringe Hemmwirkung des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors aus Rinderorganen auf Eber-Akrosin. Hier wird bereits bei Zugabe des Substrates zum Inkubationsansatz der gebildete Komplex wieder meßbar dissoziiert, was in keinem der anderen untersuchten Fälle beobachtet wurde.

Die unterschiedliche Hemmbarkeit des Akrosins durch die Seminalinhibitoren ermöglicht es, Rückschlüsse auf die physiologische Funktion dieser Hemmstoffe zu ziehen und so die beim Befruchtungsvorgang sich abspielenden biochemischen Vorgänge besser zu verstehen. Dies ist unseres Erachtens Voraussetzung für eine gezielte antienzymatische Kontrazeption, die evtl. später auf Inhibitorbasis möglich sein wird.

\* Sollte Inhibitor I Akrosin *nicht* inhibieren, so würde das verwendete Präparat noch 1,4 Gew.-% des Trypsininhibitors II enthalten (berechnet aus den Titrationskurven).

<sup>16</sup> Lundquist, F., Thorsteinsson, Th. & Buus, O. (1955) *Biochem. J.* **59**, 69–79.

<sup>17</sup> Waldschmidt, M., Karg, H. & Hoffmann, B. (1964) *Naturwissenschaften* **51**, 18.

<sup>18</sup> Syner, F. N. & Moghissi, K. S. (1972) *Biochem. J.* **126**, 1135–1140.

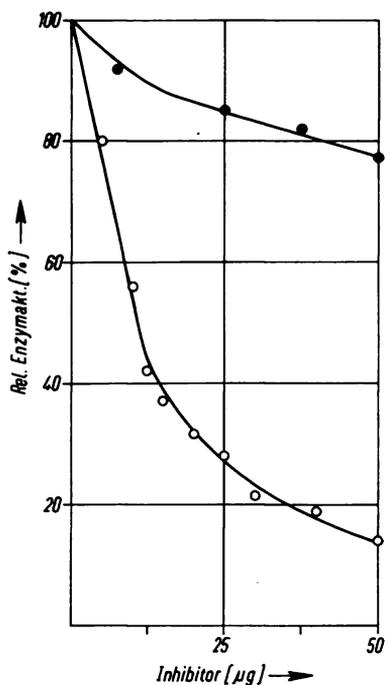


Abb. 2. Titration von Eber-Akrosin mit dem Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor I aus Humanspermaplasma (○—○) und dem Trypsin-Kallikrein-Inhibitor aus Rinderorganen (●—●).

Inkubationszeit (vgl. Anmerkung zur Abb. 1): 15 min; bei 30 bzw. 60 min keine Änderung.

Mit Mitteln des *Sonderforschungsbereiches 51*, München, finanziert. Herrn Prof. Dr. Dr. E. Werle danken wir für die großzügige Unterstützung und Förderung dieser Arbeit.