

Isolierung eines Trypsininhibitors und zweier Trypsin-Plasmin-Inhibitoren aus den Samenblasen von Meerschweinchen

E. FINK

Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Universität München, München

Vor vier Jahren fanden HAENDLE *et al.* [1] in den Samenblasen von Meerschweinchen Hemmaktivität gegenüber Trypsin. Wässrige Extrakte aus Meerschweinchen-Samenblasen enthalten je Gramm Organ eine Inhibitoraktivität gegen Trypsin von 2 000–5 000 ImU¹. Beim Enteiweißen mit Perchlorsäure tritt ein Verlust von 15–20% auf.

Aus dem enteweißten Extrakt wird der Inhibitor durch selektive Bindung an Trypsinharz abgetrennt. Das so gewonnene Präparat ist zu 60% rein. Abschließend wird über Sulfoäthyl-Sephadex chromatographiert, wobei eine Auftrennung in zwei Inhibitoren möglich ist. Der erste Inhibitor, M I, ist spezifisch für Trypsin, der zweite, M II, inhibiert Trypsin und Plasmin. M II tritt in zwei Komponenten (M IIa und M IIb) auf, die sich in ihrer Aminosäurezusammensetzung geringfügig unterscheiden, jedoch nicht in ihren sonstigen Eigenschaften.

Der Inhibitor M IIa ist gegenüber M IIb am N-Terminus um ein Peptid verlängert, das Serin, Prolin, Alanin und Phenylalanin enthält. Die N-terminale Gruppe ist bei M IIa Phenylalanin, bei M IIb ist sie Lysin. Der spezifische Trypsininhibitor M I hat Glutamin oder Glutaminsäure als Endgruppe. Die Molekulargewichte der Inhibitoren liegen bei 6 000.

Verwendet man beim Hemmtest BAPNA² als Substrat, so betragen die Hemmaktivitäten für den spezifischen Trypsininhibitor 2 700 ImU/mg bzw. 3 000 ImU/mg für den Trypsin-Plasmin-Inhibitor. Ähnliche Ergebnisse werden bei der Durchführung des Tests mit Azokasein als Substrat gefunden.

¹ 1 ImU ist die Menge Inhibitor, die 2 mU Trypsin zu 50% zu hemmen vermag.

² α -N-Benzoyl-DL-arginin-4-nitroanilid-hydrochlorid.

Wie sich aus den Hemmkurven (Abb. 1) berechnen läßt, beträgt die Hemmkonstante für den spezifischen Trypsininhibitor $2,3 \times 10^{-9}$ Mol/l, für den Trypsin-Plasmin-Inhibitor liegt sie unter 10^{-10} Mol/l.

Beide Inhibitoren zeigen das Phänomen der temporären Hemmung, d.h., sie werden allmählich durch Trypsin abgebaut. Wie Abb. 2 zeigt, wird der spezifische Trypsininhibitor M I wesentlich rascher inaktiviert als der Trypsin-Plasmin-Inhibitor M II, was auf Grund der um etwa zwei Zehnerpotenzen höheren Hemmkonstanten verständlich ist.

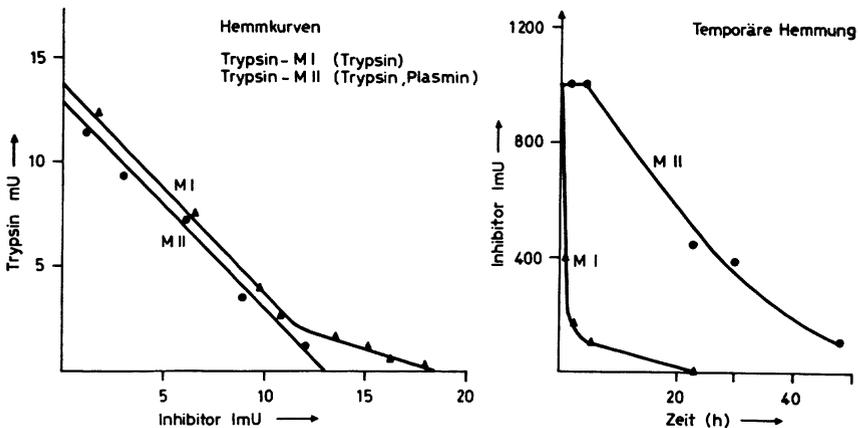


Abb. 1. Hemmkurven des spezifischen Trypsininhibitors M I und des Trypsin-Plasmin-Inhibitors M II in Gegenwart von BAPNA. Es wurde eine definierte Menge Trypsin vorgelegt und nach Zugabe variierender Inhibitormengen (Abszisse) die tryptische Restaktivität (Ordinate) gemessen.

Abb. 2. Temporäre Hemmung des spezifischen Trypsininhibitors M I und des Trypsin-Plasmin-Inhibitors M II. Die Inhibitoren wurden mit einem geringen Überschuß an Trypsin bei 37°C inkubiert. In Abständen wurden Proben entnommen und die noch vorhandene Inhibitoraktivität nach Ausfällen des Trypsins mit Perchlorsäure gemessen (Ordinate).

Im Gegensatz zu anderen Trypsininhibitoren wird der spezifische Trypsininhibitor aus Meerschweinchensamenblasen durch Plasmin rasch zerstört. Auch der Trypsin-Plasmin-Inhibitor wird durch Plasmin abgebaut, jedoch wesentlich langsamer.

Wird der Trypsin-Plasmin-Inhibitor mit einem Überschuß an Plasmin inkubiert, so verliert er seine Hemmwirkung gegen Trypsin. Möglicherweise

ist also für die Aktivität gegen beide Enzyme dasselbe Hemmzentrum verantwortlich. Nach Acylierung mit Maleinsäureanhydrid [2] sind beide Inhibitoren inaktiv, d.h., beide haben einen Lysinrest im reaktiven Zentrum³; der acylierte Trypsin-Plasmin-Inhibitor ist auch gegen Plasmin inaktiv, was wiederum für ein einziges Hemmzentrum für beide Enzyme spricht. In saurer Lösung wird die Aktivität beider Inhibitoren quantitativ regeneriert.

Bei allen bisher untersuchten Säugetieren und beim Menschen findet man im Sperma bzw. in den Samenblasen Inhibitoraktivität gegenüber Trypsin, das Meerschweinchen ist also kein Sonderfall.

Summary

Two proteinase inhibitors (molecular weight near 6,000) were isolated from seminal vesicles of guinea pigs by use of water insoluble trypsin resin and chromatography on Sulphoethyl Sephadex. Inhibitor I inhibits only trypsin ($K_1 = 2,3 \times 10^{-9}$); inhibitor II, trypsin ($K_1 < 10^{-10}$ Mol/l), and plasmin. Both inhibitors show temporary inhibition. From inhibitor II a modified form was isolated as well.

Literatur

1. HAENDLE, H.; FRITZ, H.; TRAUTSCHOLD, I. und WERLE, E.: Über einen hormon-abhängigen Inhibitor für proteolytische Enzyme in männlichen accessorischen Geschlechtsdrüsen und im Sperma. *Z. physiol. Chem.* 343: 185 (1965).
2. FRITZ, H.; GEBHARDT, M.; HOCHSTRASSER, K. und WERLE, E.: Identifizierung von Lysin- und Argininresten als Hemmzentren von Proteaseinhibitoren mit Hilfe von Maleinsäureanhydrid und Butandion-(2-3), *Z. physiol. Chem.* 350: 933 (1969).

³ Anmerkung bei den Korrekturen: Dieser Befund ist für den Inhibitor MI aufgrund neuer Ergebnisse überholt, siehe E. FINK, Dissertation, Universität München, 1970.