

## Isolierung des Trypsininhibitors aus Schafspankreas, Verhalten gegenüber proteolytischen Enzymen

HANS FRITZ\*, WOLFGANG SCHRAMM\*\*, BRIGITTE GREIF, KARL HOCHSTRASSER, EDWIN FINK und  
EUGEN WERLE

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

(Der Schriftleitung zugegangen am 18. November 1969)

**Zusammenfassung:** Der Trypsininhibitor aus Schafspankreas wurde über wasserunlösliches Trypsinharz angereichert und durch Gelfiltration und Ionenaustausch-Chromatographie weiter gereinigt. Gegenüber dem Inhibitor (KAZAL-Typ) aus Rinderpankreas<sup>4, 7, 9, 13</sup> ist beim Inhibitor aus Schafspankreas ein Serinrest ersetzt durch einen Alaninrest. Dieser Befund wurde durch die Analyse der

tryptischen Peptide des Schafspankreas-Inhibitors bestätigt<sup>21</sup>.

Der Trypsininhibitor aus Schafspankreas hemmt Chymotrypsin, Plasmin, Kallikreine und Thrombin (Esterolyse) nicht; er wird durch Trypsin (temporäres Hemmverhalten) und Chymotrypsin abgebaut.

**Summary:** *Isolation of the trypsin inhibitor from sheep pancreas and its behaviour towards the proteolytic enzymes.* The trypsin inhibitor from sheep pancreas was enriched by the use of a water-insoluble trypsin resin and further purified by gel filtration and ion exchange chromatography. Compared with the inhibitor (KAZAL type) from bovine pancreas<sup>4, 7, 9, 13</sup>, a serine residue is replaced by an

alanine residue in the inhibitor from sheep pancreas. This finding was confirmed by the analysis of the tryptic peptides from sheep pancreas inhibitor<sup>21</sup>. The trypsin inhibitor from sheep pancreas does not inhibit chymotrypsin, plasmin, kallikreins or thrombin (esterolysis); it is degraded by trypsin (temporary inhibitor effect) and chymotrypsin.

Bauchspeicheldrüsen verschiedener Tiere und des Menschen enthalten spezifische Trypsininhibitoren<sup>1–11</sup>, die mit den Proenzymen in den Pankreas-

saft sezerniert werden<sup>1–3, 5, 6–9</sup>. Der 1948 von KAZAL<sup>12</sup> aus Extrakten von Rinderpankreasgewebe isolierte Trypsininhibitor ist nach den Untersuchun-

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

\*\* Der Arbeit liegt die Dissertation von WOLFGANG SCHRAMM zugrunde.

*Enzyme:*

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)

Abkürzung: BAEE = *N*<sup>α</sup>-Benzoyl-L-arginin-äthylester.

<sup>1</sup> H. FRITZ, H. HARTWICH u. E. WERLE, diese Z. **345**, 150 [1966].

<sup>2</sup> H. FRITZ, F. WOITINAS u. E. WERLE, diese Z. **345**, 168 [1966].

<sup>3</sup> H. FRITZ, I. HÜLLER, M. WIEDEMANN u. E. WERLE, diese Z. **348**, 405 [1967].

<sup>4</sup> H. FRITZ, I. TRAUTSCHOLD, H. HAENDLE u. E. WERLE, Ann. New York Acad. Sci. **146**, 400 [1968].

<sup>5</sup> E. WERLE, I. TRAUTSCHOLD, H. HAENDLE u. H. FRITZ, Ann. New York Acad. Sci. **146**, 464 [1968].

<sup>6</sup> H. FRITZ, M. HUTZEL, I. HÜLLER, M. WIEDEMANN, H. STAHLHEBER, P. LEHNERT u. M.-M. FORELL, diese Z. **348**, 1575 [1967].

<sup>7</sup> L. J. GREENE, M. RIGBI u. D. S. FACKRE, J. biol. Chemistry **241**, 5610 [1966].

<sup>8</sup> L. J. GREENE, J. J. DiCARLO, A. J. SUSSMAN u. D. C. BARTELT, J. biol. Chemistry **243**, 1804 [1968].

<sup>9</sup> L. J. GREENE, Ann. New York Acad. Sci. **146**, 386 [1968].

gen von GREENE und Mitarb.<sup>7,9</sup> identisch mit dem im Pankreassaft des Rindes vorkommenden Trypsininhibitor. Der von uns<sup>2,4,13</sup> über wasserunlösliches Trypsinharz isolierte spezifische Trypsininhibitor aus Rinderpankreas ist mit diesen Präparaten ebenfalls identisch. Das Rinderpankreas enthält demnach nur 2 Proteaseinhibitoren, den „temporären“ Trypsininhibitor (KAZAL-Typ) und den polyvalenten Proteaseinhibitor (KUNITZ-WERLE-Typ, s. l. c.<sup>14</sup>), der Trypsin, Chymotrypsin, Kallikreine und Plasmin hemmt. Wir untersuchten nun die Bauchspeicheldrüsen von Schafen ebenfalls auf ihren Hemmstoffgehalt für Proteasen.

### Material und Methodik

Trypsin,  $\alpha$ -Chymotrypsin und Plasmin (Novo Industrie); Kallikrein aus Schweinepankreas<sup>15</sup>. Die Bestimmung der Aktivität und Hemmung der Enzyme erfolgte nach bekannten Methoden (Trypsin<sup>1</sup>, Chymotrypsin<sup>2</sup>, Plasmin<sup>3</sup>, Kallikrein<sup>3</sup>). 1 IU entspricht der Hemmung der Aktivität von ca. 1 mg Trypsin. — Bauchspeicheldrüsen von Schafen (Schlachthof-Material\*); Kieselguradsorbat von Pankresextrakten (Farbenfabriken Bayer\*\*). Biogel P-2 (Bio-Rad Laboratories).

### Ergebnisse

#### I. Isolierung

##### 1. Gewinnung der Organextrakte

###### a) Aus Pankreasgewebe

Die Aufarbeitung erfolgte analog der Gewinnung des Inhibitors aus Hundepankreas<sup>1</sup> durch Fällung von Ballasteiweiß mit Perchlorsäure, Zerstörung des Tryp-

\* Wir danken dem Münchener Schlachthof für die Überlassung der Drüsen.

\*\* Den Farbenfabriken Bayer, Werk Elberfeld, danken wir für die Herstellung des Kieselguradsorbates.

<sup>10</sup> E. W. CERWINSKY, P. J. BURCK u. E. L. GRINNAN, *Biochemistry* [Washington] **6**, 3175 [1967]; P. J. BURCK, R. L. HAMILL, E. W. CERWINSKY u. E. L. GRINNAN, *Biochemistry* [Washington] **6**, 3180 [1967].

<sup>11</sup> H. TSCHESCHE, E. WACHTER, S. KUPFER u. K. NIEDERMEIER, *diese Z.* **350**, 1247 [1969].

<sup>12</sup> L. A. KAZAL, D. S. SPICER u. R. A. BRAHINSKY, *J. Amer. chem. Soc.* **70**, 3034 [1948].

<sup>13</sup> H. FRITZ, K. HOCHSTRASSER, E. WERLE, B. BREY u. M. GEBHARDT, *Z. analyt. Chem.* **243**, 452 [1968].

<sup>14</sup> R. VOGEL, I. TRAUTSCHOLD u. E. WERLE, *Natürliche Proteinase-Inhibitoren*, S. 57, Thieme-Verlag, Stuttgart 1968.

<sup>15</sup> H. FRITZ, I. ECKERT u. E. WERLE, *diese Z.* **348**, 1120 [1967].

sinogens durch kurzes Erhitzen der sauren Extrakte auf 60–70°C und Neutralisation mit Kaliumcarbonat. Die inhibitorhaltigen Lösungen wurden zur Entfernung von Schwebstoffen durch eine 2–3 cm dicke Schicht aus Cellulosepulver filtriert und danach stark eingeengt. Durch Dialyse (3 h bei 20°C) gegen dest. Wasser ließ sich die Hauptmenge der Salze ohne Inhibitorverlust entfernen.

Bis zu 1 h nach Tötung der Tiere entnommenes und aufgearbeitetes Pankreasgewebe enthielt ca. 85 IU/kg Gewebe, 6–8 h nach Beginn der Entnahme aufgearbeitetes Pankreasgewebe enthielt 38–56 IU/kg Gewebe. Die Bauchspeicheldrüsen wurden in eisgekühlten Gefäßen gesammelt.

###### b) Aus Kieselguradsorbat

Das Pankreasgewebe wurde wie bei der Isolierung des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors (Trasylo) aufgearbeitet, Ballasteiweiß durch Acetonzugabe gefällt und die löslichen Bestandteile an Kieselgur adsorbiert<sup>14</sup>. Das Kieselgurpulver (1 kg) wurde jeweils dreimal mit insgesamt 2 l dest. Wasser eluiert. Die vereinigten Lösungen wurden mit demselben Volumen 6proz. Perchlorsäure versetzt, der entstandene Niederschlag wurde abzentrifugiert und der trübe Überstand durch eine 2–3 cm dicke Schicht aus Cellulosepulver gesaugt. Das klare Filtrat wurde mit 5M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung neutralisiert.

Aus 1 kg Kieselgurpulver wurden so 850–900 IU für Trypsin erhalten; dies entspricht ca. 32 IU/kg Gewebe.

##### 2. Anreicherung des Inhibitors über wasserunlösliches Trypsinharz

Die Bindung des Inhibitors an das wasserunlösliche Trypsinharz und die Dissoziation des Inhibitor-Trypsinharz-Komplexes erfolgte unter den von uns beschriebenen Bedingungen<sup>16</sup> bei stetiger Kühlung (0–4°C). Von 250–500 IU in 0,7–1,7 l 0,2M Salz-Pufferlösung, pH 7,8, wurden vom Trypsinharz jeweils 75–90% gebunden. Vom wasserunlöslichen Komplex wurden in 0,2 bis 0,3M KCl/HCl-Lösung bei 2- bis 3maliger Elution 60 bis 75% der vom Trypsinharz gebundenen Inhibitormenge wieder eluiert.

Durch diesen Isolierungsschritt wurde eine etwa 100fache Anreicherung des Inhibitors, bezogen auf den Gehalt an Protein (Biuret), erzielt. Vgl. dazu l. c.<sup>16</sup>, Tab. 3, S. 135.

##### 3. Fraktionierung durch Gelfiltration und über CM-Cellulose

Begleitsubstanzen mit höherem und niedrigerem Molekulargewicht wurden von dem über das Tryp-

<sup>16</sup> H. FRITZ, M. GEBHARDT, E. FINK, W. SCHRAMM u. E. WERLE, *diese Z.* **350**, 129 [1969].

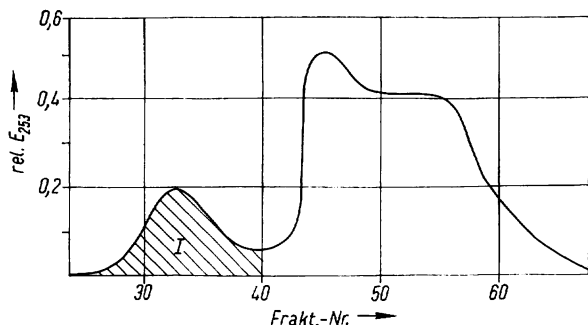


Abb. 1. Gelfiltration der über Trypsinharz angereicherten Inhibitorfraktionen.

Sephadex-G-50-Säule (130×1,6 cm), äquilibriert mit 0,01M Äthylendiamin/Essigsäure, pH 7,5. Das Eluat wurde in 10-ml-Frakt. (10–15 Tropfen/min) gesammelt. Schraffierter Bereich: Fraktionen mit Inhibitoraktivität.

sinharz angereicherten Inhibitor (spezif. Aktiv.: 1–2 IU/mg Biuret-Protein) durch Fraktionierung an Sephadex-G-50-Säulen abgetrennt (Abb. 1). Von der jeweils auf die Säule aufgetragenen Hemmaktivität von 80–132 IU in 20–30 ml wurden 92–95 % im symmetrischen Inhibitorpeak (I in Abb. 1) wieder eluiert. Die inhibitorhaltige Fraktion wurde lyophilisiert. Das dabei anfallende flockige Pulver wurde in 0,01M Triäthanolaminpuffer, pH 6,5, gelöst und die Lösung (115–145 IU in ca. 3 ml) auf eine mit demselben Puffer äquilibrierte CM-Cellulose-Säule (30×1,6 cm) aufgetragen. Der bei der Elution mit dem Äquilibrierpuffer (5 Tropfen/min, 10 ml/Frakt.) erhaltene symmetrische Inhibitorpeak (Absorption bei 253 nm) enthielt jeweils eine Hemmaktivität, die um 8–10 % über der auf die Säule aufgetragenen lag.

#### 4. Entsalzung

Die Entsalzung der inhibitorhaltigen Lösungen erfolgte über Bio-Gel-P-2-Säulen (Plexiglasmanntel, 70×3,2 cm) mit 0,01M Essigsäurelösung als Elutionsmittel, wobei sich 86% der aufgetragenen Inhibitormenge (408 IU in ca. 80 ml) in der salzfreien Inhibitorfraktion befanden.

Die Entsalzung wurde auch über Sephadex-G-50-Säulen mit 0,01M Essigsäurelösung sowie mit 0,02M Pyridinlösung als Elutionsmittel durchgeführt. Während sich letztere ebenfalls bewährte (Ausbeuten: 73–85 %), traten bei Verwendung der verd. Essigsäure beträchtliche Verluste (bis zu 50 %) an Inhibitoraktivität auf.

## II. Eigenschaften und Bausteinanalyse

Die spezif. Aktivität der reinsten Präparate liegt bei 3,6 IU/mg Einwaage, d.h. 1 mg des Inhibitors hemmt die Aktivität von etwa 3,6 mg Trypsin. Bei der Elektrophorese auf Celluloseacetat-Folien (0,05M Boratpuffer, pH 8,0) verhält sich das Präparat einheitlich. Die Bestimmung der Molekulargewichte durch Gelfiltration (Bedingungen s. l. c.<sup>17</sup>) ergab Werte von 6600 (pH 7,8) und 5800 (pH 3,5).

In der Tabelle sind die pro Mol Inhibitor gefundenen Mole Aminosäuren angegeben; die Interpretation erfolgt im Diskussionsteil. Mit Hilfe der Dansyl-Technik<sup>18</sup> ließen sich Asp und Glu im etwa gleichen Mengenverhältnis als N-terminale Reste nachweisen.

Aus den Extinktionswerten der Absorptionskurve berechnet sich der Tryptophangehalt<sup>19</sup> des Inhi-

aminosäurezusammensetzung der Trypsininhibitoren aus Pankreas von Schaf und Rind (Angaben in Mol Aminosäure pro Mol Inhibitor).

	Schaf			Rind	
	20 h	70 h	GREENE <sup>a</sup>	ganz-zahlig	s. Text
Γ-O <sub>3</sub> H					
Cys			6,13 <sup>b</sup>	6	
Asp	6,94	7,06	6,89	7	7
Thr	4,04	4,04	3,87	4	4
Ser	1,39	1,65	1,38	1	2
Glu	7,27	7,26	7,17	7	7
Pro	4,10	3,96	4,58	4	4
Gly	4,98	5,08	4,94	5	5
Ala	2,59	2,18	2,36	2	1
Cys	2,39	2,58	5,60	6	6
Val	3,74	3,79	3,99	4	4
Met	0,96	0,41	0,78	1	1
MetO <sub>2</sub>			1,01 <sup>b</sup>	1	
Ile	1,88	2,84	2,45	3	3
Leu	3,33	3,65	3,50	4	4
Tyr	1,85	1,60	1,82	2	2
Lys	3,11	3,10	3,17	3	3
Arg	2,77	2,95	2,86	3	3

a) Prof. Dr. L. J. GREENE, Brookhaven, USA, sind wir für die Durchführung der Analyse sehr dankbar.

b) Nach Oxidation mit Perameisensäure bestimmt.

<sup>17</sup> H. FRITZ, I. TRAUTSCHOLD u. E. WERLE, diese Z. **342**, 253 [1965].

<sup>18</sup> W. R. GRAY, *Methods in Enzymol.* **11**, 139 [1967].

<sup>19</sup> J. L. BAILY, *Techniques in Protein Chemistry*, 2. Aufl., S. 342, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam 1967.

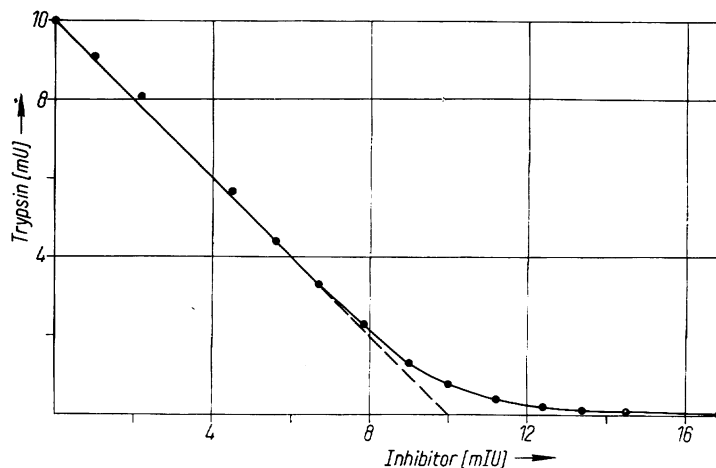


Abb. 2. Hemmkurve des Trypsininhibitors aus Schafspankreas.

Bedingungen wie i. c.<sup>3</sup> (S. 411, Abb. 5): 1 mg *N*<sup>α</sup>-Benzoyl-DL-arginin-*p*-nitroanilid in 1 ml Wasser, 10 mU Trypsin, Inhibitorlösung (0,01–0,3 ml) und 0,2M Triäthanolaminpuffer, pH 7,8, in 3 ml Endvolumen; Temp.: 25°C; Messung bei 405 nm.

bitors zu 0,2 Mol pro Mol Inhibitor (Spektralphotometer Leitz-Unicam SP 800, 1,3 mg Inhibitor in 2,0 ml 0,1N NaOH gelöst). Die Extinktion einer 0,1proz. Lösung des Inhibitors in dest. Wasser beträgt beim Extinktionsmaximum  $E_{275,5} = 0,56$ .

### III. Verhalten gegenüber Enzymen

Zu den Untersuchungen wurden Inhibitorpräparate mit einer spezif. Aktiv. von 3,2–3,6 IU/mg Einwaage verwendet.

#### Trypsin

Die Hemmkurve (Abb. 2) des Trypsininhibitors aus Schafspankreas ist identisch mit der des spezifischen Trypsininhibitors (KAZAL-Typ, i. c.<sup>3</sup>, S. 411, Abb. 5, Kurve 2) aus Rinderpankreas, die unter denselben Bedingungen aufgenommen wurde. Die Komplexbildung erfolgt dabei sehr rasch: Der sofort (5–10 sec) nach Zugabe des Inhibitors zur Trypsinlösung (5 mIU Inhibitor plus 10 mU Trypsin in 2,0 ml 0,2M Triäthanolaminpuffer, pH 7,8) meßbare Hemmgrad ändert sich mit zunehmender Inkubationszeit (bis zu 15 min) nicht; derselbe Hemmgrad wird auch gemessen, wenn der Inhibitor nach dem Substrat (1,0 mg *N*<sup>α</sup>-Benzoyl-DL-arginin-*p*-nitroanilid in 1,0 ml dest. Wasser) zur Trypsinlösung gegeben wird. Die Hemmung der Trypsinaktivität ist dabei zwischen pH 6,0 und 10,5 gleichbleibend optimal.

Die Dissoziationskonstante des Trypsin-Inhibitor-

Komplexes berechnet sich nach GREEN<sup>20</sup> aus der Hemmkurve (Abb. 2) zu  $K_i = 1 \cdot 10^{-9}M$ .

Das temporäre Hemmverhalten des Inhibitors aus Schafspankreas geht aus Abb. 3 hervor.

#### Chymotrypsin

15 min nach Zugabe von 60–150 mIU Inhibitor zu 1 mg Chymotrypsin in 2 ml 0,2M Triäthanolaminpuffer (plus 0,05M CaCl<sub>2</sub>), pH 7,8, (inkubiert bei 4°C) war die Chymotrypsinaktivität nicht vermindert. Der Inhibitor wird jedoch durch Chymotrypsin abgebaut: Bei Inkubation von 1,5 mg Chymotrypsin mit 390 mIU Inhibitor in 6,0 ml 0,2M Triäthanolaminpuffer, pH 7,8, bei 37°C waren nach 0,5 h noch 57 %, nach 2 h 19 % und nach 4 h nur noch 2 % der eingesetzten Inhibitoraktivität nachweisbar. Vgl. dazu i. c.<sup>3</sup>.

#### Plasmin, Kallikrein, Thrombin

Die BAEE-spaltende Aktivität von 0,2 Novo-Einheiten Plasmin wurde von 370 mIU des Inhibitors (inkubiert in 1,0 ml 0,05M Triäthanolaminpuffer, pH 7,8) nicht beeinflusst. Die BAEE-spaltende Aktivität von Kallikrein wurde von dem Inhibitorpräparat (30 mIU Inhibitor plus 1 biologische Einheit Kallikrein in 1,0 ml 0,2M Puffer, pH 7,8) nur in sehr geringem Maße vermindert: Unter der Annahme, daß im Schafspankreas ähnlich wie im

<sup>20</sup> N. M. GREEN u. E. WORK, Biochem. J. **54**, 347 [1953].

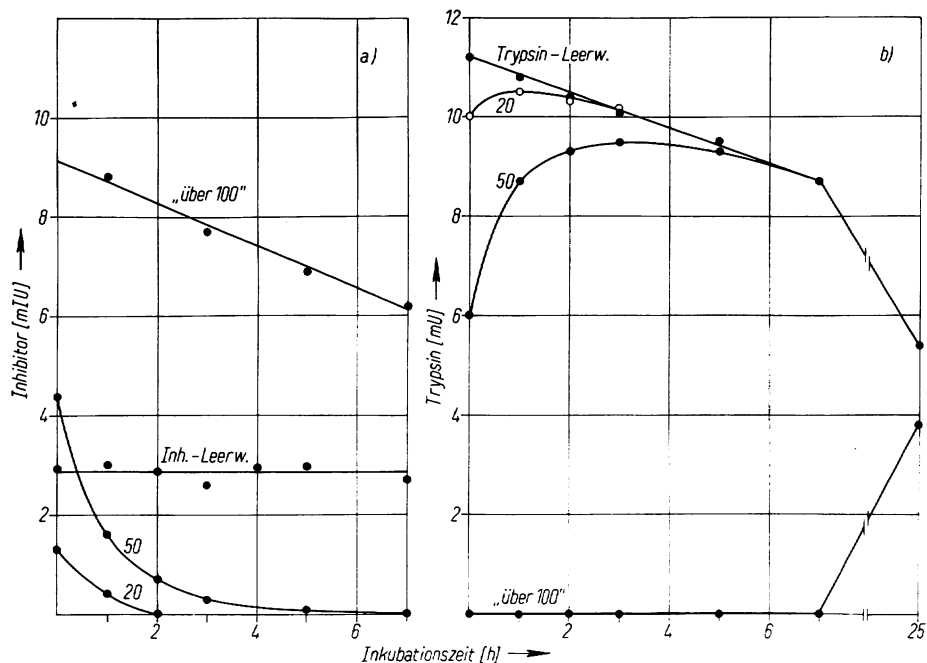


Abb. 3. Temporäre Hemmung: Abbau des Inhibitors aus Schafspankreas durch Trypsin.

a) Inhibitoraktivität in mIU nach Behandlung der Ansätze mit Perchlorsäure<sup>1,3</sup>. Ansätze: Je 500 mU (0,5 mg) Trypsin plus Inhibitor für ca. 20proz., 50proz. und vollständige Hemmung; plus 0,05M Triäthanolaminpuffer (0,01M CaCl<sub>2</sub>), pH 7,8, ad 5 ml. Inkubationstemp.: 37°C. 0;2 ml der Ansätze wurden mit 6proz. Perchlorsäure (1:1, v/v) enteweißbt, danach wurde die Inhibitorkonzentration (Ordinate) gemessen. Inh.-Leerw. = Inhibitorleerwert. b) Von je 0,1 ml der Ansätze für a) wurde gleichzeitig die Trypsinaktivität (Ordinate) bestimmt.

Rinderpankreas neben dem spezifischen Trypsin-inhibitor noch ein polyvalenter Trypsin-Kallikrein-Inhibitor vorkommt, würde der Gehalt des Inhibitorpräparates an letzterem, berechnet aus der Kallikreinhemmung, bei 0,4 % liegen. Eine geringe, nicht stöchiometrische Hemmung der BAEE-spaltenden Aktivität von *Thrombin* durch größere Mengen des Inhibitors dürfte unspezifischer Natur sein.

### Diskussion

Der Trypsininhibitor aus Schafspankreas unterscheidet sich vom KAZAL-Typ-Inhibitor aus Rinderpankreas, wie aus den Analysenwerten der Tabelle hervorgeht, nur durch den Austausch eines Serinrestes durch einen Alaninrest. Dieser Befund wurde inzwischen von HOCHSTRASSER und Mitarb.<sup>21</sup> durch die Analyse der tryptischen Peptide des Schafspankreas-Inhibitors bestätigt. Danach sind die Aminosäurezusammensetzungen der trypti-

schen Peptide des Inhibitors aus Schafspankreas — bis auf die genannte Ausnahme — mit den von GREENE und Mitarb.<sup>22</sup> für den KAZAL-Typ-Inhibitor aus Rinderpankreas angegebenen identisch. Die KAZAL-Typ-Inhibitoren beider Tierespecies dürften deshalb auch dieselbe Primärstruktur besitzen. Die Primärstruktur des Inhibitors aus Rinderpankreas wurde bereits aufgeklärt<sup>23</sup>.

Die Bestimmung des *N*-Terminus mit Hilfe der Dansyl-Technik ergab in unseren Inhibitorpräparaten neben Asp (*N*-terminaler Rest des Rinderpankreas-Inhibitors<sup>22,23</sup>) noch Glu. Da der Schafspankreas-Inhibitor während der Isolierung längere Zeit der Einwirkung von Trypsin (gebunden an den wasser-

<sup>21</sup> K. HOCHSTRASSER, W. SCHRAMM, H. FRITZ, S. SCHWARZ u. E. WERLE, diese Z. **350**, 893 [1969].

<sup>22</sup> L. J. GREENE u. J. S. GIORDANO JR., J. biol. Chemistry **244**, 285 [1969].

<sup>23</sup> L. J. GREENE u. D. C. BARTELT, J. biol. Chemistry **244**, 2646 [1969].

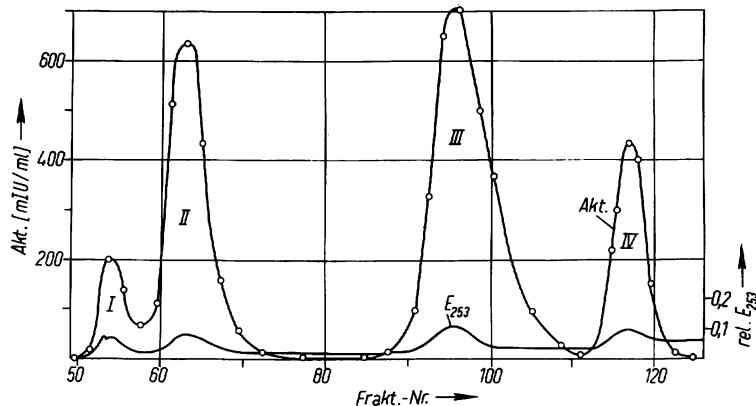


Abb. 4. Fraktionierung des Inhibitorpräparates aus Schafspankreas durch Chromatographie an DEAE-Cellulose (vgl. dazu die Fraktionierung des KAZAL-Typ-Inhibitors aus Rinderpankreas nach GREENE u. Mitarb.<sup>7</sup>).

Bedingungen: Die Lösung von 40 mg des Inhibitors in 3 ml des Äquilibrierpuffers wurde auf die mit 0,002M Triäthanolaminpuffer (plus 0,0025M KCl), pH 9,0, äquilibrierte DEAE-Cellulose-Säule (1,6 × 30 cm) aufgetragen. Zuerst wurde mit demselben Salz-Puffer-Gemisch und ab Frakt. 47 mit 0,02M Triäthanolaminpuffer (plus 0,025M KCl), pH 9,0, eluiert (10 Tropfen/min, 11 ml pro Frakt.).

Von der auf die Säule aufgetragenen Inhibitoraktivität wurden insgesamt 90% wieder eluiert, und zwar in Frakt. I 6,2 IU, in Frakt. II 40 IU, in Frakt. III 52 IU, in Frakt. IV 15 IU und im Nachlauf 2,5 IU. Jede Fraktion wurde entsalzt (Bio-Gel P-2) und danach lyophilisiert.

Linke Ordinate: Inhibitoraktivität; rechte Ordinate: rel. Absorption bei 253 nm.

unlöslichen Harzträger) ausgesetzt war, ist eine teilweise Spaltung von Arg-Glu- oder Lys-Glu-Bindungen, die im KAZAL-Typ-Inhibitor vorkommen<sup>22,23</sup>, denkbar. Beim Inhibitor aus Schweinepankreas wurden Spaltungen während der Isolierungsprozedur über Trypsinharze nachgewiesen<sup>24</sup>.

Aus den Ergebnissen der Analyse der tryptischen Peptide des Schafspankreas-Inhibitors<sup>21</sup> geht hervor, daß bei einem Teil des vorliegenden Inhibitorpräparates das N-terminale Pentapeptid (Asn-Ile-Leu-Gly-Arg-, Sequenz nach I.c.<sup>22,23</sup>) fehlt. Die Abspaltung des Pentapeptids durch Hydrolyse der Arg-Glu-Bindung könnte, wie erwähnt, während der Isolierung stattfinden. Es ist aber auch denkbar, daß im Schafspankreas, ähnlich wie im Schweinepankreas<sup>8,11</sup>, zwei Inhibitoren mit unterschiedlicher Kettenlänge vorkommen. Auffallend ist in diesem Zusammenhang, daß bei der Aktivierung des Trypsinogens aus Schafspankreas zwei Peptide (Val-(Asp)<sub>4</sub>-Lys und Phe-Pro-Val-(Asp)<sub>4</sub>-Lys) erhalten werden. Das heißt, daß Trypsinogen, im Gegensatz zu dem aus Rinderpankreas, ebenfalls in zwei genetisch bedingten Varianten vorliegt<sup>25</sup>.

Der Inhibitor aus Schafspankreas läßt sich durch Chromatographie an DEAE-Cellulose<sup>7</sup> in 4 Frak-

<sup>24</sup> H. TSCHESCHE u. H. KLEIN, diese Z. **349**, 1645 [1968].

tionen auftrennen (Abb. 4). Frakt. II und IV besitzen jedoch dieselbe Aminosäurezusammensetzung wie das Ausgangspräparat (s. Tabelle), bei Frakt. III sind bei sonst ebenfalls identischen Werten die Serin- und Alanin-Werte wiederum erhöht, jedoch nicht gradzahlig („integer“). Wir führen dies auf Begleitsubstanzen zurück, die vom Inhibitor auf unspezifische Weise adsorbiert werden.

Das reaktive Zentrum des Inhibitors aus Rinderpankreas stellt wahrscheinlich die Arg-Ile-Bindung in Stellung 18–19 der Peptidsequenz dar<sup>26</sup>. Beim Inhibitor aus Schafspankreas ist ebenfalls ein Argininrest für die Reaktion mit Trypsin verantwortlich<sup>27</sup>.

Im Gegensatz zum Pankreas des Rindes, das den KAZAL-Typ-Inhibitor und den polyvalenten Trypsin-Kallikrein-Inhibitor in etwa gleicher Menge enthält, kommt im Pankreas des Schafes nur der KAZAL-Typ-Inhibitor vor.

Wir danken der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGESELLSCHAFT, SFB-51 München, für Sach- und Personalmittel.

<sup>25</sup> R. SCHYNS, S. BRICTEUX-GRÉGOIRE u. M. FLORKIN, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **175**, 97 [1969].

<sup>26</sup> M. RIGBI u. L. J. GREENE, J. biol. Chemistry **243**, 5457 [1968].

<sup>27</sup> H. FRITZ, E. FINK, M. GEBHARDT, K. HOCHSTRASSER u. E. WERLE, diese Z. **350**, 933 [1969].