

KURZMITTEILUNG

Protease-Inhibitoren im menschlichen Spermaplasma Isolierung durch Affinitätschromatographie und Hemmverhalten

EDWIN FINK, EUGEN JAUMANN, HANS FRITZ, HEINRICH INGRISCH und EUGEN WERLE

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

(Der Schriftleitung zugegangen am 22. Oktober 1971)

Summary: *Protease inhibitors in human sperm plasma. Isolation by affinity chromatography and inhibition characteristics.* For the isolation of protease inhibitors from human sperm plasma the following procedures were used: adsorption on CM-Sephadex, affinity chromatography with trypsin cellulose-resin and gel filtration on Sephadex G-75. Two inhibitors were

obtained differing in molecular weights (I: 12700, and II: 5400, estimated by gel filtration) and in inhibition spectra. Inhibitor I inhibits both bovine trypsin and α -chymotrypsin, inhibitor II only trypsin. The titration curves are shown. Both inhibitors did not diminish the activities of porcine plasmin and pancreatic kallikrein using synthetic substrates.

In den männlichen accessorischen Geschlechtsdrüsen und im Sperma verschiedener Säugetiere und des Menschen wurden 1965 von HAENDLE u. Mitarb.^{1,2} und unabhängig davon 1966 von WALDSCHMIDT u. Mitarb.³ Trypsininhibitoren entdeckt. Vor kurzem berichteten zwei Arbeitskreise, HIRSCHHÄUSER und KIONKE⁴ und SUOMINEN u. Mitarb.⁵, über Untersuchungen an Präparationen der Trypsininhibitoren des menschlichen Seminalplasmas. Im Rahmen unserer Arbeiten auf dem Gebiet der Proteaseinhibitoren des männlichen Genitaltraktes⁶ haben wir zwei Trypsin-

inhibitoren aus Humansperma in weitgehend reiner Form isoliert und teilweise charakterisiert.

Material und Methoden

Die Bestimmung der *Hemmaktivität* erfolgte nach bekannten Methoden⁷: Trypsin, Substrat: *N*^α-Benzoyl-DL-arginin-*p*-nitroanilid-hydrochlorid; Chymotrypsin, Substrat: *N*-(3-Carboxypropionyl)-L-phenylalanin-*p*-nitroanilid; Kallikrein, Substrat: *N*^α-Benzoyl-L-arginin-äthylester (kombinierter Test mit Alkohol-Dehydrogenase); Plasmin, Substrat: wie bei Trypsin. Trypsin (Rind), α -Chymotrypsin (Rind) und Plasmin (Schwein), Novo Industri A/S. Kallikrein aus Schweinepankreas⁸.

Sammeln des Humanspermas: Humansperma erhielten wir von der Hautklinik der Universität München**. Nach Durchführung von Routineuntersuchungen wurden die durch Masturbation gewonnenen Spermata in einem Sammelbehälter in der Tiefkühltruhe (-20°C) eingefroren. Das bei unseren Untersuchungen eingesetzte Sperma wurde im Laufe etwa eines Jahres gesammelt.

** Wir danken Herrn Prof. Dr. BRAUN-FALCO, Dermatologische Klinik der Universität München, für die Überlassung des klinischen Untersuchungsmaterials.

⁷ H. FRITZ, I. TRAUTSCHOLD u. E. WERLE, in H. U. BERGMAYER, Methoden d. enzymat. Analyse, S. 1021 bis 1038, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1970. Siehe dort weitere Literatur.

⁸ H. FRITZ, I. ECKERT u. E. WERLE, diese Z. 348, 1120 [1967].

* *Adresse:* Dr. E. FINK, D-8 München 2, Nußbaumstraße 20.

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

² H. FRITZ, I. TRAUTSCHOLD, H. HAENDLE u. E. WERLE, Ann. New York Acad. Sci. 146, 400 [1968].

³ M. WALDSCHMIDT, B. HOFFMANN u. H. KARG, Zuchthygiene 1, 15 [1966].

⁴ C. HIRSCHHÄUSER u. M. KIONKE, Fertility and Sterility 22, 360 [1971].

⁵ J. SUOMINEN, S. MULTAMÄKI u. M. NIEMI, 5th. Annu. Meeting of Finnish Med. Soc., Helsinki 1971.

⁶a) E. FINK, Dissertat., Naturwiss. Fakultät d. Univ. München, 1970.

b) H. FRITZ, E. FINK, R. MEISTER u. G. KLEIN, diese Z. 351, 1344 [1970].

c) E. FINK, G. KLEIN, F. HAMMER, G. MÜLLER-BARDORFF u. H. FRITZ, in H. FRITZ u. H. TSCHESCHE, Proc. Internat. Res. Conf. on Proteinase Inhibitors, Munich, Nov. 1970, S. 225, Walter de Gruyter & Co. Berlin 1971.

Isolierung der Inhibitoren

Chromatographie an CM-Sephadex C-25: Unmittelbar nach dem Auftauen wurde das Sperma zentrifugiert ($14000 \times g$, 30 min, 4°C). Der Überstand wurde mit Essigsäure auf pH 5,0 eingestellt und dann mit dem gleichen Volumen an gequollenem CM-Sephadex C-25 (äquilibriert mit 0,02M Natriumacetat, pH 6,0, 0,02% Natriumazid) versetzt. Anschließend wurde 1 h bei 4°C gerührt, der nach kurzem Absitzen erhaltene Überstand dekantiert und die Suspension in eine Säule gefüllt.

Nicht adsorbierte Substanzen wurden mit Natriumacetatpuffer (0,02M, pH 6,0, 0,02% Natriumazid) aus dem CM-Sephadex-Adsorbat herausgewaschen und inhibitorhaltige Waschlösungen mit dem dekantierten Überstand vereinigt.

Die CM-Sephadex-Säule wurde mit Natriumacetatpuffer (0,02M, pH 6,0, 5% Natriumchlorid, 0,02% Natriumazid) entwickelt. Eluierte inhibitorhaltige Fraktionen wurden vereinigt und zunächst gegen destilliertes Wasser dialysiert (4 h bei 4°C), dann am Rotationsverdampfer auf $\frac{1}{6}$ des Ausgangsvolumens eingengt und nach Entsalzung über Sephadex G-25 fine (Elutionsmittel: 2proz. Essigsäure) lyophilisiert.

Affinitätschromatographie: Als nächster Reinigungsschritt folgte die Affinitätschromatographie an Trypsinharz⁶. Die lyophilisierte Substanz wurde in Puffer (0,1M Triäthanolamin-HCl, 0,4M NaCl, pH 7,8) gelöst und die Lösung auf eine gekühlte (0°C) Trypsinharzsäule („Trypsin polymer gebunden an CM-Cellulose“ 7–10 U/mg von Merck AG*) aufgetragen. Nach dem Auswaschen der nicht gebundenen Stoffe mit dem gleichen Puffer wurde der Inhibitor vom Trypsinharz durch Elution mit saurem Puffer (0,4M KCl/HCl, pH 1,8) abgelöst.

Die inhibitorhaltige Lösung wurde neutralisiert, am Rotationsverdampfer eingengt und nach Dialyse durch Gelfiltration entsalzt (Durchführung wie oben beschrieben) und lyophilisiert.

Gelfiltration an Sephadex G-75: Durch Gelfiltration an Sephadex G-75 ließ sich dieses Präparat in zwei inhibitorisch aktive Fraktionen auftrennen. Die Bedingungen sind in der Legende zu Abb. 1. angegeben. Unter denselben Bedingungen wurde jede Fraktion an Sephadex G-75 rechromatographiert.

Die Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration über Sephadex G-75 wurde bei pH 7,8 durchgeführt⁹.

Elektrophorese auf Celluloseacetatfolien: Puffer: Dinatriumtetraborat, 0,05M, pH 8,0; 30 min, 24 V/cm; Gerät: Mikrophor der Fa. Boskamp.

* Den Herren Dr. LANG und Dr. HENNRICH, E. Merck AG, Darmstadt, sind wir für die Überlassung des Harzes sehr dankbar.

⁹ H. FRITZ, I. TRAUTSCHOLD u. E. WERLE, diese Z. 342, 253 [1965].

Ergebnisse und Diskussion

In jüngster Zeit veröffentlichten zwei Arbeitskreise Untersuchungen über Trypsininhibitoren der menschlichen Seminalflüssigkeit^{4,5}. C. HIRSCHHÄUSER und M. KIONKE⁴ gewannen eine Inhibitorpräparation durch Affinitätschromatographie von Seminalplasma. J. SUOMINEN u. Mitarb. fraktionierten Seminalflüssigkeit durch Gelfiltration über Sephadex G-75⁵. Ziel unserer unabhängig davon durchgeführten Untersuchungen war es, Trypsininhibitoren aus Humansperma in reiner Form zu isolieren. Es zeigte sich, daß dies nur zu erreichen ist, wenn mehrere unterschiedliche Reinigungsschritte kombiniert werden.

Isolierung und Eigenschaften der Inhibitoren

Beim Adsorptionsschritt an CM-Sephadex C-25 wurden 25% der antitryptischen Aktivität des Seminalplasmas nicht gebunden.

Nach dem Entsalzen und Lyophilisieren der von CM-Sephadex eluierten Inhibitoren erhielten wir eine Präparation mit der noch sehr niedrigen spezifischen Aktivität von 19 mIU/mg. Eine fast achtzigfache Steigerung der spezifischen Aktivität auf 1500 mIU/mg gelang über die Affinitätschromatographie an Trypsinharz.

Bei der zur weiteren Reinigung durchgeführten Gelfiltration über Sephadex G-75 erhielten wir zwei aktive Fraktionen, die wir entsprechend der Reihenfolge ihres Auftretens bei der Elution als Fraktion I und Fraktion II bezeichneten (Abb. 1). Die spezifische Aktivität betrug nach Rechromatographie und Lyophilisation von Fraktion I 1,73 IU/mg und von Fraktion II 2,17 IU/mg. HIRSCHHÄUSER und KIONKE geben für den von ihnen isolierten Hemmstoff, der vorwiegend Inhibitor des niedrigeren Molekulargewichtes enthalten dürfte (s. u.), eine spezifische Aktivität von 0,23 IU je mg Protein an.

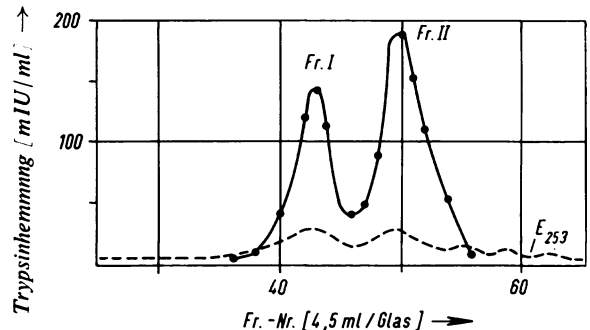


Abb. 1. Fraktionierung an Sephadex G-75.

Das eingesetzte Inhibitorpräparat war durch Affinitätschromatographie an Trypsinharz gewonnen worden (siehe Text).

Säule: Sephadex G-75 (123 \times 1,9 cm); Elutionsmittel: 2proz. Essigsäure; Elutionsgeschwindigkeit: 5,4 cm/h.

Bezogen auf die an CM-Sephadex adsorbierte Menge an Inhibitor (100%) verläuft die Reinigung über alle Stufen mit einer Gesamtausbeute von 63%, wobei auf Fraktion I 30%, auf Fraktion II 24% entfallen und 9% auf die Nebenfraktionen (Gemisch der Fraktionen I und II).

Die Molekulargewichtsbestimmung mittels Gelfiltration über Sephadex G-75 ergab für Fraktion I einen Wert von 12700, für Fraktion II einen solchen von 5400. SUOMINEN u. Mitarb.⁵, die zur Reinigung des Trypsininhibitors Seminalplasma über Sephadex G-75 fraktionierten, kamen zu ähnlichen Ergebnissen: Sie fanden zwei inhibitorisch aktive Fraktionen mit Molekulargewichten von etwa 11500 und 4000.

Die elektrophoretische Untersuchung auf Celluloseacetatfolien wies Fraktion I als einheitlich aus. Fraktion II wurde unter den gewählten Bedingungen in zwei Banden getrennt. Beide Fraktionen wanderten in Richtung der Kathode.

Hemmverhalten

Die Abb. 2 und 3 zeigen Titrationskurven von Trypsin bzw. Chymotrypsin mit den beiden Inhibitoren.

Bereits aus der Ähnlichkeit der Molekulargewichte war zu schließen, daß SUOMINEN u. Mitarb. ihre Untersuchungen an den gleichen Inhibitoren durchführen wie unsere Arbeitsgruppe. Ein Vergleich der festgestellten Hemmspektren bekräftigte diese Folgerung (Tabelle). Allerdings besteht eine gewisse Diskrepanz im Verhalten der höhermolekularen Fraktion gegenüber Kallikrein. SUOMINEN u. Mitarb. stellten eine partielle Hemmung von Gewebekallikrein durch diese Fraktion fest. Wir konnten gegenüber Kallikrein aus Schweinepankreas keine Hemmung nachweisen.

Der von HIRSCHHÄUSER und KIONKE beschriebene Trypsininhibitor hemmt Chymotrypsin nicht. Es ist demnach anzunehmen, daß er der von uns isolierten Fraktion II (Molekulargewicht 5400) entspricht.

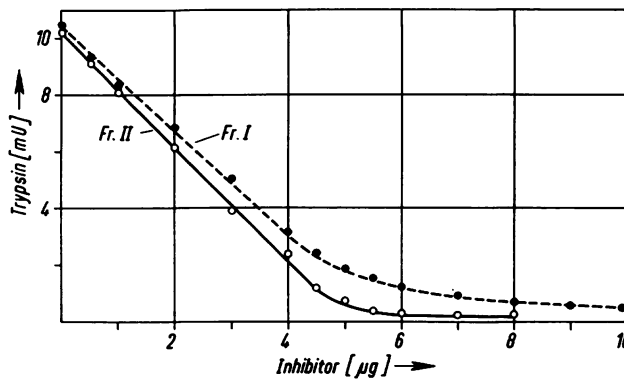


Abb. 2. Titration von Trypsin mit Humansperma-Inhibitor I und II.

Konstante Trypsinmengen (ca. 10 µg) wurden mit steigenden Mengen der Inhibitoren (Abszisse) in 2,0 ml Pufferlösung, pH 7,8, bei 25°C 5 min inkubiert und die verbleibende Trypsinaktivität (Ordinate) bestimmt⁷.

Tabelle: Hemmspektren der Inhibitoren aus Humansperma.

Fraktion	Eigene Untersuchungen		HIRSCHHÄUSER u. KIONKE ¹	SUOMINEN u. Mitarb. ⁵	
	I	II		I	II
Molekulargewicht	12 700	5 400		11 500	4 000
<i>Auf Hemmbarkeit getestetes Enzym</i>					
Trypsin	+	+	+	+	+
Chymotrypsin	+	-	-	+	-
Plasmin	-	-	-	-	-
Kallikrein	-	-		(+)	-

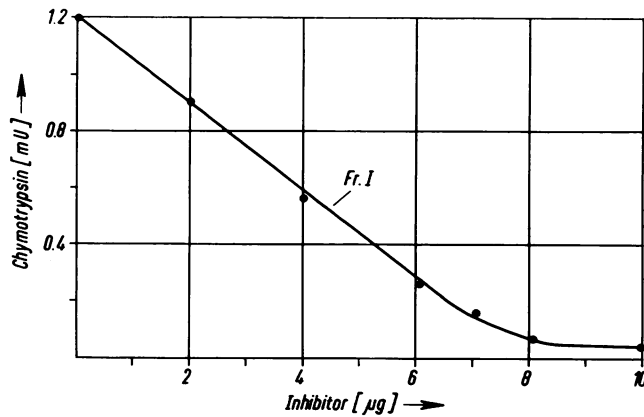


Abb. 3. Titration von Chymotrypsin mit Humansperma-Inhibitor I.

Konstante Chymotrypsinmengen (ca. 20 μg) wurden mit steigenden Mengen an Inhibitor I (Abszisse) in 2,0 ml Pufferlösung, pH 7,8, bei 25°C 5 min inkubiert und die verbleibende Chymotrypsinaktivität (Ordinate) bestimmt⁷.

Aus physiologischer Sicht ist von besonderem Interesse, ob den beschriebenen Protease-Inhibitoren beim Befruchtungsvorgang unterschiedliche Funktionen zukommen. Die akrosomale trypsinähnliche Protease „Akrosin“ (ZANEVELD u. Mitarb., l. c.¹⁰), der eine entscheidende Rolle bei der Durchdringung der Zona pellucida des Ovum durch das Spermium zukommt¹⁰,

¹⁰ L. J. D. ZANEVELD, K. L. POLAKOSKI, R. T. ROBERTSON u. W. L. WILLIAMS, in H. FRITZ u. H. TSCHESCHE,

wird von den isolierten Inhibitoren unterschiedlich stark gehemmt¹¹.

Diese Arbeiten wurden wesentlich gefördert aus Mitteln der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT, Sonderforschungsbereich 51, München.

Proc. Internat. Res. Conf. on Proteinase Inhibitors, Munich, Nov. 1970, S. 236, Walter de Gruyter & Co., Berlin 1971.

¹¹ E. FINK und Mitarb., in Vorbereitung.