

KURZMITTEILUNG

Charakterisierung einer Trypsin-ähnlichen Proteinase (Akrosin) aus Eberspermien durch ihre Hemmbarkeit mit verschiedenen Protein-Proteinase-Inhibitoren, II^[1]

Inhibitoren aus Blutegeln, Sojabohnen, Erdnüssen, Rindercolostrum und Seeanemonen

Hans Fritz*, Bruni Förg-Brey, Hans Schießler, Marianne Arnhold und Edwin Fink

(Der Schriftleitung zugegangen am 31. Mai 1972)

Characterization of a trypsin-like proteinase (acrosin) from boar spermatozoa by inhibition with different protein proteinase inhibitors, II: Inhibitors from leeches, soybeans, peanuts, bovine colostrum and sea anemones

Summary: The titration curves of boar acrosin with protein proteinase inhibitors from different sources show increasing affinity of the inhibitors to acrosin in the sequence given: Trypsin-plasmin-chymotrypsin inhibitor from cow colostrum, trypsin-plasmin-chymotrypsin-kallikrein inhibitor from sea anemones, trypsin-plasmin inhibitor BdeUin A from leeches, Kunitz soybean trypsin inhibitor, Bowman-Birk soybean trypsin inhibitor, and trypsin-plasmin-kallikrein-chymotrypsin inhibitor from peanuts. The affinities of the inhibitors from soybeans and peanuts to boar acrosin are comparable to those of the seminal inhibitors^[1].

In comparison with the inhibitors mentioned above the affinity of the trypsin-plasmin inhibitor BdeUin B-3 from leeches to boar acrosin is considerably higher. A K_i -value below 10^{-10} M was calculated for the acrosin-BdeUin B-3 complex from the titration curve.

It may be concluded from the broad inhibition specificity of boar acrosin that the inhibition and enzymatic splitting specificity of the acrosin resembles more those of trypsin and plasmin than those of thrombin and the kallikreins, of which the inhibition and splitting specificities are very limited.

In der voranstehenden Arbeit^[1] wurde die Hemmwirkung von Protein-Proteinase-Inhibitoren aus Spermaplasma und Samenblasen auf das Trypsin-ähnliche akrosomale Enzym aus Eberspermien untersucht. Zur weiteren Abgrenzung der Wirkungsspezifität dieses Enzyms war es notwendig, den Einfluß einer Reihe von Inhibitoren verschiedener Herkunft auf die Akrosinaktivität zu prüfen.

Material und Methodik

Verwendete Substanzen: Trypsin-Plasmin-Inhibitor BdeUin B-3, 5,1 IU/mg und Trypsin-Plasmin-Inhibitor BdeUin A (Mischung der Isoinhibitoren), 3,8 IU/mg aus Blutegeln^[2]; Kunitz-Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor^[3], 1,3 IU/mg, von E. Merck Darmstadt, Art. 24020 („chromatographisch gereinigt“) und Bowman-Birk-

Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor^[4], 1,2 IU/mg, von Serva Heidelberg, Art. 37340 („pract.“)*; Trypsin-Plasmin-Kallikrein-Chymotrypsin-Inhibitor aus Erdnüssen^[5], 4,8 IU/mg; Trypsin-Plasmin-Chymotrypsin-Kallikrein-Inhibitor aus Seeanemonen^[6] (Gemisch der Isoinhibitoren), 3,3 IU/mg; Trypsin-Plasmin-Chymotrypsin-Inhibitor aus Rindercolostrum^[7], 2,3 IU/mg.

H. & Tschesche, H., Hrsg.) S. 271–280, W. de Gruyter Berlin.

³ Ikenaka, T., Koide, T. & Odani, S. (1971) in l. c.^[2], S. 108–116.

⁴ Birk, Y. & Gertler, A. (1971) in l. c.^[2], S. 142–148.

* Das Präparat besteht nach unseren Untersuchungen, bezogen auf seine Trypsin-Hemmaktivität, zu 90% aus dem Bowman-Birk-Inhibitor und nur zu 10% aus dem Kunitz-Inhibitor.

⁵ Hochstraßer, K., Illchmann, K. & Werle, E. (1969) *diese Z.* **350**, 929–932.

⁶ Fritz, H., Brey, B. & Béress, L. (1972) *diese Z.* **353**, 19–30.

⁷ Čechová, D., Jonáková, V. & Šorm, F. (1971) *Collect. Czech. Chem. Commun.* **36**, 3342–3357; Čechová, D., Jonáková-Švestková, V. & Šorm, F. (1970) *Collect. Czech. Chem. Commun.* **35**, 3085–3091.

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

¹ I. Arbeit dieser Reihe: Fritz, H., Förg-Brey, B., Fink, E., Schießler, H., Jaumann, E. & Arnhold, M. (1972) *diese Z.* **353**, 1007–1009, vorstehend.

² Fritz, H., Gebhardt, M., Meister, R. & Fink, E. (1971) in Proc. Int. Res. Conf. on Proteinase Inhibitors (Fritz,

Meßmethodik: Die Titration des Akrosins erfolgte nach den Angaben in der voranstehenden Arbeit^[1].

Ergebnisse und Diskussion

Abb. 1 zeigt die Hemmkurve, die bei Titration des Akrosins mit dem Trypsin-Plasmin-Inhibitor Bdeillin B-3 aus Blutegeln erhalten wurde. Die in die Hemmansätze zu pipettierenden Inhibitormengen sind hier extrem niedrig (5 bis 200 ng). Der lineare Bereich der Titrationskurve liegt zwischen 5 und 25 ng zugesetztem Inhibitor. Eine Erhöhung der Substratkonzentration bei der Messung ließ keine verstärkte Dissoziation des bei der Vorinkubation gebildeten Akrosin-Inhibitor-Komplexes erkennen. Wir haben deshalb unter der berechtigten Annahme einer äquimolaren (1 Molekül Akrosin plus 1 Molekül Inhibitor) Komplexbildung durch Extrapolation aus dem linearen Anteil der Titrationskurve die vorgelegte Akrosinmenge im Inkubationsansatz zu 10 pMol und somit die Akrosinkonzentration zu $3 \times 10^{-9} \text{M}$ berechnet. (Das Molekular-

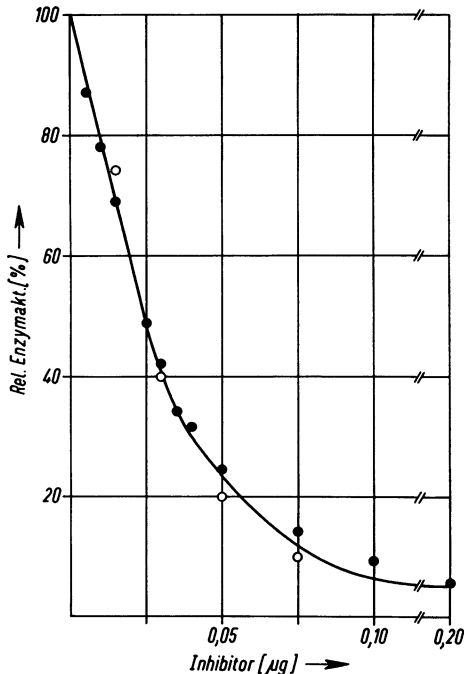


Abb. 1. Titration von Eber-Akrosin mit dem Trypsin-Plasmin-Inhibitor Bdeillin B-3 aus Blutegeln.

Verwendet wurde ein durch Affinitätschromatographie gereinigtes Akrosin (●) und das Akrosinpräparat vor diesem Reinigungsschritt (○)^[8]. Zur Versuchsdurchführung s. Material und Methodik in I. c.^[1].

⁸ Fink, E., Schießler, H., Förg-Brey, B. & Fritz, H., in Vorbereitung.

gewicht des in analytisch reiner Form vorliegenden Inhibitors B-3 ist bekannt^[2]). Die nach der Methode von Green^[9] ermittelte Dissoziationskonstante K_i des Akrosin-(Bdeillin B-3)-Komplexes liegt unter 10^{-10}M .

Berücksichtigt man das gegenüber den Seminalinhibitoren höhere Molekulargewicht der Inhibitoren aus Erdnüssen^[5] und Sojabohnen^[3,4], so ergibt sich aus den Titrationskurven in Abb. 2, daß auch diese pflanzlichen Proteinase-Inhibitoren eine ähnlich große Affinität zum Eber-Akrosin aufweisen wie die Seminalinhibitoren^[1]. Eine deutlich geringere Hemmwirkung gegenüber dem Eber-Akrosin besitzen die relativ niedermolekularen Inhibitoren aus Seeanemonen^[6], Bdeillin A aus Blutegeln^[2] und der wiederum ein etwas höheres Molekulargewicht aufweisende Inhibitor aus Rindercolostrum^[7].

Hemmstoffe für die Trypsin-ähnliche akrosomale Proteinase aus Kaninchen- bzw. Humanspermien sind auch Trypsin-Inhibitoren aus Limabohnen^[10], Hühner-eiklar (Ovomucoid)^[11], Sojabohnen^[10-12], Humanserum^[13] sowie synthetische Trypsin-Hemmstoffe^[14]. Die Akrosine stellen demnach Proteinase mit einem sehr breiten Spezifitätsbereich dar – ähnlich dem von Trypsin und Plasmin – was ihre Hemmbarkeit durch Protein-Proteinase-Inhibitoren betrifft. Somit dürfte auch ihre Spaltungsspezifität bei der Hydrolyse von Peptidbindungen mehr der von Trypsin und Plasmin gleichen und nicht so eng eingeschränkt sein wie z. B. bei Thrombin oder den Kallikreinen.

Für die evtl. Anwendung als Kontrazeptiva werden Inhibitoren mit besonders hoher Affinität zu den Akrosinen benötigt, die andererseits die Aktivität weiterer Serin-Proteinase des Organismus möglichst wenig beeinflussen sollten. Es ist deshalb bemerkenswert, daß der mit Abstand stärkste Akrosin-Inhibitor Bdeillin B-3 aus Blutegeln Humanplasmin nur sehr schwach hemmt^[15]. Eine Hemmung weiterer Serin-Proteinase des Serums durch Bdeillin B-3 konnten wir bislang nicht feststellen. Es besteht deshalb u. U. die Möglichkeit, relativ spezifische Akrosin-Inhibitoren synthetisch oder durch geeignete Modifizierung von

⁹ Green, N. M. & Work, E. (1953) *Biochem. J.* **54**, 347–352.

¹⁰ Stambaugh, R. & Buckley, J. (1968) *Science* **161**, 585–586; (1969) *J. Reprod. Fert.* **19**, 423–432.

¹¹ Stambaugh, R., Brackett, B. G. & Mastroianni, L. (1969) *Biol. Reprod.* **1**, 223–227.

¹² Gaddum, P. & Blandau, R. J. (1970) *Science* **170**, 749–751.

¹³ Schumacher, G. F. B. (1971) *Contraception* **4**, 67–78.

¹⁴ Zaneveld, L. J. D., Robertson, R. T. & Williams, W. L. (1970) *FEBS Lett.* **11**, 345–347; Newell, S. O. & Williams, W. L. (1972) *Fed. Proc.* **31**, Abstr. 367.

¹⁵ Fritz, H., Kalckreuth, W. & Marx, R., in Vorbereitung.

Protein-Proteinase-Inhibitoren herzustellen, sobald wir die Strukturen derartig „einseitig“ hemmender Inhibitoren kennen.
Mit Mitteln des *Sonderforschungsbereiches 51*, Mün-

chen, finanziert. Weiterhin danken wir Herrn Prof. Dr. Dr. E. *Werle* für seine Unterstützung dieser Arbeit, sowie Frau Dr. D. *Čechová* für die Überlassung des Rindercolostrum-Inhibitors.

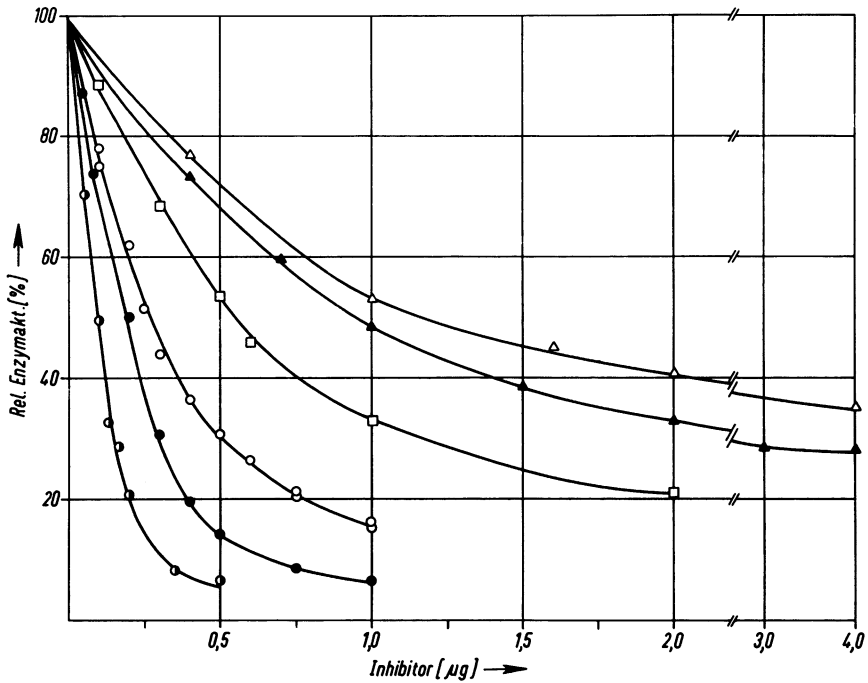


Abb. 2. Titration von Eber-Akrosin mit verschiedenen Protein-Proteinase-Inhibitoren.

Symbol	Inhibitor aus	Inkubiert* [min]
○—○	Erdnüssen	30
●—●	Sojabohnen (Bowman-Birk)	30
○—○	Sojabohnen (Kunitz)	30
□—□	Blutegeln (Bdellin A)	20
▲—▲	Seeanemonen	30
△—△	Rindercolostrum	30

* Inkubationszeit (Akrosin plus Inhibitor) vor Zugabe des Substrates. Meßbedingungen s. Material und Methodik in I. c.^[1].