

[16] D. Cook, Can. J. Chem. 40, 480 (1962).

[17] D. Cassimatis u. B. P. Susz, Helv. Chim. Acta 44, 943 (1961).

[18] D. Cassimatis u. T. Theophanides, Can. J. Spectr. 17, 17 (1972).

[19] G. A. Olah, W. S. Tolgyesi, S. J. Kuhn, M. E. Moffatt, I. J. Bastien u. E. B. Baker, J. Amer. Chem. Soc. 85, 1328 (1963).

[20] B. P. Susz u. D. Cassimatis, Helv. Chim. Acta 44, 395 (1961).

[21] D. Cassimatis, P. Gagnaux u. B. P. Susz, Helv. Chim. Acta 43, 424 (1960).

[22] J. C. Jaccard u. B. P. Susz, Helv. Chim. Acta 50, 97 (1967).

[23] G. A. Olah u. M. B. Comisarow, J. Amer. Chem. Soc. 89, 2694 (1967).

[24] G. A. Olah u. M. B. Comisarow, J. Amer. Chem. Soc. 88, 3313 (1966).

[25] G. A. Olah u. M. B. Comisarow, J. Amer. Chem. Soc. 88, 4442 (1966).

[26] B. P. Susz u. I. Cooke, Helv. Chim. Acta 37, 1273 (1954).

[27] B. P. Susz, C. R. Acad. Sci. 248, 2569 (1959).

[28] I. Cooke, B. P. Susz u. C. Herschmann, Helv. Chim. Acta 37, 1280 (1954).

[29] H. Hogeveen, Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 86, 809 (1967).

[30] G. A. Olah u. A. M. White, J. Amer. Chem. Soc. 89, 3591 (1967).

[31] G. A. Olah u. A. M. White, J. Amer. Chem. Soc. 89, 4752 (1967).

[32] G. A. Olah u. A. M. White, J. Amer. Chem. Soc. 89, 7072 (1967).

[33] A. Terenin, W. Filimonov u. D. Bystrov, Z. Elektrochem. 62, 180 (1958).

[34] H. J. Coerver u. C. Curran, J. Amer. Chem. Soc. 80, 3522 (1958).

[35] G. C. Turrel u. J. E. Gordon, J. Chem. Phys. 30, 895 (1958).

[36] P. N. Gates u. D. Steele, J. Mol. Struct. 1, 349 (1968).

[37] D. Cassimatis, J. P. Bonnin u. T. Theophanides, Can. J. Chem. 48, 3860 (1970).

[38] A. Germain, A. Commeyras u. A. Casaderall, Bull. Soc. Chim. Fr. 8, 3177 (1972).

[39] H. Ulich, E. Hertel u. W. Nespital, Z. Phys. Chem. (B) 17, 21 (1932).

[40] G. A. Olah, S. J. Kuhn, S. H. Flood u. B. A. Hardie, J. Amer. Chem. Soc. 86, 2203 (1964).

[41] G. A. Olah u. P. W. Westerman, persönliche Mitteilung.

[42] J. M. le Carpentier u. R. Weiss, Acta Cryst. B 28, 1437 (1972).

[43] S. E. Rasmussen u. N. C. Broch, Acta Chem. Scand. 20, 1351 (1966).

[44] B. Chevrier, J. M. le Carpentier u. R. Weiss, Acta Cryst. B 28, 2659 (1972).

[45] J. M. le Carpentier u. R. Weiss, Acta Cryst. B 28, 1442 (1972).

[46] B. Chevrier, J. M. le Carpentier u. R. Weiss, Acta Cryst. B 28, 2667 (1972).

[47] B. Chevrier, J. M. le Carpentier u. R. Weiss, J. Amer. Chem. Soc. 94, 5718 (1972).

[48] L. Brun u. C. I. Bränden, Acta Cryst. 20, 749 (1966).

[49] C. I. Bränden u. J. Lindqvist, Acta Chem. Scand. 17, 353 (1963).

[50] M. Bonamico, G. Dassy u. C. Ercolani, Chem. Commun. 1966, 24.

[50a] Vgl. G. A. Olah, Angew. Chem. 85, 183 (1973); Angew. Chem. internat. Edit. 12, 173 (1973).

[51] F. P. Boer, J. Amer. Chem. Soc. 90, 6706 (1968).

[52] J. M. le Carpentier u. R. Weiss, Acta Cryst. B 28, 1421 (1972).

[53] J. M. le Carpentier u. R. Weiss, Acta Cryst. B 28, 1430 (1972).

[54] B. Chevrier, J. M. le Carpentier u. R. Weiss, Acta Cryst. B 28, 2673 (1972).

[55] B. Chevrier u. R. Weiss, unveröffentlichte Ergebnisse.

[56] G. Herzberg: Spectra of Diatomic Molecules. Van Nostrand, Princeton 1959, 2. Aufl., S. 522.

[57] C. C. Costain, J. Chem. Phys. 29, 864 (1958).

[58] D. R. Lide, J. Chem. Phys. 22, 1577 (1954).

[59] B. Rees, A. Veillard u. R. Weiss, Theor. Chim. Acta 23, 266 (1971).

[60] G. D. Mateescu, J. L. Riemschneider, J. J. Srobova u. G. A. Olah, J. Amer. Chem. Soc. 94, 7191 (1972).

## Biochemie natürlicher Proteinase-Inhibitoren

Von Harald Tschesche<sup>[\*]</sup>

Die natürlichen Inhibitoren proteolytischer Enzyme sind Proteine. Diese Inhibitoren assoziieren mit den Enzymen unter reversibler Bildung stöchiometrischer Protein-Protein-Komplexe, wobei unter substratalogener Assoziation am aktiven Zentrum des Enzyms alle katalytischen Funktionen kompetitiv gehemmt werden. Die sehr weite Verbreitung der Inhibitoren im Tier- und Pflanzenreich unterstreicht ihre biologische Bedeutung im intermediären Stoffwechsel, die in einer Erweiterung der Möglichkeiten zur zeitlichen und räumlichen Begrenzung von Enzymaktivitäten zu sehen ist. Bekannt sind eine Reihe von kovalenten Strukturen, detaillierte kinetische Daten über die reversible Protein-Protein-Wechselwirkung, die Vorgänge bei der Inaktivierung sowie chemische Methoden zur Modifizierung dieser Proteine. Erste Röntgen-Strukturdaten eines Inhibitors und seines Enzym-Komplexes vermitteln Einsichten in dessen Molekülstruktur und die Wechselwirkungen bei der Assoziation zum Komplex.

### 1. Einführung

Das Vorkommen von „Antienzymen“ wurde bereits um die Jahrhundertwende für die antityptische Aktivität von Se-

rum<sup>[1, 2]</sup> und für die Widerstandsfähigkeit von Nematoden gegen die Verdauungsenzyme ihrer Wirtsorganismen<sup>[3]</sup> verantwortlich gemacht. Im zweiten Drittel dieses Jahrhunderts isolierte Kunitz in grundlegenden Arbeiten den gewebsständigen Trypsin-Inhibitor aus Rinderpankreas<sup>[4]</sup> und den Inhibitor aus Sojabohnen<sup>[5, 6]</sup> und wies ihre Proteinnatur nach, kristallisierte die Proteine und ihre Trypsin-Komplexe<sup>[4]</sup> und begann Studien zur Stöchiometrie der Enzym-Inhibitor-Assoziation<sup>[4, 7]</sup>. Seither sind durch moderne Ionenaustauschverfahren

[\*] Priv.-Doz. Dr. H. Tschesche  
Organisch-chemisches Laboratorium, Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität  
8 München 2, Arcisstraße 21

und die Affinitätschromatographie eine große Zahl von Proteinase-Inhibitoren aus den verschiedensten tierischen und pflanzlichen Geweben angereichert und/oder isoliert und charakterisiert worden.

Das allgemeine Interesse dürfte dabei weniger durch die verbesserten Methoden der Proteinchemie als durch die erweiterten Kenntnisse über die physiologische, pharmakologische und lebensmitteltechnologische Bedeutung der Proteininasen und ihre Funktionen im normalen und pathologischen Geschehen des menschlichen und tierischen Organismus stimuliert worden sein. Die Funktion proteolytischer Enzyme ist ja keinesfalls auf die Verwertung von Nahrungseiweiß beschränkt, sondern entscheidend bei der Mobilisierung von Gewebsproteinen, der Aktivierung von Proenzymen und der Freisetzung pharmakologisch hochaktiver Polypeptide wie der Kinine (Bradykinin, Angiotensin etc.) und Peptidhormone (Insulin etc.) beteiligt. Proteolytische Enzyme spielen ferner eine Rolle bei der Steuerung der Blutgerinnung und Fibrinolyse, bei Entzündungsvorgängen, immunbiologischen Prozessen und dem Befruchtungsvorgang.

Die natürlich vorkommenden Inhibitoren d. h. Inhibitoren mit Protein-Natur im Gegensatz zu niedermolekularen, synthetischen Inaktivatoren sind als natürliche Antagonisten der Proteininasen imstande, selektiv in das vielfältige Geschehen spezifischer proteolytischer Vorgänge im Organismus einzutreten.

In diesem Fortschrittsbericht sollen die für natürliche Inhibitoren der Endopeptid-Serinproteasen Peptidyl-Peptidhydrolasen erkannten molekularen und biologischen Prinzipien besprochen werden. Bezüglich vieler Einzelheiten sei auf die Literatur verwiesen (Übersichten über pharmakologische<sup>[8, 9]</sup>, ernährungsphysiologische<sup>[10-12]</sup>, molekulare<sup>[13-24]</sup> und kinetische Aspekte<sup>[18-24]</sup>).

Aus der Betrachtung ausgeklammert werden sollen Hemmstoffe, wie sie durch immunbiologische Reaktionen entstehen und denen Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen zugrunde liegen, ferner bakterielle Peptid-Inhibitoren aus *Penicillium*<sup>[25]</sup> und *Streptomyces*-Arten<sup>[26]</sup>, das inaktivierende Pepsinogenfragment<sup>[27]</sup> sowie Inhibitoren, die keine Proteine sind, wie das saure Polysaccharid Heparin<sup>[28]</sup> und Aminosäurepolykondensate<sup>[29]</sup>.

## 2. Vorkommen

Proteinase-Inhibitoren sind im Tier- und Pflanzenreich weit verbreitet. Sie wurden aus Samen von Leguminosen (*Soja*<sup>[5, 6]</sup> und *Limabohnen*<sup>[8, 30]</sup> und anderen Bohnen<sup>[8, 12]</sup>) und Getreide (Weizen<sup>[8, 12, 31]</sup> und Roggen<sup>[31]</sup>) sowie z. B. aus Kartoffeln<sup>[8, 12, 32]</sup>, Rüben<sup>[8]</sup>, Nüssen<sup>[8, 12, 33, 74]</sup>, Mais<sup>[8, 12, 33]</sup> und Erbsen<sup>[208]</sup> isoliert. Ihr Vorkommen ist jedoch nicht auf die Samen begrenzt<sup>[12, 34]</sup>. Kürzlich wurden auch aus Bakterien (*Streptomyces albogriseolus*<sup>[224]</sup> und *Neurospora crassa*<sup>[225]</sup>) Proteinase-Inhibitoren mit Proteinatur isoliert.

In Analogie zu den Pflanzensamen ist das Auftreten von Proteinase-Inhibitoren im Nahrungseiweiß (Eiklar) vieler Eier im Tierreich auffällig. So wurden Proteinase-Inhibitoren als Ovo inhibitoren (mit ca. 10% Kohlenhydraten) oder als Ovo-mucoide (mit ca. 25% Kohlenhydraten) im Eiklar von Hühnern<sup>[8, 17]</sup> und anderen Vogelarten<sup>[17, 35]</sup> sowie im Sekret der Albumindrüsen von Schnecken<sup>[36, 37]</sup> und anderen Mollusken<sup>[38]</sup> nachgewiesen.

Bei den tierischen Inhibitoren, deren natürliches Vorkommen weitaus eingehender untersucht ist, finden sich Hemmstoffe sowohl gewebsständig als auch in Sekreten von Organen. So wurde der Trypsin-Kallikrein-Inhibitor<sup>[1]</sup> aus Rinderorganen (Kunitz-Inhibitor oder auch Kallikrein-Inaktivator<sup>[39]</sup>) ausschließlich als intrazellulärer Bestandteil in Parotis, Leber, Lunge<sup>[8, 39]</sup> und Pankreas<sup>[4]</sup> gefunden. Der sekretorische Trypsin-Inhibitor (Kazal-Inhibitor<sup>[40]</sup>), der im Gegensatz zum Trypsin-Kallikrein-Inhibitor wahrscheinlich bei allen Säugetieren vorkommt<sup>[8, 41]</sup>, wird gleichfalls in der Pankreasdrüse gebildet, aber mit den Proenzymen in den Saft der Drüse extruiert<sup>[41, 42]</sup>. Ein großer Teil der tierischen Inhibitoren sind sekretorische Proteine wie die Trypsin-Inhibitoren des Säugetierpankreas<sup>[41-43]</sup>, des Blut<sup>[8, 46]</sup> und Seminalplasmas<sup>[8, 47, 48, 187]</sup>, der Milch und des Colostrums<sup>[13, 15, 16, 50, 77, 179]</sup>, der Submandibularisdrüsen<sup>[8, 202]</sup> und des Schneckenschleims<sup>[49]</sup>.

Zwischen gewebsständigen und sezernierten Inhibitoren können trotz der unterschiedlichen physiologischen Funktion durchaus genetische Verwandtschaften bestehen, wie sie für den Trypsin-Kallikrein-Inhibitor (Kunitz-Inhibitor) aus Rinderorganen (58 Aminosäuren, kohlenhydrat-frei; vgl. Abb. 5a, 6a, 11), den Colostrum-Inhibitor des Rindes (67 Aminosäuren mit Kohlenhydrat-Gehalt; Abb. 5b)<sup>[50]</sup> und den Isoinhibitor K aus Schnecken (*Helix pomatia*, 58 Aminosäuren, kohlenhydrat-frei; Abb. 5c)<sup>[214, 215]</sup>, die alle homologe Strukturen aufweisen, nachgewiesen wurden.

Die Molekulargewichte pflanzlicher und tierischer Inhibitoren liegen überwiegend im Bereich von 5000 bis 25000, können aber wie bei den Inhibitoren des menschlichen Blutplasmas, die zur Gruppe der  $\alpha$ -Globuline gehören, auch Größenordnungen von 54000 ( $\alpha_1$ -Antitrypsin), 69000 ( $\alpha_1$ -Antichymotrypsin) bis 160000 (Inter- $\alpha$ -Trypsin-Inhibitor) und in Sonderfällen wesentlich darüber liegen (725000 für  $\alpha_2$ -Makroglobulin)<sup>[46, 226]</sup>.

## 3. Allgemeine Eigenschaften

### 3.1. Inhibitor-Bestimmung

Aktivitäten und Konzentrationen von Proteinase-Inhibitoren werden heute überwiegend über ihre Komplexbildung mit den Enzymen bestimmt, wobei die Verminderung der Hydrolyse von natürlichen oder synthetischen Substraten mit enzymkinetischen Methoden gemessen wird<sup>[51]</sup>. Diese Methoden sind extrem empfindlich und gestatten den raschen Nachweis von Mikrogramm-Mengen an Inhibitoren. Für exakte Bestimmungen ist eine ausreichende Präinkubation von Enzym und Inhibitor zur Einstellung des Hemm-Gleichgewichtes erforderlich. Bei Verwendung spezifischer Enzyme als Substrate lassen sich Inhibitorkonzentrationen auch in rohen Gewebsextrakten bestimmen, vorausgesetzt, daß hohe Assoziationskonstanten ( $K_{AS} \approx 10^6 - 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ) für Enzym und Inhibitor vorliegen oder die genaue Enzymkonzentration bekannt ist. Die Schwierigkeit, daß für exakte Bestimmungen mit kinetischen Methoden Enzyme hoher Reinheit erforderlich sind, läßt sich durch Anwendung der „active site“-Titration reagentien von *Chase* und *Shaw*<sup>[5, 3]</sup> sowie *Kezdy* und *Kaiser*<sup>[52]</sup> umgehen, da hierbei nur aktive Enzymmoleküle bestimmt werden. Für zuverlässige Werte der spezifischen Hemm-Aktivität sollten die Messungen

[\*] Kallikrein<sup>®</sup> ist ein eingetragenes Warenzeichen der Bayer AG, Leverkusen.

bei etwa 50-proz. Hemmung des Enzyms erfolgen, vorausgesetzt, daß die Hemmung wenigstens bis in diesen Bereich stöchiometrisch verläuft.

Neben den enzymatischen Methoden sind Verfahren entwickelt worden, die auf der Änderung physikalisch-chemischer Parameter bei der Komplexbildung beruhen (Zusammenstellung s. [19]).

### 3.2. Spezielle Isolierungsverfahren

Proteinase-Inhibitoren, insbesondere die große Zahl der niedermolekularen Proteine, weisen meist eine außergewöhnliche Widerstandsfähigkeit gegen Säure- und Hitzenaturierung auf. Diese bemerkenswerten Eigenschaften sind schon von Kunitz<sup>[4]</sup> zur Fällung und Abtrennung von Begleitproteinen während der Reindarstellung ausgenutzt worden. Sie gestatten insbesondere die Zerlegung von Enzym-Inhibitor-Komplexen unter irreversibler Inaktivierung und Fällung der Proteinase. Damit eröffnet sich ferner die Möglichkeit zur Abtrennung von Inhibitoren über ihre Enzym-Inhibitor-Komplexe, die anschließend wieder zerlegt werden. Durch Molekularsiebfiltration an Gelen lassen sich sowohl die freien Inhibitoren als auch ihre Komplexe reinigen, da letztere bei den in der Regel hohen Assoziationskonstanten unter den Bedingungen einer Gelauschlüß-Chromatographie in neutraler Lösung undissoziiert wandern, bei niedrigem pH-Wert oder in Harnstofflösungen aber auf der Säule vom Enzym abgetrennt werden können. Die Stabilität des Komplexes von Enzym und Inhibitor macht die Affinitätschromatographie unter Einsatz trägergebundener Enzyme<sup>[54-59]</sup> zu einem nahezu idealen Reinigungsverfahren bei der Inhibitor-Isolierung<sup>[55]</sup>. Aus wenig vorgereinigten Gewebs- und Pflanzenextrakten sowie direkt aus Organflüssigkeiten konnten Fritz, Hochstrasser und Werle eine Reihe von Proteinase-Inhibitoren aus Pankreas<sup>[43, 55]</sup>, Mais und Roggen<sup>[56, 60]</sup> sowie Samenblasen<sup>[55, 57]</sup> und Humanspermoplasma<sup>[61]</sup> erstmals isolieren. An geeigneten Enzymharz-Säulen lassen sich auch mehrere Inhibitoren mit unterschiedlichen Spezifitäten trennen<sup>[57]</sup>. Der wiederholten Verwendung der Enzymharze steht dabei nichts entgegen; in unserem Laboratorium wurden Trypsinharze für Isolierungszwecke über ein Jahr wiederverwendet. Eine Nachreinigung der Präparate durch Ionenaustausch-Chromatographie ist in den meisten Fällen unerlässlich, da viele Extrakte, insbesondere aus pflanzlichem Material, mehrere Inhibitoren<sup>[8]</sup> oder Isoinhibitoren<sup>[38, 62, 63]</sup> enthalten. Ferner kann durch das aktive Enzym im Verlauf der Isolierung eine partielle Proteolyse des „reaktiven

zen Zentrums“<sup>[64]</sup> und wie bei den temporären Inhibitoren des Säugetierpankreas eine Modifizierung durch proteolytische Spaltung weiterer Peptidbindungen eintreten<sup>[65, 66]</sup>. Die Inhibitor-Isolierung unter Anwendung „klassischer“ Verfahren der Proteinchemie in Gegenwart von chemischen Enzym-Inaktivatoren wie Diisopropylfluorophosphat (DFP), Benzamidin oder Sulfonylfluoriden vermeidet diese Gefahren und wurde insbesondere bei der Isolierung der Pankreas-Inhibitoren direkt aus dem Sekret der Bauchspeicheldrüse von Greene, Rigby und Fackre mit Erfolg angewendet<sup>[42, 44, 45]</sup>.

## 4. Hemmverhalten

### 4.1. Charakter der Hemmung

Die Hemmung der esterolytischen und proteolytischen Aktivitäten der Endopeptidasen wird durch eine substratähnliche Einlagerung der Inhibitoren in das aktive Zentrum des Enzyms bewirkt. Der kompetitive (oder pseudokompetitive) Charakter der Hemmung der Enzyme durch Inhibitoren mit Proteinnatur, synthetische Hemmstoffe und spezifische Substrate konnte zur Genüge demonstriert werden<sup>[6-7, 70]</sup>.

Auf eine nicht-kompetitive Hemmung ist gelegentlich aus Lineweaver-Burk-Diagrammen geschlossen worden. Es ergeben sich nicht-kompetitive Hemmungen, wenn  $1/K_m$  für das Substrat sehr viel kleiner ist als  $K_{ass}$ <sup>[71]</sup> oder wenn die Gleichgewichtseinstellung infolge zu langsamer Dissoziation der Enzym-Inhibitor-Komplexe (nach der üblichen Vorinkubation) innerhalb der Meßzeiten nicht erreicht wird<sup>[19]</sup>.

### 4.2. Zeitlicher Verlauf der Hemmung

Während die Mehrzahl der niedermolekularen Inhibitoren wie z.B. die aus Ascaris<sup>[20, 21, 72]</sup>, Rinderorganen<sup>[8, 13, 21, 24]</sup>, Seeanemonen<sup>[62]</sup>, Schnecken<sup>[63]</sup>, Egeln<sup>[73]</sup> u.a. oder die aus Pflanzen wie Soja<sup>[5, 6, 18-21]</sup> und Limabohnen<sup>[8, 30]</sup>, Nüssen<sup>[33, 74]</sup>, Mais<sup>[33]</sup>, Kartoffeln<sup>[8, 12, 32]</sup> u.a. eine permanente Hemmung (Abb. 1a) der proteolytischen Aktivität bewirken, ist die Hemmung bei einigen Inhibitoren zeitlich begrenzt. Dieses zuerst von Gorini und Audrain<sup>[75]</sup> an Ovomucoid aus Hühnereiklar beobachtete Phänomen wurde von Laskowski, Sr. und Wu<sup>[76]</sup> auch beim sekretorischen Rinder-Inhibitor (Kazal-Inhibitor) gefunden und als „temporäre Hemmung“ bezeichnet (Abb. 1b). Die Ursachen dieses unterschiedlichen Verhaltens liegen in der unterschiedlichen Stabilität der Inhibi-

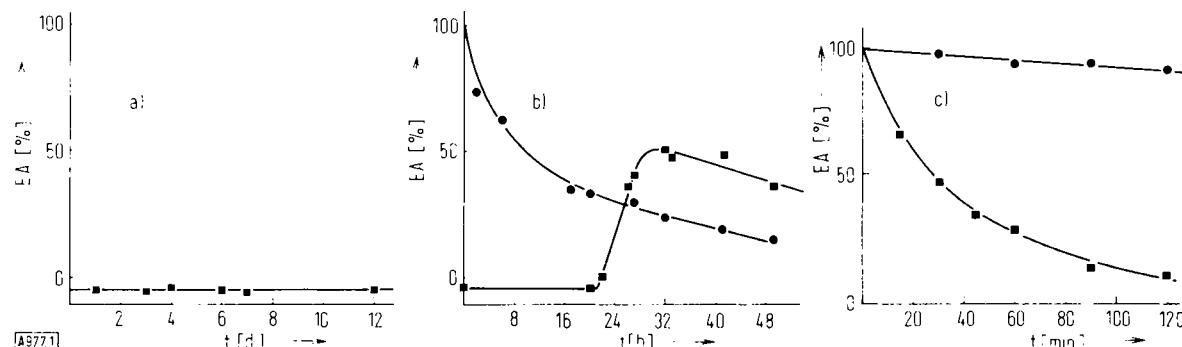


Abb. 1. a) Permanente Hemmung von Rindertrypsin durch den Trypsin-Kallikrein-Inhibitor (Kunitz-Inhibitor) vom Rind. b) Temporäre Hemmung von Schweinetrypsin durch den sekretorischen Trypsin-Inhibitor 1 (Kazal-Typ) aus Schweinepankreas bei anfänglichem Inhibitor-Überschuß. c) Progressive Hemmung von menschlichem Plasmin durch menschliches  $\alpha_1$ -Antitrypsin [46]. (●, ■): Enzym-Aktivität der Enzym-Inhibitor-Lösung; (○, □): Enzym-Aktivität der Enzym-Lösung im Verlauf der Autolyse. EA = Enzym-Aktivität, t = Inkubationszeit.

toren, die ja selbst Proteine sind, gegenüber dem proteolytischen Abbau durch die von ihnen anfänglich gehemmten Proteinasen<sup>[64, 65, 75-78]</sup>.

Neben der permanenten und temporären Hemmung wurde, insbesondere bei den Inhibitoren des (Human-)Blutplasmas, eine „progressive Hemmung“ beobachtet<sup>[46]</sup>. Unter den hochmolekularen Proteinase-Inhibitoren der  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Globulinfaktion findet man langsame und sofort reagierende „Antiplasmin“ und „Antithrombine“. Während der C1-Inaktivator (MG 104000) und  $\alpha_2$ -Makroglobulin (MG 725000) Plasmin sofort hemmen, ist die Inaktivierung durch  $\alpha_1$ -Antitrypsin eine langsame und zeitabhängige Reaktion (Abb. 1c)<sup>[46]</sup>. Gegenüber Kallikrein wirken jedoch auch  $\alpha_1$ -Antitrypsin und C1-Inaktivator (und  $\alpha_2$ -Makroglobulin) als progressive Inhibitoren<sup>[79, 80]</sup>. Die Inaktivierungsgeschwindigkeit erhöht sich mit steigender Temperatur, so daß Konformationsumwandlungen am Inhibitor-Molekül als Ursache dieses Verhaltens in Frage kommen. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei der Hemmung von Thrombin durch  $\alpha_2$ -Makroglobulin und Antithrombin III gemacht<sup>[46]</sup>.

#### 4.3. Assoziationskonstanten $K_{AS}$

Die Konstanten der Assoziation von Enzym (E) und Inhibitor (I) zum Komplex (C) nach der vereinfachten Gleichung (s. Abschnitt 6.1)  $E+I \rightleftharpoons C$  sind relativ schwer zu messen und liegen viel höher als die der besten Substrate, in der Regel bei  $10^7$  bis  $10^{14}$  l/mol, was einer freien Bindungsenergie von 10 bis 15 kcal/mol entspricht<sup>[67, 71]</sup>. Voraussetzung für verläss-

liche Werte ist die Erreichung des thermodynamischen Gleichgewichts der Komplexbildung<sup>[71]</sup> und eine Assoziationskonstante größer als  $10^8$  l/mol, wie sie i.a. vorliegt (weitere Verfahren zur Bestimmung der Assoziationskonstanten siehe<sup>[19, 81-85]</sup>).

Mit den gleichen Verfahren kann auch die pH-Abhängigkeit der Assoziationskonstanten bestimmt werden. Sie zeigt im pH-Bereich von 2-6 eine Änderung um 7 Zehnerpotenzen (!), während sie sich von pH=6-8 nur etwa um den Faktor 10 ändert (Abb. 2). Die enorm erhöhte Dissoziation der Komplexe bei niedrigen pH-Werten bietet daher ideale Voraussetzungen für die Anwendung der Affinitätschromatographie bei Isolierungsprozessen.

### 5. Reaktives Zentrum

#### 5.1. Reaktives Zentrum – Definition

Als reaktives Zentrum der Inhibitoren wird die Stelle des Moleküls bezeichnet, die bei der Bildung des Enzym-Inhibitor-Komplexes in direkten molekularen Kontakt mit dem aktiven Zentrum des Enzyms tritt. Die für die substratähnliche Einlagerung in die Spezifitätstasche des Enzyms verantwortliche Aminosäureseitenkette stammt vom „reaktiven Aminosäurerest“  $P_1$ ; dabei wurde die Schreibweise von Berger und Schechter für das reaktive Zentrum von Proteinase-Inhibitoren zugrunde gelegt<sup>[86, 87]</sup>:

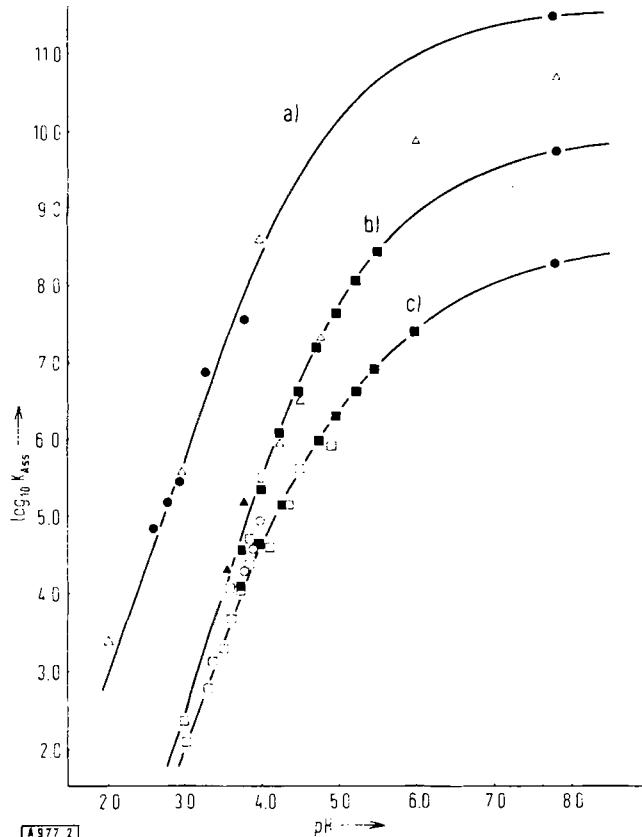
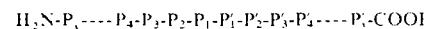


Abb. 2. pH-Abhängigkeit der Assoziationskonstanten  $K_{AS}$  für die Assoziation von a) Rindertrypsin mit dem Trypsin-Kallikrein-Inhibitor (Kunitz-Inhibitor), b) mit dem Sojabohnen-Inhibitor (Kunitz), c) mit Hühnerovomucoid, erhalten durch folgende Meßverfahren: ■ potentiometrisch, ○ Lichtstreuung, ▲ Gelchromatographie, ▲ Sedimentation, ● enzymatische Restaktivität, ○ Fluoreszenz [19].

Die Inhibitoren des Enzyms Trypsin und der bezüglich ihrer Spaltungsspezifität ähnlichen Enzyme Plasmin, Kallikrein, Akrosin und Cocoonase der Seidenraupe weisen Arginin<sup>[17-19, 48, 62, 63, 89, 90]</sup> oder Lysin<sup>[17-19, 64, 88-90]</sup> als „reaktiven Aminosäurerest“  $P_1$  auf, während für den Rest  $P_1'$  die Aminosäuren Alanin, Leucin, Isoleucin oder Serin gefunden wurden. Bei Ersatz von Arginin durch Lysin (oder umgekehrt) bleibt die Aktivität und Spezifität der Inhibitoren erhalten, wie aus der Homologie der Sequenzen im reaktiven Zentrum der sekretorischen Pankreas-Inhibitoren von Rind<sup>[91]</sup>, Schaf<sup>[33, 92]</sup> (Arginin-Inhibitoren) und Schwein<sup>[92]</sup> (Lysin-Inhibitoren) sowie aus den Ergebnissen der „enzymatischen Austauschreaktion“ am Sojabohnen-Inhibitor<sup>[19, 93]</sup> (s. Abschnitt 6.3) und dem Auftreten sowohl von Arginin als auch von Lysin bei den Isoinhibitoren der Schnecke<sup>[94]</sup>, des Tintenfisches<sup>[138]</sup> und der Gartenbohne<sup>[210]</sup> hervorgeht. Bei allen bisher in ihrer kovalenten Struktur aufgeklärten Trypsin-Inhibitoren (s. Abschnitt 8.2) liegt das reaktive Zentrum  $P_1-P_1'$  in einem über eine Disulfidbrücke geschlossenen Ring („loop“), wie Ozawa und Laskowski, Jr.<sup>[88]</sup> postuliert hatten. Damit werden diese Inhibitoren zu „cyclischen Substraten“.

In Analogie zu den Trypsin-Inhibitoren wären für Chymotrypsin-Hemmstoffe entsprechend der Spezifität dieses Enzyms die Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin oder Leucin als Reste  $P_1$  zu erwarten. Bei den Chymotrypsin-Inhibitoren aus Sojabohnen (Bowman-Birk)<sup>[74, 128, 228-230]</sup> und aus Limabohnen<sup>[30]</sup> wurde Leucin im reaktiven Zentrum gefunden. Eine entsprechende Spezifitätsänderung als Folge eines Lys $\leftrightarrow$ Leu-Austausches wurde für beide Inhibitoren wahrscheinlich gemacht, nachdem entsprechende homologe Sequenzbereiche gefunden wurden (s. Abschnitt 8.1). Diese Mutati-

tion scheint eine hinreichende, aber keineswegs in allen Fällen notwendige Voraussetzung für die Spezifitätsänderung zu sein, da die Assoziation und Hemmung von Chymotrypsin auch für tryptische „reaktive Zentren“ nachgewiesen wurde<sup>[95, 96]</sup>.

In einer enzymatischen Austauschreaktion (s. Abschnitt 6.3) gelang *Leary* und *Laskowski, Jr.*<sup>[211, 212]</sup> die Substitution von Arg<sup>63</sup> durch Trp<sup>63</sup> im reaktiven Zentrum des Sojabohnen-Inhibitors (Kunitz) und damit die Änderung von tryptischer zu chymotryptischer Spezifität.

## 5.2. Partialproteolyse

*Laskowski, Jr.* et al.<sup>[18, 19]</sup> demonstrierten in einer Reihe eleganter Versuche am Sojabohnen-Inhibitor (Kunitz), daß die Peptidbindung -P<sub>1</sub>-P'<sub>1</sub>- im reaktiven Zentrum im Verlauf der Hemmung ähnlich wie bei einer Substrathydrolyse partiell gespalten werden kann. „Partiell“ bedeutet hier, daß nur ein Teil der Bindungen -P<sub>1</sub>-P'<sub>1</sub>- hydrolytisch geöffnet wird. Die Proteolyse am reaktiven Zentrum des nativen Inhibitors mit einsträngiger Polypeptidkette (I, -P<sub>1</sub>-P'<sub>1</sub>- intakt) überführt das Protein in einen modifizierten Inhibitor (I\*, -P-COO<sup>⊖</sup> H<sub>3</sub>N<sup>⊕</sup>-P'-hydrolysiert). Nativer und modifizierter Inhibitor weisen gleiche Aktivität und Spezifität als Hemmstoffe und ähnliche Assoziationskonstanten auf<sup>[97]</sup>. Der modifizierenden Partialproteolyse liegt die Ausbildung eines stationären thermodynamischen Gleichgewichtes zugrunde, dessen Einstellung schon durch katalytische Mengen an Enzym (Trypsin<sup>[97]</sup> oder Chymotrypsin<sup>[96]</sup>) bewirkt werden kann. Nativer und modifizierter Inhibitor reagieren mit dem Enzym zum gleichen stabilen Enzym-Inhibitor-Komplex C<sup>[98, 99]</sup>, welcher wiederum entweder zu freiem Enzym und nativem Inhibitor oder zu freiem Enzym und modifiziertem Inhibitor dissoziieren kann. Die Reversibilität des Gleichgewichtes, d. h. die Resynthese der Peptidbindung -P<sub>1</sub>-P'<sub>1</sub>- im reaktiven Zentrum des modifizierten Sojabohnen-Inhibitors unter Bildung von nativem Inhibitor durch katalytische Mengen an Enzym (2 Mol-%), wiesen *Niekamp, Hixson, Jr.* und *Laskowski, Jr.*<sup>[99]</sup> nach (s. Abschnitt 6.3).

Die Gleichgewichtskonstante  $K_{Hd} = [I^*]/[I]$  für das stationäre Gleichgewicht zwischen nativem und modifiziertem Inhibitor ist stark pH-abhängig (Abb. 3) mit einem Minimum bei pH=6-7 und hohen Werten für die Spaltung der Peptidbindung -P<sub>1</sub>-P'<sub>1</sub>- in sauren Lösungen bei pH=3-4<sup>[18]</sup>. Sie verläuft damit als spezielle „Substrat“-Hydrolyse bei sehr unphysiologischem pH-Wert, bei dem normale Proteine nicht gespalten werden.

Die Partialproteolyse wurde bei einer Reihe von Proteinase-Inhibitoren aufgezeigt<sup>[18, 19, 33, 48, 64, 74, 96, 98, 100, 101, 232-234]</sup> und zur Ermittlung der reaktiven Zentren eingesetzt. Das Ausmaß der Hydrolyse wurde durch analytische Polyacrylamidgel-Elektrophorese<sup>[99]</sup> oder durch Abspaltung des neuen C-terminalen, basischen Restes P<sub>1</sub> mit Carboxypeptidase B<sup>[88, 100]</sup> oder durch Edman-Abbau und quantitative massenspektrometrische Bestimmung des neuen N-terminalen Restes P'<sub>1</sub><sup>[101]</sup> ermittelt, wenngleich die Reversibilität der Proteolyse in den wenigsten Fällen nachgewiesen wurde. Das thermodynamische Gleichgewicht kann, wie beim Sojabohnen-Inhibitor (Kunitz) mit 86 % modifiziertem Inhibitor, weit auf der Seite der offenen Peptidbindung, aber auch überwiegend auf der Seite des nativen Inhibitors wie bei den sekretorischen Pankreas-Inhibitoren mit ca. 25 % Modifizierung liegen<sup>[233]</sup>.

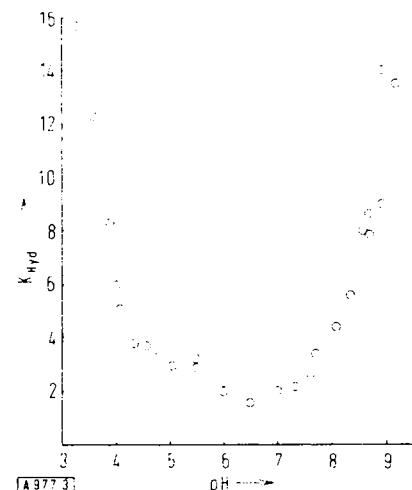


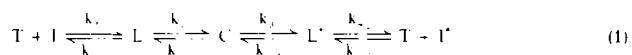
Abb. 3. pH-Abhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten  $K_{Hd} = [I^*]/[I]$  für das Gleichgewicht der Partialproteolyse von natürlichem (I) zu modifiziertem Sojabohnen-Inhibitor (Kunitz) (I\*) [19]. Verbesserte Daten wurden kürzlich vom gleichen Laboratorium publiziert [227].

Als Extremfall ist der Trypsin-Kallikrein-Inhibitor (Kunitz) aus Rinderorganen anzusehen, bei dem eine direkte Modifizierung durch Trypsin bisher nicht nachgewiesen werden konnte. Nach *Kress, Wilson* und *Laskowski, Sr.*<sup>[102]</sup> wird jedoch auch dieser Inhibitor nach selektiver Reduktion der Disulfidbrücke Cys<sup>14</sup>-Cys<sup>38</sup> am reaktiven Zentrum und an weiteren Peptidbindungen hydrolysiert (s. Abschnitt 10). Über den Umweg einer Reihe chemischer und enzymatischer Reaktionen konnten *Jering* und *Tschesche*<sup>[213]</sup> synthetisch auch einen nur am reaktiven Zentrum modifizierten Trypsin-Kallikrein-Inhibitor (Kunitz) darstellen, der auf direktem Wege durch Partialproteolyse mit Trypsin nicht zugänglich ist. Dieser synthetische, modifizierte Inhibitor ist gegenüber Trypsin aktiv und erleidet mit katalytischen Mengen Trypsin<sup>[213]</sup> und Chymotrypsin<sup>[234]</sup> eine vollständige Resynthese zu natürlichem („virgin“) Inhibitor.

## 6. Mechanismen

### 6.1. Mechanismus der Assoziation

Als Folge der Partialproteolyse entsteht aus dem nativen Inhibitor (I) ein modifiziertes Protein (I\*) mit noch voller biologischer Aktivität. Im Fall des von *Luthy, Praissman, Finkenstadt* und *Laskowski, Jr.*<sup>[97]</sup> eingehend studierten Systems β-Trypsin und Sojabohnen-Inhibitor (Kunitz) ergeben sich für den modifizierten Inhibitor (I\*) stark veränderte Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für die Komplexbildung ( $L^* \rightarrow C$ ). Für das thermodynamische Gleichgewicht der Assoziation von Trypsin (T) und dem Inhibitor (I oder I\*) ist daher im stationären Zustand auch die Komplexbildung von I\* zu berücksichtigen. Das Gesamtsystem wird daher durch Gl. (1) wiedergegeben<sup>[97]</sup>:



Gl. (1) gibt den formalen Minimalmechanismus wieder, bei dem L und L\* lose assoziierte, nicht „kovalente“ Enzym-Inhibitor-Komplexe (s. Abschnitt 8.4) darstellen. Die Existenz weiterer Zwischenstufen ist denkbar. Die Zwischenstufen L und L\* wurden nachgewiesen; für die Gleichgewichtskonstanten  $K_L = k_{-1}/k_1$  und  $K_{L^*} = k_4/k_{-4}$  wurden gleiche Werte wahrscheinlich gemacht<sup>[97]</sup>, während für die analogen Geschwindigkeitskonstanten  $k_2$  und  $k_{-3}$  sehr unterschiedliche Werte

bei sehr ähnlicher pH-Abhängigkeit gefunden wurden. Es ergab sich eine rasche Einstellung des vorgelagerten Gleichgewichts unter Ausbildung der Zwischenstufe L, wobei  $k_1 \gg k_2$  ist<sup>[97]</sup>.

Gl. (1) entspricht dem gewöhnlichen Mechanismus für die reversible Substrathydrolyse durch Serin-Hydrolasen mit dem einzigen formalen Unterschied, daß keine Dissoziation des Acylenzym-Komplexes unter Wiederfreisetzung des Enzym-Nucleophils erfolgt, da die Inhibitoren nur ein Reaktionsprodukt, den Komplex C, bilden.

Im Einklang mit diesem Zweistufenprozeß der Komplexbildung ist der konzentrationsabhängige Übergang der Reaktionsordnung von zweiter zu erster Ordnung<sup>[97]</sup>. Auf die vorgelagerte lose Anlagerung  $T + I \xrightarrow{k_1} L$ , eine wahrscheinlich diffusionskontrollierte Reaktion zweiter Ordnung, folgt die nicht diffusionskontrollierte Komplexbildung  $L \xrightarrow{k_2} C$  in einer Reaktion erster Ordnung. Die Unabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung für die Assoziation von Trypsin und Sojabohnen-Inhibitor (Kunitz) von der Lösungsmittelviskosität veranlaßte bereits Haynes und Feeney<sup>[89]</sup> zu der Schlußfolgerung, daß der Komplexbildung kein diffusionskontrollierter Prozeß zugrunde liegt.

Eine Reihe von Indizien spricht für die Allgemeingültigkeit des am System  $\beta$ -Trypsin und Sojabohnen-Inhibitor (Kunitz) erarbeiteten formalen Mechanismus. Eine vergleichende Untersuchung mit  $\alpha$ -Trypsin<sup>[97]</sup> ergab die gleiche Reaktionsgeschwindigkeitskonstante erster Ordnung  $k_2$  für die Reaktion  $L \rightarrow C$  wie für  $\beta$ -Trypsin. Die Assoziationskonstante des losen Michaelis-Komplexes L zwischen  $\alpha$ -Trypsin und nativem Inhibitor I ist jedoch um eine Größenordnung kleiner als die von  $\beta$ -Trypsin:  $K_{1,2} = 10 K_{1,\beta}$ . Dieses Ergebnis entspricht der geringeren Stabilität der Komplexe von  $\alpha$ -Trypsin mit Sojabohnen-Inhibitor (Kunitz)<sup>[103, 104]</sup>. Trypsin-Kallikrein-Inhibitor (Kunitz) aus Rinderorganen<sup>[104]</sup> und Hühnerovomucoid<sup>[105]</sup>. (Weitere kinetische Daten zur Enzym-Inhibitor-Assoziation finden sich in<sup>[150, 244-248]</sup>.)

## 6.2. Kinetisch kontrollierte Dissoziation

Bei allgemeiner Gültigkeit der Gl. (1) ergibt sich das gleiche Produkt, der stabile Enzym-Inhibitor-Komplex C, unabhängig von seiner Herstellung aus natürlichem oder modifiziertem Inhibitor und Enzym. Unter Bedingungen, unter denen eine plötzliche Dissoziation des Komplexes erzwungen wird (kinetisch kontrollierte Dissoziation) wie rasche pH-Umstellung auf  $\text{pH} = 2$ <sup>[98]</sup> oder Eintragen des Komplexes in 6 M Guanidiniumchlorid<sup>[93]</sup> in neutraler Lösung werden die Produkte allein von den relativen Werten der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten  $k_{-2}$  und  $k_3$  bestimmt werden und nicht durch die Lage des thermodynamischen Gleichgewichts zwischen natürlichem und modifiziertem Inhibitor. Da die Geschwindigkeitskonstanten für die Reaktion modifizierter Inhibitor (I\*)-nativer Inhibitor (I) im allgemeinen viel höher sind als für die Rückreaktion, läßt die kinetisch kontrollierte Dissoziation der Komplexe überwiegend nativen Inhibitor erwarten. Entsprechende Ergebnisse wurden für die kinetisch kontrollierte Dissoziation der Trypsin-Komplexe aus natürlichem und modifiziertem Sojabohnen-Inhibitor (Kunitz) von Finkenstadt und Laskowski, Jr.<sup>[98]</sup>, Sealock und Laskowski, Jr.<sup>[93]</sup> und für die Dissoziation des Trypsin-Komplexes aus trypsin-modifiziertem Bowman-Birk-Sojabohnen-Inhibitor sowie für

die Dissoziation des Chymotrypsin-Komplexes aus chymotrypsin-modifiziertem Bowman-Birk-Sojabohnen-Inhibitor von Frattali und Steiner<sup>[106]</sup> erhalten. In allen Fällen wurde überwiegend nativer Inhibitor gefunden, obwohl das Gleichgewicht in beiden Fällen überwiegend auf der Seite des modifizierten Inhibitors liegt.

Die Resynthese der gespaltenen Peptidbindung -P<sub>1</sub>-P'<sub>1</sub>- im modifizierten Inhibitor durch Komplexbildung mit anschließender kinetisch kontrollierter Komplexdissoziation zeigt, daß für diese Systeme die Beziehung  $k_{-2} \gg k_3$  gilt. Daraus folgt ferner, daß die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten  $K_D = k_{-2} + k_3 \approx k_{-2}$  etwa der Komplexdissoziationskonstanten  $k_{-2}$  entsprechen muß.

Es ist einleuchtend, daß die kinetisch kontrollierte Resynthese der gespaltenen Peptidbindung -P<sub>1</sub>-P'<sub>1</sub>- im modifizierten Inhibitor z. Z. der beste Nachweis für das reaktive Zentrum des Inhibitors ist.

## 6.3. Enzymatische Austauschreaktion

Durch geschickte Kombination und unter Ausnutzung der durch die thermodynamischen und kinetischen Konstanten gegebenen Verhältnisse gelang Sealock und Laskowski, Jr.<sup>[93]</sup> in einer Folge enzymatischer Reaktionen der Austausch des reaktiven Aminosäurerestes Arginin-63 im Sojabohnen-Inhibitor (Kunitz) durch Lysin und damit der an homologen Inhibitoren bereits wahrscheinlich gemachte Nachweis der prinzipiellen Gleichwertigkeit von Arginin und Lysin als Aminosäurereste P<sub>1</sub> im reaktiven Zentrum von Trypsin-Inhibitoren. Entsprechend der schematischen Darstellung (Abb. 4) wird modifizierter Sojabohnen-Inhibitor (Peptidbindung Arg<sup>63</sup>-Ile<sup>64</sup> offen) (S\*) mit Carboxypeptidase B unter Verlust der inhibitorischen Aktivität in des-Arg<sup>63</sup>-modifizierten Inhibitor (S\*) übergeführt. Bei der anschließenden Inkubation mit überschüssigem Lysin und Carboxypeptidase B [Gl. (2)] wird die thermodynamisch ungünstige Reaktion des enzymatischen Lysin-Einbaues mit der thermodynamisch sehr begünstigten Komplexbildung von wieder aktivem Lys<sup>63</sup>-modifiziertem Inhibitor (S\*) [Gl. (3)] gekoppelt. Da der des-Arg<sup>63</sup>-modifizierte

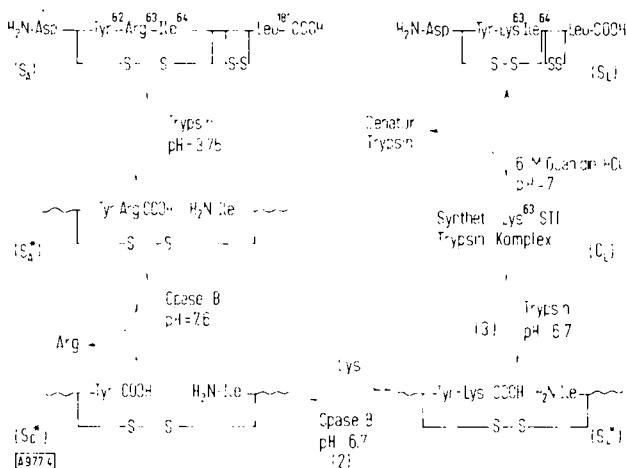
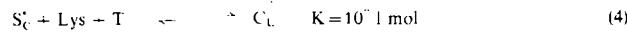
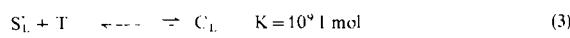
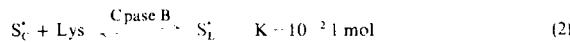


Abb. 4. Reaktionsschritte im Verlauf der „enzymatischen Austauschreaktion“. Die relative Größe der Pfeile kennzeichnet qualitativ die Lage der Gleichgewichte[93]. CPase-B-Carboxypeptidase: S<sub>1</sub> = Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor; S<sub>2</sub> = nativer Sojabohnen-Inhibitor (Kunitz); S\* = modifizierter Inhibitor; S\*\* = des-Arg<sup>63</sup>-modifizierter Inhibitor; S\*\*\* = modifizierter, synthetischer Lys<sup>63</sup>-Inhibitor; C<sub>1</sub> = Trypsin-Komplex mit synthetischem Lys<sup>63</sup>-Inhibitor; S<sub>4</sub> = intakter, synthetischer Lys<sup>63</sup>-Inhibitor.

Inhibitor ( $S^*$ ) keine starken Komplexe mit Trypsin bildet, kann die Kupplung beider Reaktionen und die Gleichgewichtsverschiebung erzwungen werden [Gl. (4)]. Der synthetische Lys<sup>63</sup>-Sojabohnen-Inhibitor wird in Form des Trypsin-Komplexes ( $C_L$ ) isoliert und der kinetisch kontrollierten Dissoziation unterworfen. Als Reaktionsprodukt wird „nativer“ Lys<sup>63</sup>-Inhibitor (Peptidbindung Lys<sup>63</sup>-Ile<sup>64</sup> intakt) ( $S_L$ ) isoliert<sup>[18, 19, 93].</sup>



Die Inkubation des synthetischen Lys<sup>63</sup>-Inhibitors mit katalytischen Mengen an Trypsin bei pH = 3.75 führte in *langsamer* Reaktion zu einem Inhibitor, der elektrophoretisch von modifiziertem authentischem Arg<sup>63</sup>-Inhibitor nicht zu unterscheiden war<sup>[19]</sup>. Damit scheinen gleiche Werte von  $K_{Hyd}$  für die Hydrolyse der Peptidbindung  $-P_1-P_1'$  im reaktiven Zentrum von Lys<sup>63</sup>- und Arg<sup>63</sup>-Inhibitor vorzuliegen; sie demonstrieren die thermodynamische Gleichwertigkeit von Arginin und Lysin. Die Geschwindigkeiten der Umsetzungen mit Trypsin sind jedoch nach Beobachtungen von *Sealock* und *Laskowski, Jr.*<sup>[19, 93]</sup> am Arg<sup>63</sup>- und Lys<sup>63</sup>-Sojabohnen-Inhibitor und von *Tschesche* und *Obermeier*<sup>[101]</sup> an homologen Lysin- und Arginin-Inhibitoren des Pankreas (Kazal-Typ) bei Lysin-Inhibitoren etwa um den Faktor 10 geringer.

Der enzymatische Arginin  $\leftrightarrow$  Lysin-Austausch führt zu homologen Proteinen, wie sie den Genprodukten nach einer Mutation des Arg<sup>63</sup>-DNA-Codons zum Lys<sup>63</sup>-DNA-Codon entsprechen würden. Die biologische Realisierung solcher Arginin  $\leftrightarrow$  Lysin- oder Lysin  $\leftrightarrow$  Arginin-Mutationen in reaktiven Zentren der Inhibitoren wurde bei der Sequenzierung der sekretorischen Pankreas-Inhibitoren (s. Abschnitt 8.1) aufgefunden und scheint nach den ersten Befunden auch bei den sekretorischen Iso-Inhibitoren der Schnecke<sup>[94]</sup> und der Gartenbohne<sup>[210]</sup> innerhalb einer Spezies aufzutreten. Um diese Analogie zwischen biologischer Mutation und enzymatischer Austauschreaktion drastisch zu betonen, prägte *Laskowski, Jr.* hierfür (mit allen Vorbehalten) den Terminus „enzymatische Mutation“<sup>[19]</sup>.

Das gleiche Reaktionsschema wurde von *Leary* und *Laskowski, Jr.*<sup>[211, 212]</sup> auch zum enzymatischen Austausch von Arg<sup>63</sup> gegen Trp<sup>63</sup> angewandt, indem des-Arg<sup>63</sup>-modifizierter Inhibitor ( $S^*$ ) mit überschüssigem Tryptophan und Carboxypeptidase A in Gegenwart von Chymotrypsin inkubiert wurde. Nach kinetisch kontrollierter Dissoziation des Chymotrypsin-Komplexes wurde neben des-Arg<sup>63</sup>-modifiziertem Inhibitor auch nativer Trp<sup>63</sup>-Sojabohnen-Inhibitor isoliert, der Chymotrypsin stark hemmt (s. Abschnitt 5.1).

## 7. Chemische Modifizierung

Chemische Modifizierungen an den reaktiven Seitenketten bifunktioneller Aminosäuren von Inhibitoren sind in großer Zahl zum Studium der Assoziation und zur Ermittlung des reaktiven Zentrums eingesetzt worden. Einige Beispiele sollen die Möglichkeiten dieser Methode erläutern (s. auch<sup>[19]</sup>). Die Entfernung der positiven Ladung von der Seitenkette des basischen Aminosäurerestes  $P_1$  im reaktiven Zentrum von Lysin-Inhibitoren durch Desaminierung inaktiviert den Tryp-

sin-Kallikrein-Inhibitor aus Rinderorganen, wie wir fanden, nicht<sup>[108]</sup>, im Gegensatz zu früheren Angaben<sup>[107]</sup>. Der reine Ladungsverlust ohne zusätzlichen sterischen Effekt schließt die ionische Wechselwirkung der Seitenkette mit der negativen Ladung von Asp<sup>189<sup>14</sup>] in der Spezifitätstasche des Trypsins<sup>[109]</sup> aus.</sup>

Sterische Effekte, wie die Verlängerung der Seitenkette des basischen Restes  $P_1$  (um ca. 1.5 Å), scheinen aber auch bei Erhaltung der positiven Ladung die Aktivität zu verringern, wie nach *Haynes* und *Feehey* aus der verminderten Aktivität einer Reihe von guanidinierten Lysin-Inhibitoren hervorgehen scheint<sup>[89]</sup>. Hierzu im Widerspruch stehen allerdings die Befunde von *Kassell* und *Chow*<sup>[110]</sup> über die Guanidinierung (und Amidinierung) des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors (Kunitz) aus Rinderorganen.

Eine kombinierte Seitenketten-Entladung und -Vergrößerung wird durch Acylierungsreagentien wie Maleinsäureanhydrid oder Citraconsäureanhydrid bei Lysin-Inhibitoren und durch Dicarbonylreagentien wie Butandion, Cyclohexandion oder Phenylglyoxal bei Arginin-Inhibitoren erreicht und führt zu ihrer Inaktivierung<sup>[89, 111]</sup>. Das Verfahren wurde von *Fritz* et al.<sup>[111]</sup> zur Klassifizierung einer großen Zahl von Inhibitoren in die Gruppen der Lysin- oder Arginin-Inhibitoren verwendet und hat sich zur raschen Orientierung allgemein bewährt. Mit dieser Methodik bestimmten *Kowalski* und *Laskowski, Jr.*<sup>[112]</sup> kürzlich auch die Konstante  $K_{Hyd} = [I^*]/[I]$  (s. Abschnitt 5.2) bei modifizierten Inhibitoren, da die Acylierung der neugebildeten  $\alpha$ -Aminogruppe am Rest  $P_1$  den modifizierten Sojabohnen-Inhibitor und wahrscheinlich modifizierte Proteinase-Inhibitoren allgemein inaktiviert. Die Anwendung dieses Verfahrens bei Lysin-Inhibitoren setzt allerdings deren vorherige Guanidinierung voraus.

Wie erstmals *Chauvet* und *Acher*<sup>[90]</sup> bei der Ermittlung des reaktiven Zentrums (Lys<sup>15</sup>-Ala<sup>16</sup>) des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors (Kunitz) durch Polyalanylierung mit dem *N*-Carboxyanhydrid von *D,L*-Alanin zeigten, lassen sich im Trypsin-Inhibitor-Komplex die Lysinreste 26, 41 und 46 mit Acylierungsmittern umsetzen, ohne daß der Komplex hierdurch zu Dissoziation gezwungen, der Lysinrest 15 ( $P_1$ ) gleichfalls partiell oder vollständig acyliert und/oder der wiedergewonnene substituierte Inhibitor desaktiviert wird. Unter Ausnutzung dieser hohen Komplexstabilität gelang es *Fritz*, *Schult*, *Meister* und *Werle*<sup>[113]</sup> sowie *Tschesche*, *Jering* und *Schorp*<sup>[114]</sup>, acylierte aktive oder reaktivierbare Derivate des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors (Kunitz) darzustellen, die bei gleicher biologischer Aktivität und Spezifität ein völlig verändertes physiologisches Verhalten im Kreislauf (Nierengängigkeit etc.!) sowie andere physikalisch-chemische Konstanten (Isolelektrischer Punkt u. a.) aufweisen.

Durch *o*-Nitrierung von Tyrosinresten in unmittelbarer Nachbarschaft zum reaktiven Zentrum  $-P_1-P_1'$  im freien Inhibitor und im Inhibitor, der im Komplex fixiert ist, läßt sich deren sterische Zugänglichkeit und damit ihre mögliche Maskierung ermitteln. Damit kann die Größe der Kontaktstelle abgeschätzt werden, insbesondere, wenn diese Ergebnisse durch spektrophotometrische Titrationen und pK-Wert-Bestimmungen

[\*] Die Aminosäuren im Trypsin wurden wie im Chymotrypsinogen A nummeriert; s. K. A. Walsh u. H. Neurath, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 52, 884 (1964); O. Mikes, V. Tomašek, V. Holeysorský u. F. Šorm, Biochim. Biophys. Acta 117, 281 (1966); B. S. Hartley u. D. N. Shotton in P. D. Boyer: *The Enzymes*. Academic Press, New York 1971, Bd. 3, 3. Aufl., S. 323.

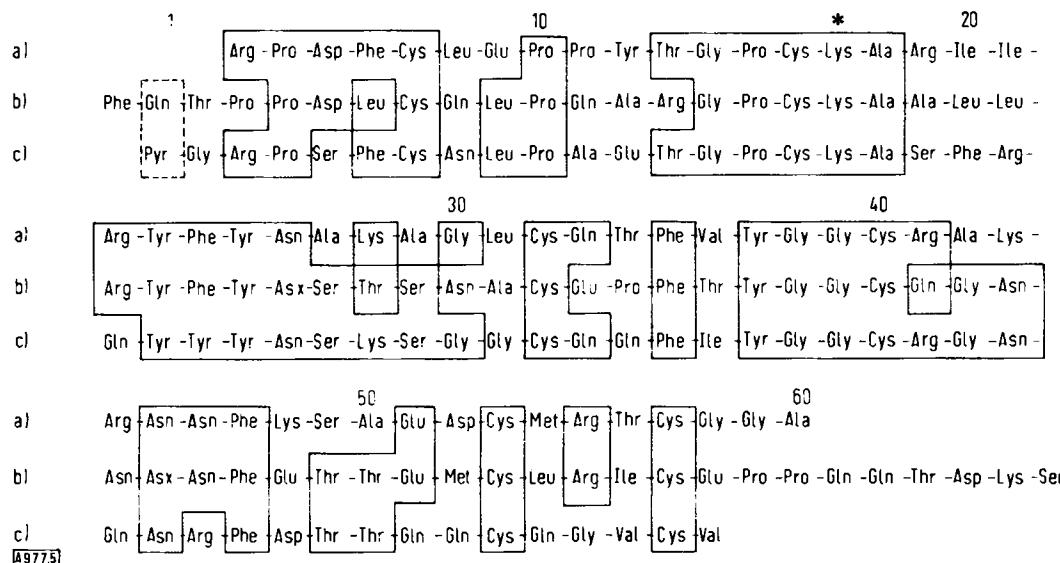
gen der entsprechenden  $\alpha$ -Nitrotyrosine für den freien und den im Komplex gebundenen Inhibitor ergänzt werden<sup>[92, 103]</sup>. Da die Kontaktstelle im allgemeinen nur wenige Aminosäurereste des reaktiven Zentrums umfaßt, wird verständlich, daß die biologische Aktivität durch Entfernung einiger Reste vom N-Terminus nicht beeinflußt wird, solange dadurch nicht die Reststruktur verändert oder das reaktive Zentrum direkt abgebaut wird. Guanidinierter Trypsin-Kallikrein-Inhibitor (Kunitz) ist nach *Kassell* und *Chow*<sup>[110]</sup> nach Edman-Abbau des N-terminalen Tripeptids voll aktiv. Das gleiche gilt für den sekretorischen Pankreas-Inhibitor I vom Schwein, dessen Aktivität nach Abspaltung des N-terminalen Tetrapeptids<sup>[44, 45, 115]</sup> oder Pentapeptids<sup>[66]</sup> nicht verloren geht.

## 8. Struktur der Proteinase-Inhibitoren

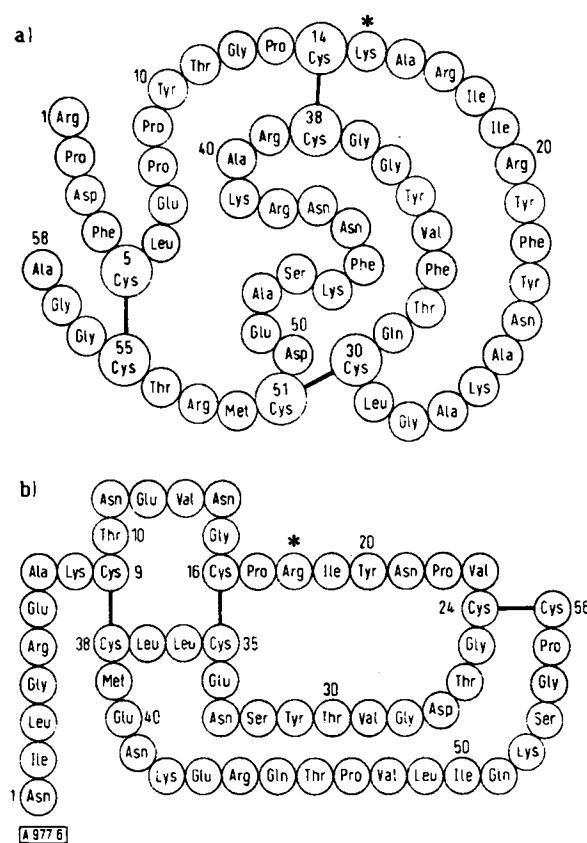
### 8.1. Aminosäuresequenzen und Homologien

Die Aufklärung der Primärstruktur des therapeutisch besonders interessanten Trypsin-Kallikrein-Inhibitors (Kunitz) aus Rinderorganen (Abb. 5a) erfolgte durch *Kassell* und *Laskowski, Sr.*<sup>[116]</sup> und wurde von *Chauvet* und *Acher*<sup>[117]</sup>, von *DLouhá, Pospíšilová, Meloun* und *Šorm*<sup>[118]</sup> sowie von *Anderer* und *Hörnle*<sup>[119]</sup> (Kallikrein-Inaktivator<sup>[39]</sup> aus Rinderlunge mit Asn<sup>50</sup> anstelle von Asp<sup>50</sup>) bestätigt.

Bemerkenswert ist die über 40-proz. Homologie zum Rindercolostrum-Inhibitor, dessen Sequenz *Čechová, Jonáková* und *Šorm*<sup>[50]</sup> aufklärten (Abb. 5b); er enthält zusätzlich neun Aminosäuren sowie einen Glykoproteinanteil. Die Gene beider Inhibitoren weisen offensichtlich einen gemeinsamen phylogenetischen Ursprung auf, obwohl der Colostrum-Inhibitor als sekretorisches Protein anzusehen ist, der homologe Trypsin-Kallikrein-Inhibitor jedoch nur gewebsständig intrazellulär vorkommt und in vielen Rinderorganen gefunden wurde. Während Colostrum-Inhibitoren wahrscheinlich bei vielen Säugetieren vorkommen und sich bisher beim Rind und Schwein<sup>[77, 179]</sup> nachweisen ließen, wurde der Trypsin-Kallikrein-Inhibitor bisher nur bei einer begrenzten Zahl von Wiederkäuern (Rind und Schaf) gefunden.



Von *Tschesche* und *Dietl*<sup>[214, 215]</sup> wurde die Aminosäuresequenz des Isoinhibitors K aus der Weinbergschnecke (*Helix pomatia*, Abb. 5c) aufgeklärt, der überraschenderweise



5	10	15	*	20	25
a) Thr - Ser - Pro - Gln	Arg - Glu - Ala	Thr	Cys - Thr	Ser	Glu - Val
b) Asn - Ile - Leu - Gly	Arg - Glu - Ala	Lys	Cys - Thr	Asn	Glu - Val
30	35	40	45	50	55
a) Ile - Thr	Tyr	Ser	Asn - Glu - Cys	Val	Leu - Cys
b) Val - Thr	Tyr	Ala	Asn - Glu - Cys	Leu	Leu - Cys

A 977.7

Abb. 7. Homologie in den Aminosäuresequenzen der sekretorischen Pankreas-Inhibitoren a) vom Schwein (Inhibitor I) und b) vom Schaf [92]. Das Sternchen kennzeichnet das reaktive Zentrum. Der Inhibitor vom Schaf erwies sich in der Aminosäuresequenz als identisch mit dem Rinderinhibitor [91] (Abb. 6 b) bis auf Ala<sup>32</sup>, dem Ser beim Rind entspricht. Ähnlich weitgehende Homologien zeigen nach Greene und Bartelt [238] auch der menschliche Inhibitor.

den gleichen Grad an Homologie mit dem Trypsin-Kallikrein-Inhibitor (Kunitz) des Rindes aufweist wie der Rindercolostrum-Inhibitor. Diese Übereinstimmung trotz der großen phylogenetischen Entfernung von Rind und Schnecke spricht für ein gemeinsames Ursprungsgen dieser Inhibitoren mit besonders breiter Spezifität.

Es ist ferner bemerkenswert, daß der Trypsin-Kallikrein-Inhibitor vom Rind (Abb. 6 a) keinerlei Homologie mit dem sekretorischen Rinderpankreas-Inhibitor (Kazal) aufweist (Abb. 6 b), dessen Sequenz Greene, Giordano und Bartelt<sup>[91]</sup> aufklärten. Diese Tatsache unterstreicht die generellen Unterschiede in der physiologischen Funktion beider Inhibitoren, die sich auch in unterschiedlichen Spezifitäten, im Hemmverhalten und den Orten ihrer zellulären Biosynthese widerspiegeln. Die Primärstrukturen der Pankreas-Inhibitoren vom Schwein (I, Abb. 7 a, und II) wurden von Tschesche und Wachter<sup>[45, 115, 120]</sup> aufgeklärt und von Bartelt und Greene<sup>[121]</sup> bestätigt. Hochstrasser und Werle et al.<sup>[33, 122]</sup> sowie Tschesche und Obermeier<sup>[92]</sup> ermittelten die Sequenz des Inhibitors vom Schaf (Abb. 7 b). Ein Vergleich aller bisher aufgeklärten Strukturen ermöglicht eine erste Übersicht über die invarianten und die durch den Austausch einzelner Aminosäuren variablen Sequenzbereiche. Der hohen Variabilität am N-Terminus entspricht die Unwichtigkeit dieses Sequenzstückes für die biolo-

gische Aktivität<sup>[44, 45, 66, 92, 123]</sup> und für die richtige Faltung und Renaturierung nach Reduktion und Reoxidation<sup>[125]</sup>. Die bemerkenswerte Arg<sup>18</sup> ↔ Lys<sup>18</sup>-Mutation im reaktiven Zentrum für den Rest P<sub>1</sub> wurde bereits erwähnt (s. Abschnitt 5.1); sonst ist in diesem Bereich (Reste 15–28) und im C-terminalen Teil (Reste 44–56) kein Aminosäureaustausch zu beobachten.

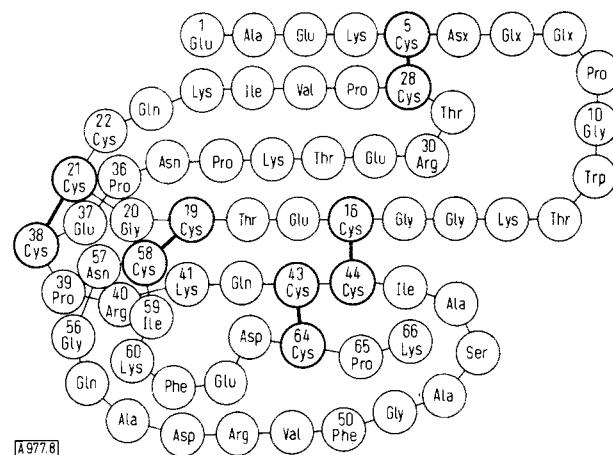


Abb. 8. Vollständige kovalente Struktur des Inhibitors aus *Ascaris lumbricoides* nach Induni [137].

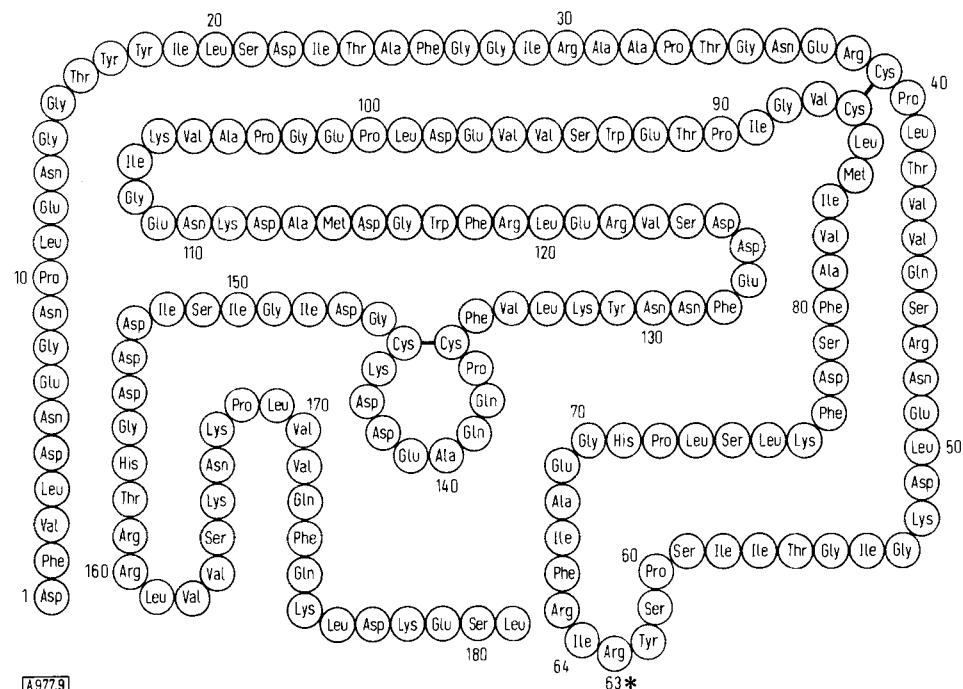


Abb. 9. Vollständige kovalente Struktur des Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitors aus Sojabohnen (Kunitz) [126, 240, 241]. Das Sternchen kennzeichnet das reaktive Zentrum.

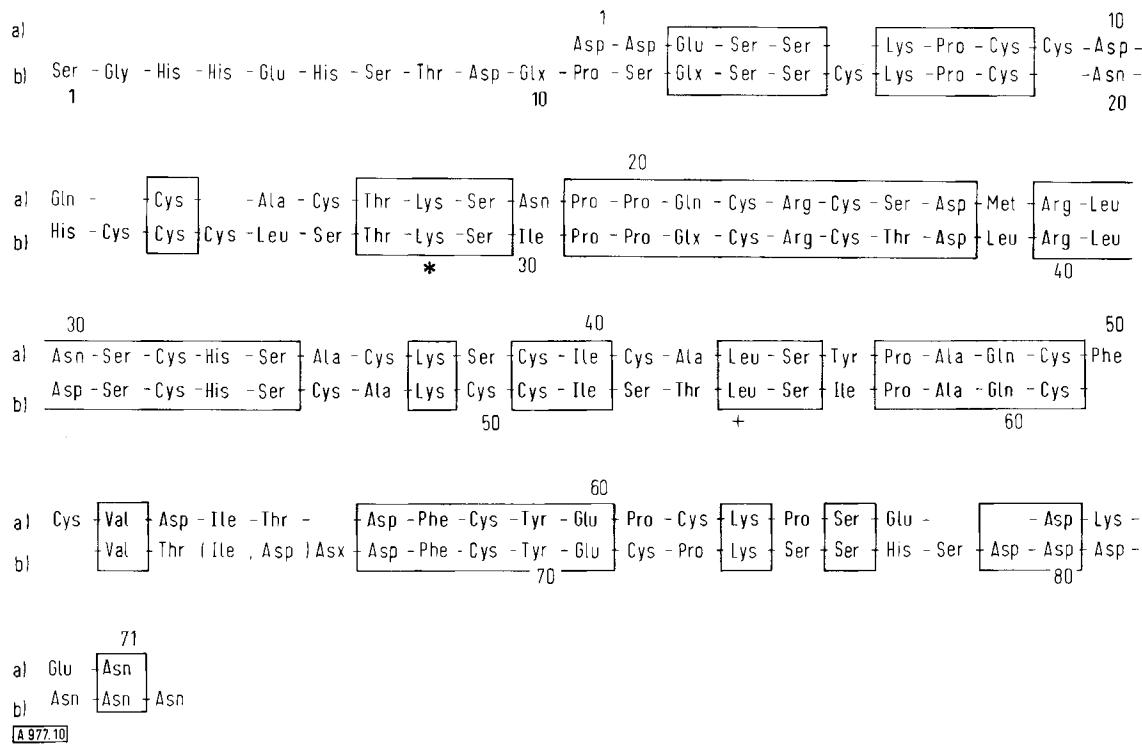


Abb. 10. Homologie in den Aminosäuresequenzen a) des Sojabohnen-Inhibitörs (Bowman-Birk) [128] und b) des Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor IV aus Limabohnen [130]. Das Sternchen markiert das anti-tryptische (\*), das Kreuz (+) das anti-chymotryptische Zentrum. Im Bowman-Birk-Inhibitor sind die Teilsequenzen Ala<sup>13</sup> bis Cys<sup>24</sup> mit Ile<sup>40</sup> bis Cys<sup>51</sup> homolog, im Limabohnen-Inhibitor IV die Teilsequenzen Cys<sup>23</sup> bis Cys<sup>34</sup> mit Cys<sup>50</sup> bis Cys<sup>61</sup>.

Die Sequenz eines von *Portmann* und *Fraefel*<sup>[124]</sup> (vgl. [13]) aus Schweineascariden isolierten Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitors (66 Aminosäuren) wurde von *Fraefel* und *Acher*<sup>[125]</sup> (Abb. 8) aufgeklärt. Größere Homologien mit den bisher genannten tierischen Inhibitoren sind bis auf die Teilsequenzen Thr-Tyr-Gly-Gly-Cys-Glu (Reste 37–42) im Rindercolostrum-Inhibitor und der ähnlichen Sequenz Thr-Lys-Gly-Gly-Cys-Glu (Reste 12–17) im Ascaris-Inhibitor nicht feststellbar.

In der letzten Zeit sind auch eine Reihe von Primärstrukturen pflanzlicher Inhibitoren ermittelt worden. Die vollständige Sequenz des Sojabohnen-Inhibitors (Kunitz) (181 Aminosäuren) wurde von *Koide*, *Tsunasawa* und *Ikenaka*<sup>[126, 240, 241]</sup> bestimmt (Abb. 9). Sie weist interessanterweise keine Homologien zum zweiten Inhibitor aus der Sojabohne, dem Bowman-Birk-Inhibitor<sup>[127]</sup> (71 Aminosäuren), auf, dessen Sequenz *Odani*, *Koide* und *Ikenaka*<sup>[128]</sup> aufklärten (Abb. 10a). Zu diesem Inhibitor finden sich aber im Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor aus der Limabohne<sup>[129]</sup> (84 Aminosäuren) weitgehende Homologien (Abb. 10b). Die Sequenz des Limabohnen-Inhibitors wurde von *Tan* und *Stevens*<sup>[30, 130]</sup> ermittelt und weist die Besonderheit auf, zwei homologe Sequenzbereiche innerhalb der einsträngigen Polypeptidkette zu enthalten, von denen der eine Bereich das anti-tryptische, der andere das anti-chymotryptische Zentrum enthält<sup>[30]</sup>. Aus diesem Befund wurde die Hypothese abgeleitet, daß dieser „double headed“ Inhibitor mit zwei unabhängigen reaktiven Zentren durch Genduplikation und divergente Evolution entstanden sein könnte. In dieser Hinsicht ist es bemerkenswert<sup>[128]</sup>, daß ähnliche Teilsequenzen wie Lys-Ser-Asn-Pro-Pro-Gln-Cys-Arg (Reste 16–23) im Bowman-Birk-Sojabohnen-Inhibitor (Abb. 10a) und Lys-Ser-Ile-Pro-Glx-Cys-Arg (Reste 28–35) im Limabohnen-Inhibitor (Abb. 10b) auch in der Sequenz des Erdnuß-Inhibitors (Arg-Ser-Asx-Pro-Pro-Glx-Cys-Arg) vor-

kommen (*Hochstrasser*, *Illchmann* und *Werle*<sup>[133, 134]</sup>), obwohl die Gesamtsequenz sich sonst deutlich von der der beiden anderen Inhibitoren unterscheidet. Die Vermutung, daß diese Regionen von besonderer Bedeutung für die anti-tryptische Aktivität sind, bedarf noch der Bestätigung. Bei sonst großer Unterschiedlichkeit finden sich auch ähnliche Sequenzbereiche im Erdnuß-Inhibitor (Ala-Pro-Pro-Tyr-Phe-Glx-Cys, Reste 23–29) und im Inhibitor aus Maissamen (Leu-Pro-Pro-Leu-Glx-Lys-Thr-Cys, Reste 26–33), der gleichfalls von *Hochstrasser*, *Illchmann* und *Werle*<sup>[133, 134]</sup> bearbeitet wurde.

## 8.2. Kovalente Strukturen

Die vollständige kovalente Struktur wird bestimmt durch die Querverknüpfungen der Polypeptid-Hauptkette durch die Disulfidbrücken. Die drei Cystinreste im Trypsin-Kallikrein-Inhibitor (Kunitz) verbinden die Positionen 5 und 55, 14 und 38 sowie 30 und 51<sup>[116, 119]</sup> (Abb. 6a), die drei Cystinreste der sekretorischen Pankreas-Inhibitoren (Kazal-Typ) die Reste 9 und 38, 16 und 35 sowie 24 und 56<sup>[92, 133–136]</sup> (Abb. 6b), während die fünf Brücken des Ascaris-Inhibitors die Positionen 5 und 28, 16 und 44, 19 und 58, 21 und 38 sowie 43 und 64<sup>[137]</sup> (Abb. 8) miteinander verknüpfen. Im Sojabohnen-Inhibitor (Kunitz) werden die Reste 39 und 86 sowie 136 und 145<sup>[138]</sup> durch zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden (Abb. 9). Die kürzlich aufgeklärte Struktur des Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitors (Bowman-Birk) aus Sojabohnen („double headed“-Inhibitor, s. Abschnitt 9) wird von sieben Disulfidbrücken fixiert, die die Halbcystinreste 8 und 62, 9 und 24, 12 und 58, 14 und 22, 32 und 39, 36 und 51 sowie 41 und 49 miteinander verbinden<sup>[230]l\*</sup>.

[\*] Eine Abbildung dieser interessanten Struktur ließ sich im Rahmen der Korrektur leider nicht mehr aufnehmen.

Die biologische Aktivität der Proteinase-Inhibitoren wird bei vollständiger Reduktion der Disulfidbrücken zerstört, in der Regel jedoch bei schonender Reoxidation zurückgewonnen<sup>[19, 92, 123]</sup>.

Die wenigen Daten im Zusammenhang mit vollständigen kovalenten Strukturen und Angaben über die Lage des reaktiven Zentrums gestatten nur vorsichtige Aussagen. Die Hypothese von *Ozawa* und *Laszkowski, Jr.*<sup>[88]</sup>, daß die reaktive Peptidbindung -P<sub>1</sub>-P'<sub>1</sub>- in einem über eine Disulfidbrücke geschlossenen Ring („disulfide loop“) als „cyclisches Substrat“ vorliegt, wird von den Strukturen des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors (Kunitz) (P<sub>1</sub>-P'<sub>1</sub> = Lys<sup>15</sup>-Ala<sup>16</sup><sup>[90]</sup>), der sekretorischen Pankreas-Inhibitoren (Kazal-Typ) (P<sub>1</sub>-P'<sub>1</sub> = Arg/Lys<sup>18</sup>-Ile<sup>19</sup><sup>[18, 64, 92, 100]</sup>) und des Sojabohnen-Inhibitors (Kunitz) (P<sub>1</sub>-P'<sub>1</sub> = Arg<sup>63</sup>-Ile<sup>64</sup><sup>[88]</sup>) gestützt und dürfte auch für den Ascaris-Inhibitor gelten, für den das reaktive Zentrum noch nicht ermittelt wurde. Im Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor (Bowman-Birk) liegen sowohl das tryptische als auch das chymotryptische Zentrum in einem disulfid-verbrückten Ring. Beide Molekülteile könnten durch Pepsinspaltung der Bindung Asp<sup>56</sup>-Phe<sup>57</sup> und Bromcyan-spaltung der Bindung Met<sup>27</sup>-Arg<sup>28</sup> von *Odani* und *Ikenaka*<sup>[239]</sup> in je einen („single headed“, s. Abschnitt 9) Trypsin-Inhibitor und einen Chymotrypsin-Inhibitor getrennt werden. Die bislang als Ausnahmen betrachteten Serum-Inhibitoren  $\alpha_1$ -Antitrypsin und  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin<sup>[46]</sup>, bei denen zunächst kein Cystin festgestellt werden konnte, weisen wahrscheinlich ebenfalls eine Disulfidbrücke auf<sup>[204]</sup>.

Das anti-tryptische Zentrum liegt bei allen bislang sequenzierten Trypsin-Inhibitoren im N-terminalen Teil der Polypeptidkette, der dann noch über eine Disulfidbrücke zum Ring geschlossen wird. Die Annahme erscheint nicht unbegründet, daß der C-terminale Teil sich parallel oder antiparallel zu Teilen dieses Ringes anordnet und durch  $\beta$ -struktur-ähnliche Wasserstoffbrücken die für das reaktive Zentrum erforderliche starre Konformation fixiert, die auch in den kleinen Werten der Hydrolysekonstante  $K_{Hyd}$  zum Ausdruck kommt. Eine solche Bauweise ließe sich aus der kovalenten Struktur der sekretorischen Pankreas-Inhibitoren und der beiden Molekülteile des Sojabohnen-Inhibitors (Bowman-Birk) herleiten und wurde durch Röntgen-Strukturuntersuchungen für den Trypsin-Kallikrein-Inhibitor nachgewiesen<sup>[139, 140]</sup>.

### 8.3. Raumstruktur des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors (Kunitz)

Die dreidimensionale Struktur des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors (Kunitz) wurde durch die erste Röntgen-Kristallstrukturanalyse eines Inhibitors mit einer Auflösung von 2.5 Å von *Huber, Kukla, Rühlmann, Epp* und *Formanek*<sup>[139]</sup> aufgeklärt. Das Molekül zeigt eine birnenförmige Gestalt mit einer Länge von 29 Å und einem maximalen Durchmesser von 19 Å (Abb. 11, vgl. Abb. 5a und 6a). Die Form wird bestimmt durch eine doppelsträngige, antiparallele Faltblattstruktur, die von den Resten Ala<sup>16</sup> bis Gly<sup>36</sup> gebildet wird und die um nahezu 180° verdrillt ist. Die beiden antiparallelen Stränge werden an der Spitze des Moleküls von der Disulfidbrücke Cys<sup>14</sup>-Cys<sup>38</sup> zusammengehalten. Das Segment der Reste Cys<sup>38</sup> bis Ser<sup>47</sup> kreuzt die Faltblattstruktur bei Phe<sup>45</sup>, welches durch Wasserstoffbrücken über seinen Carbonylsauerstoff und sein Stickstoffatom an Tyr<sup>21</sup> gebunden ist, so daß ein kurzes Stück

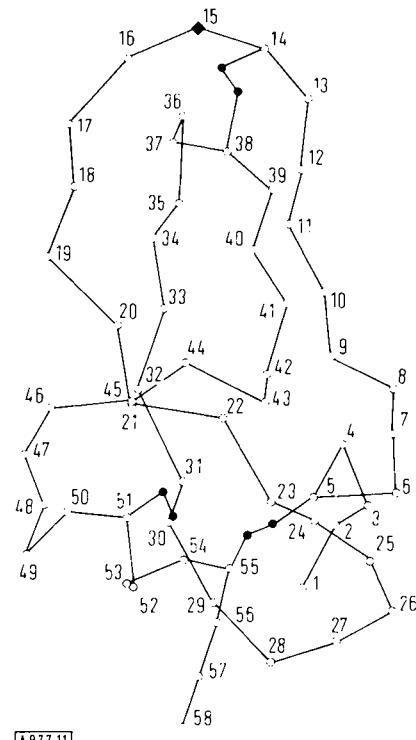


Abb. 11. Projektion des Raumstrukturmodells vom Trypsin-Kallikrein-Inhibitor (Kunitz) [139]. Angegeben ist die Lage der  $\alpha$ -Kohlenstoffatome der Peptidkette. ● = Schwefelatome der Disulfidbrücken, ● = Lys<sup>15</sup>.

einer dreisträngigen  $\beta$ -Struktur entsteht. Eine weitere Wasserstoffbrücke vom Carbonylsauerstoff von Thr<sup>11</sup> zum Stickstoff von Gly<sup>36</sup> fixiert in Form einer parallelen Faltblattstruktur den N-terminalen Teil der Hauptkette. Zwei Segmente einer Prolyl- $\beta$ -Helix werden von den Resten Arg<sup>39</sup> bis Lys<sup>41</sup> sowie Glu<sup>7</sup> bis Tyr<sup>10</sup> gebildet. Darin enthalten ist die Sequenz Pro<sup>8</sup>-Pro<sup>9</sup>, die offensichtlich die Ausbildung dieser Struktur begünstigt<sup>[140]</sup>. Die Disulfidbrücke Cys<sup>30</sup>-Cys<sup>51</sup> bindet drei Windungen einer  $\alpha$ -Helix des C-Terminus an die Faltblattstruktur, während die Brücke Cys<sup>5</sup>-Cys<sup>55</sup> ein verzerrtes helikales Segment der Reste Asp<sup>3</sup> bis Glu<sup>7</sup>, das keine Wasserstoffbrücken ausbildet, nahe dem N-Terminus fixiert.

Das Molekülinnere wird von hydrophoben Resten, vornehmlich von Phenylalanin und Cystin, ausgefüllt. Fast alle hydrophilen Reste liegen an der Oberfläche und weisen in das umgebende Lösungsmittel. Alle negativen Ladungen sind an der Molekülbasis angeordnet, während die positiven Ladungen konzentriert an der „Spitze“ des Moleküls erscheinen; dort befindet sich das reaktive Zentrum (Lys<sup>15</sup>-Ala<sup>16</sup>), d. h. die Kontaktstelle mit den Proteinasen. Der Inhibitor weist damit ein großes Dipolmoment auf, das möglicherweise die richtige Orientierung gegenüber der Proteinase erleichtert<sup>[140, 141]</sup>.

Wie jüngste Ergebnisse der Struktur-Verfeinerung von *Deisenhofer* und *Steigemann*<sup>[159]</sup> bei einer Auflösung von 1.5 Å erkennen lassen, ist die Peptidbindung Lys<sup>15</sup>-Ala<sup>16</sup> gespannt. Sie ist bereits in Richtung auf eine tetraedrische Anordnung verformt und nicht mehr eben.

### 8.4. Struktur des Komplexes C

Erste Modelluntersuchungen zur räumlichen Struktur des Komplexes C aus Trypsin-Kallikrein-Inhibitor (Kunitz) und

Chymotrypsin nahmen *Blow, Wright, Kukla, Rühlmann, Steigemann und Huber*<sup>[141, 142]</sup> vor. Von *Stroud, Kay und Dickerson*<sup>[143]</sup> stammen Betrachtungen über die Einlagerung des Inhibitors am Modell des Trypsins.

Die Röntgen-Struktur des kristallisierten Komplexes klärten *Rühlmann, Kukla, Schwager, Bartels und Huber*<sup>[198]</sup> mit einer Auflösung von 2.8 Å auf. Sie ist dem Vorschlag, der aus den Strukturen der Komponenten vorhergesagt wurde<sup>[141, 142]</sup>, außerordentlich ähnlich.

Tabelle 1. Wasserstoffbrücken zwischen dem Trypsin-Kallikrein-Inhibitor (Kunitz) und Trypsin (die Aufstellung nach [142] aus Modelluntersuchungen am Inhibitor und  $\alpha$ -Chymotrypsin wurde nach den Ergebnissen der Röntgen-Strukturanalyse des Komplexes aus Inhibitor und Trypsin nach [198, 242] korrigiert).

Inhibitor	Beteiligte Aminosäuren (und Atome)	Enzym
Pro <sup>13</sup> (CO)	Gly <sup>216</sup> (NH)	
Lys <sup>15</sup> (CO)	Ser <sup>195</sup> (NH), Gly <sup>193</sup> (NH)	
Lys <sup>15</sup> (NH)	Ser <sup>214</sup> (CO)	
Lys <sup>15</sup> ( $\epsilon$ -NH <sub>2</sub> )	Asp <sup>189</sup> ( $\beta$ -CO)	
Cys <sup>14</sup> (CO)	Gln <sup>192</sup> (CONH <sub>2</sub> )	
Arg <sup>17</sup> (NH)	Phe <sup>41</sup> (CO)	
Arg <sup>17</sup> (NH C(NH)NH <sub>2</sub> )	His <sup>40</sup> (CO)	
Arg <sup>39</sup> (NH C(NH)NH <sub>2</sub> )	Asn <sup>97</sup> (CO)	

Die Peptidbindung Lys<sup>15</sup>-Ala<sup>16</sup> des Inhibitors liegt im Komplex am katalytisch aktiven Zentrum des Enzyms, wobei der Inhibitor die Enzymoberfläche vollständig bedeckt und die Seitenkette von Lys<sup>15</sup> in die Spezifitätstasche des Enzyms

sind auf die nähere Umgebung der katalytisch aktiven Reste Ser<sup>195</sup>, His<sup>57</sup> und Asp<sup>102</sup> des Enzyms<sup>[\*]</sup> beschränkt. Wasser wird aus dieser Kontaktregion vollständig ausgeschlossen. Die meisten Kontakte werden von den flexiblen Seitenketten der Reste Lys<sup>15</sup>, Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup> und Arg<sup>39</sup> vom Inhibitor zu Teilen des Enzyms hergestellt, von denen bekannt ist, daß Aminosäuresubstitutionen zwischen Trypsin und Chymotrypsin besonders konservativ sind<sup>[\*\*]</sup>. Die Einlagerung der Lysinseitenkette in die Spezifitätstasche des Trypsins ist begünstigt, weil die Möglichkeit zur Ionenpaarbildung zwischen der  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lys<sup>15</sup> und dem  $\beta$ -Carboxylat von Asp<sup>189</sup> besteht, doch kann auch Chymotrypsin Lysin einlagern, obwohl es statt Asp<sup>189</sup> Ser<sup>189</sup> aufweist<sup>[142, 198]</sup>. Es wird angenommen, daß in der Bindungstasche von Chymotrypsin noch Raum für Wassermoleküle ist, die bei der Dispersion der positiven Ladung von Lys<sup>15</sup> helfen könnten<sup>[142]</sup> (vgl. Abschnitt 9).

Nach Entstehung des losen Michaelis-Komplexes L oder L\* aus Enzym und Inhibitor erscheint die Ausbildung einer Acyl-enzym-Zwischenstufe mit kovalenter Verknüpfung von Enzym und Inhibitor wie bei der normalen Substrathydrolyse sterisch möglich, da die Peptidbindung Lys<sup>15</sup>-Ala<sup>16</sup> (P<sub>1</sub>-P'<sub>1</sub>) genau wie die eines hydrolysierbaren Substrates in Kontakt mit den katalytisch aktiven Resten Ser<sup>195</sup> und His<sup>57</sup> gebracht wird<sup>[142]</sup>. Demnach könnte die Peptidbindung P<sub>1</sub>-P'<sub>1</sub> angegriffen werden. Für eine derartige Reaktion bei der Inhibitor-Enzym-Wechselwirkung spricht die Partialproteolyse (s. Abschnitt 5.2) dieser Peptidbindung bei einer Reihe von Proteinasen-Inhibitoren. Die grundlegende Frage nach der molekularen Struktur des Komplexes C konnte durch die Röntgen-Struk-

Tabelle 2. Art und Zahl der Wechselwirkungen zwischen dem Trypsin-Kallikrein-Inhibitor (Kunitz) (PTI) und Trypsin nach den Röntgen-Strukturdaten des kristallisierten Komplexes [242]. C = kovalente Bindung, H = Wasserstoffbrücke, V = van-der-Waals-Wechselwirkung, CT = Charge-transfer-Wechselwirkung, S = Salzbrücke.

PTI	Thr <sup>11</sup>	Gly <sup>12</sup>	Pro <sup>13</sup>	Cys <sup>14</sup>	Lys <sup>15</sup>	Ala <sup>16</sup>	Arg <sup>17</sup>	Ile <sup>18</sup>	Val <sup>34</sup>	Tyr <sup>35</sup>	Gly <sup>36</sup>	Gly <sup>37</sup>	Cys <sup>38</sup>	Arg <sup>39</sup>	
Trypsin															
Tyr <sup>39</sup>										V					
His <sup>40</sup>										H					
Phe <sup>41</sup>								V		H, V	V				
Cys <sup>42</sup>								V							
His <sup>57</sup>							V	V	V						
Cys <sup>58</sup>								V							
Tyr <sup>59</sup>															
Lys <sup>60</sup>											V				
Ser <sup>98</sup>															
Asn <sup>97</sup>															H, V
Thr <sup>98</sup>														V	
Leu <sup>99</sup>								V						V	V
Tyr <sup>151</sup>										V, CT		V			
Gln <sup>175</sup>														H	
Asp <sup>189</sup>										S					
Ser <sup>190</sup>										H, V					
Cys <sup>191</sup>										V					
Gln <sup>192</sup>			H?		H?	V		H	V	V					
Gly <sup>193</sup>									H, V	V	V				
Asp <sup>194</sup>										H					
Ser <sup>195</sup>										V	C?, V, V				
											H				
Ser <sup>214</sup>											H				
Tyr <sup>215</sup>						V			V						
Gly <sup>216</sup>						H, V							V		

eingelagert ist. Elf<sup>[242]</sup> Wasserstoffbrücken und über 200 van-der-Waals-Kontakte zwischen Trypsin (oder Chymotrypsin) und Inhibitor erscheinen möglich (Tabellen 1 und 2). Diese

[\*] Siehe Fußnote in Abschnitt 7.

[\*\*] „Konservativ“ bedeutet hier, daß der Charakter der Aminosäuren (hydrophil, hydrophob) erhalten bleibt und daß keine Substitutionen durch Mutation stattfinden.

turanalyse des Komplexes aus Trypsin und Trypsin-Kallikrein-Inhibitor (Kunitz)<sup>[198]</sup> vorläufig beantwortet werden. Dieser Komplex ist ein Addukt mit tetraedrischem Zwischenzustand und einer Geometrie der Lys-Ala-Peptidbindung zwischen tetraedrischer Koordination am Carbonylkohlenstoff und planarer Anordnung. Als Alternativen standen eine Stabilisierung nur durch Nebenvalenz-Wechselwirkungen oder eine Struktur als Acylenzym-Komplex zur Diskussion. Nach *Birktoft* und *Blow*<sup>[199]</sup> sowie *Henderson*<sup>[144]</sup> unterscheiden sich natives und acyliertes Chymotrypsin eindeutig in der Position des  $\beta$ -Sauerstoffs von Ser<sup>195</sup>, der im Acylderivat um  $120^\circ$  um die  $C_x$ - $C_\beta$ -Achse in eine „gebundene“ Position gedreht ist. Aus der Röntgen-Strukturanalyse des Komplexes ergibt sich eindeutig eine „gebundene“ Position dieses Atoms, entsprechend einer Situation mit kovalenter Bindung zwischen ihm und dem Carbonylkohlenstoff von Lys<sup>15</sup> ( $P_1$ ) vom Inhibitor. Der Abstand des  $\beta$ -Sauerstoffs von Ser<sup>195</sup> zum Carbonylkohlenstoff von Lys<sup>15</sup> beträgt im Mittel  $2.3 \text{ \AA}$  und ist damit länger als eine kovalente Bindung. Er begünstigt aber eine starke Wechselwirkung des Serin-Nucleophils mit dem elektrophilen Zentrum, dem Carbonylkohlenstoff von Lys<sup>15</sup>. Zwischen den Resten  $P_1$ - $P'_1$  (Lys<sup>15</sup>-Ala<sup>16</sup>) ( $I$ )<sup>[1]</sup> besteht im Komplex noch die kovalente Peptidbindung<sup>[198]</sup>.

Die tetraedrische Anordnung wird durch die Wasserstoffbrücke zwischen  $N^{e2}$  von His<sup>57</sup> (E) und der Hydroxygruppe von Ser<sup>195</sup> stabilisiert<sup>[198]</sup>. Dieses Strukturmerkmal ist im Einklang mit dem Transfer des Hydroxyprotons von Ser<sup>195</sup> auf His<sup>57</sup> bei der Ausbildung des tetraedrischen Adduktes<sup>[201]</sup>. Die Lage des  $N^{e2}$  von His<sup>57</sup> im Komplex gestattet die Rotation des  $\beta$ -Sauerstoffs von Ser<sup>195</sup> aus der „nativen Position“ in die „gebundene Acylposition“, ohne daß der  $O$ - $N$ -Kontaktabstand sich um mehr als  $0.3 \text{ \AA}$  ändert. So bleibt die Wasserstoffbrücke über den kovalent gebundenen Sauerstoff als starken Protonenacceptor erhalten, aber die Energie des Übergangszustandes der Reaktion zum Komplex C wird erniedrigt (Abb. 12)<sup>[198]</sup>.

Die Entfernung von  $4.1 \text{ \AA}$  zwischen dem Amidstickstoff der „Substrat-Austrittsgruppe“ von Ala<sup>16</sup> ( $I$ ) und  $N^{e2}$  von His<sup>57</sup> (E) verhindert ebenso wie die ungeeignete Orientierung des Imidazolringes den direkten Protonentransfer<sup>[145]</sup> und damit die Ausbildung der Acylenzym-Zwischenstufe<sup>[198, 242]</sup>. Es wäre eine strukturelle Umorientierung des Imidazolringes mit Rotation um die  $C_x$ - $C_\beta$ - und die  $C_\beta$ - $C_\gamma$ -Achse erforderlich, um den  $\epsilon$ -Stickstoff näher an den Amidstickstoff von Ala<sup>16</sup> ( $I$ ) heranzubringen. Hierzu ist die Schwächung der Wasserstoffbrücken zwischen dem  $\beta$ -Sauerstoff von Ser<sup>195</sup> (E) und  $N^{e2}$  von His<sup>57</sup> sowie zwischen  $N^{e1}$  von His<sup>57</sup> und dem  $\beta$ -Carbonylsauerstoff von Asp<sup>102</sup> (E) erforderlich<sup>[198]</sup>. Die tetraedrische Struktur des Komplexes wird durch zwei weitere Wasserstoffbrücken zwischen Enzym und Inhibitor (s. Tabelle 1) sowie die Wasserstoffbrücke vom Amidstickstoff von Ala<sup>16</sup> ( $I$ ) zum Carbonylsauerstoff von Gly<sup>36</sup> ( $I$ ) stabilisiert. Letztere Wasserstoffbrücke gehört zur verdrillten Faltblattstruktur des Inhibitors<sup>[139]</sup> (s. Abschnitt 8.3).

Die Inhibitorkette von Tyr<sup>35</sup> bis Cys<sup>38</sup> und die raumerfüllende Disulfidbrücke Cys<sup>14</sup>-Cys<sup>38</sup> schließen Wasser vollständig von der Kontaktstelle der Enzymoberfläche aus und stabilisieren derart die Wasserstoffbrücken. Bei Ausbildung der Acylenzym-Zwischenstufe unter Spaltung der Peptidbindung zwischen

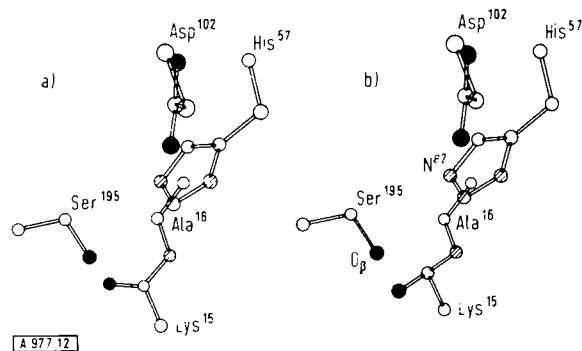


Abb. 12. Gegenüberstellung der Atomanordnungen der katalytisch aktiven Reste Asp<sup>102</sup>, His<sup>57</sup> und Ser<sup>195</sup> vom Trypsin (zur Numerierung s. Fußnote in Abschnitt 7) und der Reste Lys<sup>15</sup>-Ala<sup>16</sup> ( $P_1$ - $P'_1$ ) vom reaktiven Zentrum des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors (Kunitz) im Komplex. a) Hypothetische Anordnung im Modell eines Komplexes aus Trypsin und nativem, unverändertem Inhibitor. b) Anordnung ermittelt aus der Röntgen-Kristallstrukturanalyse [198] mit tetraedrisch koordiniertem Carbonylkohlenstoff von Lys<sup>15</sup> vom Inhibitor. ○ = C, ● = O, ⊗ = N.

Ala und Lys muß offensichtlich die Wasserstoffbrücke vom Amidstickstoff sowie eine Reihe hydrophober Kontakte von Ala<sup>16</sup> ( $I$ ) geschwächt werden. Im Gegensatz hierzu weisen normale Substrate des Enzyms eine weniger starre Struktur auf, und die Flexibilität der Polypeptidkette gestattet den Zutritt von Wasser zum Imidazolring von His<sup>57</sup>. Der Amidstickstoff der Austrittsgruppe wird protoniert, wobei sich die Acylenzym-Zwischenstufe bildet.

Die endgültige Feinstrukturanalyse des Inhibitors<sup>[159]</sup> wird klären, inwieweit eine Verformung der reaktiven Peptidbindung  $P_1$ - $P'_1$  (Lys<sup>15</sup>-Ala<sup>16</sup>) in Richtung auf die tetraedrische Anordnung im Komplex die Ausbildung des Adduktes energetisch begünstigt<sup>[198]</sup>.

Die Molekülstruktur dieses tetraedrischen Komplexes bietet bereits eine Erklärung für die am Sojabohnen-Inhibitor (Kunitz) beobachteten Unterschiede der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten  $k_2 > k_3$  (s. Abschnitt 6.2): Die Protonierung des Amidstickstoffs der Austrittsgruppe ( $P'_1$ ) erfordert eine Konformationsänderung des His<sup>57</sup> am Enzym vor der Protonenübertragung<sup>[159, 198]</sup>.

Es sind viele Einwände gegen die Allgemeingültigkeit des Modells mit kovalenter Verknüpfung von Enzym und Inhibitor im stabilen Komplex C (tetraedrischer Komplex oder Acylenzym-Komplex) erhoben worden. Von *Feinstein* und *Feeley*<sup>[146, 147]</sup> stammen Befunde über die Assoziation von Inhibitoren mit katalytisch inaktiven Enzymen. *Foster* und *Ryan*<sup>[148]</sup> fanden eine Komplexbildung von Anhydrochymotrypsin mit dem Chymotrypsin-Inhibitor aus Kartoffeln und *Dlouha* und *Keil*<sup>[149]</sup> eine solche von Rindertrypsinogen mit dem Trypsin-Kallikrein-Inhibitor (Kunitz) (Diskussion s. [191]).

Die neuerdings von *Sweet*, *Julin* und *Blow*<sup>[200]</sup> durchgeführte Röntgen-Strukturanalyse des kristallinen Komplexes von Schweinetrypsin und Sojabohnen-Inhibitor (Kunitz) ergab für die molekulare Struktur des Komplexes C im reaktiven Zentrum gleichfalls eine tetraedrische Koordination des Carbonylkohlenstoffs. Damit wurde hier der gleiche Zwischenzustand gefunden wie für den Komplex aus Trypsin und Trypsin-Kallikrein-Inhibitor (Kunitz).

Das besprochene und durch die Röntgen-Strukturanalyse gesicherte Modell für den stabilen Komplex C mit kovalenter Verknüpfung von Enzym und Inhibitor entspricht dem Vorschlag von *Finkenstadt* und *Laskowski, Jr.*<sup>[118, 150]</sup> für die „zen-

[\*] E = Enzym, I = Inhibitor.

trale“ Zwischenstufe C. Es ist im Einklang mit den kinetischen Daten und der Symmetrie der beobachteten enzymatisch-katalytischen Prozesse der Enzym-Inhibitor-Assoziation des Sojabohnen-Inhibitors (Kunitz) und erklärt das Phänomen der Partialproteolyse. Angesichts der strukturellen Ähnlichkeit der Serinproteinasen ist es sehr wahrscheinlich, daß viele andere Enzym-Inhibitor-Komplexe nach dem gleichen Prinzip gebaut sind. Inwieweit allerdings ein Komplex mit der speziellen Struktur eines tetraedrischen Adduktes eine günstigere Assoziationsenergie aufweist als ein Komplex, der durch reine Nebenvalenz-Wechselwirkungen stabilisiert ist, bedarf noch der Klärung.

## 9. Spezifität

Die Hemmspezifität von Inhibitoren für Proteininasen mit unterschiedlicher Spaltungsspezifität ist für ihre physiologische Funktion von Bedeutung. Sie kann von sehr unterschiedlicher Breite sein. Eine große Zahl von Daten ist in der Literatur<sup>[12-24]</sup> zusammengetragen worden; die Angaben sind jedoch infolge mangelhafter Methoden oder unreiner Materialien nicht immer verlässlich. Auch sind die Konstanten für die Assoziation verschiedener Enzyme mit dem gleichen Inhibitor mitunter um Größenordnungen verschieden und daher nicht immer unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen zu erfassen.

Die sehr unterschiedlichen Hemmspezifitäten sind eine Folge der molekularen Enzym-Inhibitor-Wechselwirkungen, deren detaillierte Aufklärung durch Zusammenspiel von Sequenzdaten und Röntgen-Strukturdaten noch am Anfang steht.

Zwei Enzymmoleküle können durch *ein* Inhibitormolekül kooperativ, kompetitiv oder unabhängig gehemmt werden<sup>[19]</sup>. Für die kooperative Hemmung sind bisher keine Beispiele bekannt geworden. Die kompetitive Hemmung kann erfolgen über:

1. das gleiche reaktive Zentrum („single headed“-Inhibitor),
2. mehrere reaktive Zentren, die überlappen („multi headed“-Inhibitor), und
3. mehrere reaktive Zentren, die nicht überlappen („multi headed“-Inhibitor).

Zum ersten Fall sind nur wenige Beispiele näher untersucht worden. Die Identität des anti-tryptischen und des anti-chymotryptischen Zentrums von Sojabohnen-Inhibitor (Kunitz) konnten *Bidlingmeyer, Leary und Laskowski, Jr.*<sup>[196]</sup> eindeutig beweisen. Das gleiche Zentrum ist auch für die Hemmung des trypsin-ähnlichen Enzyms des Seidenspinners *Cocoonase* - verantwortlich<sup>[19]</sup>.

Auch die bisher als sehr trypsin-spezifisch bekannten sekretorischen Inhibitoren des Säuretierpankreas hemmen nach *Fritz, Schießler, Brey, Tschesche und Fink*<sup>[151]</sup> die Proteinase Akrosin aus Ebersperma und aus Humansperma<sup>[152]</sup> sowie eine Proinsulin in Insulin überführende Pankreasproteinase<sup>[153]</sup>. Erste Befunde sprechen für das Vorliegen des gleichen reaktiven Zentrums in diesen und weiteren „single headed“-Inhibitoren. „Single headed“ Inhibitoren hemmen aus der Reihe strukturell ähnlicher Serin-Proteininasen mit vergleichbarer Spezifität wie Trypsin, Plasmin, Thrombin, Urokinase, Cocoonase, Akrosin und Pankreas-Kallikrein<sup>[154]</sup> je nach Spezifität nur bestimmte Enzyme mit u.U. stark unterschiedlicher Affinität. Wie wir fanden, hemmen einzelne Isoinhibitoren aus der Weinbergschnecke Trypsin mit gleicher Assoziationskonstante, jedoch Pankreas-Kallikrein mit sehr unterschiedlichem Erfolg<sup>[214]</sup>.

Eine noch ausgeprägtere Selektivität fanden wir bei den Isoinhibitoren des Tintenfisches, die alle Trypsin, Chymotrypsin und Pankreas-Kallikrein hemmen, jedoch nicht Plasmin<sup>[38]</sup>.

Die Selektivität kann sogar innerhalb einer Klasse homologer Inhibitoren noch ausgeprägter werden und in eine Spezies-Spezifität übergehen. So weisen die sekretorischen Pankreas-Inhibitoren (Kazal-Typ) von Rind und Schwein bis auf die Arg↔Lys-Mutation des Restes P<sub>1</sub> übereinstimmende Sequenzbereiche im reaktiven Zentrum auf (s. Abschnitt 8.1) und hemmen beide sowohl Schweine- als auch Rindertrypsin, jedoch *nicht* meßbar Humantrypsin<sup>[155]</sup>. Dagegen hemmt der Humantrypsin-Inhibitor außer Trypsin I und II vom Menschen<sup>[156]</sup> auch Rindertrypsin<sup>[157]</sup>. Trotz dieser unterschiedlichen Spezies-Spezifität ist mit weitgehenden Homologien dieser Pankreas-Inhibitoren aufgrund der evolutionären Verwandtschaft zu rechnen. Sequenzvergleichen innerhalb dieser Klasse kommt daher spezielles Interesse zu.

Im zweiten Fall, bei Vorliegen mehrerer überlappender reaktiver Zentren, sind umfangreiche molekulare Untersuchungen nötig, da Versuche zur kompetitiven Hemmung keine eindeutige Entscheidung ermöglichen. Unabhängige und überlappende reaktive Zentren für Trypsin und Chymotrypsin wurden aufgrund veränderter Spezifitäten von chemisch modifiziertem Trypsin-Kallikrein-Inhibitor (Kunitz) ebenso diskutiert<sup>[113, 158]</sup> wie ein einziges Zentrum für beide Enzyme (erster Fall, s. auch Abschnitt 8.3). *Sevilla und Righi*<sup>[95, 160]</sup> fanden, daß die Acetylierung des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors (Kunitz) die anti-tryptische Aktivität aufhebt, während die anti-chymotryptische Aktivität nur vermindert wird. Aus diesem Befund wurde auf zwei unabhängige, aber überlappende reaktive Zentren („double headed“) geschlossen. Als weiteres Beispiel ist möglicherweise der Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor aus japanischem Rettichsamen zu nennen<sup>[161]</sup>. Die Resynthese der Peptidbindung (zwischen Lys<sup>15</sup> und Ala<sup>16</sup>) am „synthetisch“ modifizierten Trypsin-Kallikrein-Inhibitor (Kunitz) durch Trypsin *und* Chymotrypsin<sup>[213, 231]</sup> (s. Abschnitt 5.2) beweist nach unserer Ansicht die Identität beider reaktiver Zentren („single headed“).

Der dritte Fall, das Vorliegen unabhängiger, nicht überlappender Zentren, wurde für die Hemmung von Trypsin und Chymotrypsin durch die Inhibitoren aus Sojabohnen (Bowman-Birk)<sup>[74, 162]</sup>, Limabohnen<sup>[30, 163, 164]</sup> und anderen Bohnen<sup>[19, 165, 166]</sup> sowie für den Submandibularis-Inhibitor vom Hund<sup>[202]</sup> und den Ovoinhibitor aus Hühnereiklar<sup>[167]</sup> und mehrere Ovomucoide von Vögeln<sup>[168]</sup> nachgewiesen.

Der „double headed“ Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor (Bowman-Birk) konnte durch Spaltung der Peptidbindung im trypsin-spezifischen Zentrum und Abspaltung des reaktiven Lysinrestes mit Carboxypeptidase B in einen „single headed“ Chymotrypsin-Inhibitor übergeführt werden<sup>[162]</sup>. Im Limabohnen-Inhibitor, dessen einsträngige Polypeptidkette zwei homologe Bereiche aufweist (Abb. 10b), wurde das anti-tryptische Zentrum (Lys<sup>28</sup>-Ser<sup>29</sup>) im N-terminalen Bereich gefunden. Das anti-chymotryptische Zentrum (Leu<sup>55</sup>-Ser<sup>56</sup>) liegt in der entsprechenden Position im homologen C-terminalen Bereich<sup>[30]</sup>. Die unterschiedliche Spezifität zweier homologer Bereiche mit nur noch zwei weiteren konservativen Punktmutationen scheint allein durch die Aminosäuresubstitution Lysin↔Serin, die sogar zweimaligen Basenaustausch im genetischen Code verlangt, bedingt zu sein.

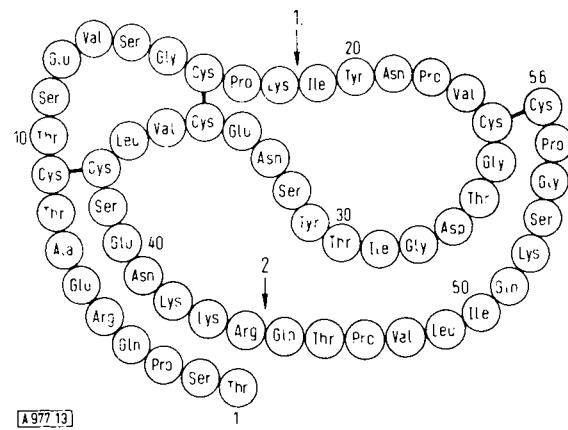
Der Ovoinhibitor aus Hühnereiklar, ein Glykoprotein aus nur einer Polypeptidkette (MG 49000), bindet separat und unabhängig voneinander sogar 2 mol Trypsin und 2 mol Chymotrypsin<sup>[167]</sup> und kann daher als „multi headed“ bezeichnet werden<sup>[168]</sup>.

Auch die Inhibitoren des Blutplasmas weisen meist breite Spezifitäten auf und hemmen außer Trypsin oder Chymotrypsin teils auch Plasmin, Pankreasalkalikrein, Thrombin, C1-Esterase oder Elastase<sup>[461]</sup>. Ob sie mehrere reaktive Zentren oder nur eins aufweisen, ist bislang ungeklärt. Für  $\alpha_2$ -Makroglobulin wurde die unabhängige Hemmung von 2 mol Trypsin nachgewiesen<sup>[169]</sup>. Für dieses sehr hochmolekulare Protein ist jedoch eine Zusammensetzung aus Untereinheiten nachgewiesen worden<sup>[226]</sup> und auch ein abweichender Mechanismus der Hemmung wahrscheinlich, nachdem Trypsin, Plasmin und Thrombin auch im Komplex mit  $\alpha_2$ -Makroglobulin niedermolekulare Substrate hydrolyseren können<sup>[170]</sup>.

## 10. Temporäre Hemmung

Zu den temporären Inhibitoren gegenüber Trypsin gehören neben dem bereits erwähnten Hühner-Ovomucoid<sup>[75]</sup> und allen bislang untersuchten sekretorischen Pankreas-Inhibitoren der Säugetiere (Kazal-Typ)<sup>[42, 43, 65, 76, 171]</sup> (s. Abschnitt 4.2) auch die Seminal-Inhibitoren aus Meerschweinchen-Samenblasen<sup>[48]</sup> und aus Ebersperma<sup>[172]</sup> (vgl. unten). Der Trypsin-Kallikrein-Inhibitor (Kunitz) aus Rinderorganen wird durch Reduktion der Disulfidbrücke Cys<sup>14</sup>-Cys<sup>38</sup> ebenfalls zum temporären Hemmstoff gegenüber Trypsin, obwohl der native Inhibitor permanent hemmt und gegen mehr als 20 proteolytische Enzyme vollständig resistent ist<sup>[173, 174]</sup>.

Zwei Alternativen für den Mechanismus der proteolytischen Inaktivierung der Inhibitoren während der temporären Hemmung wurden diskutiert. Laskowski, Sr. und Wit<sup>[76]</sup> postulierten aufgrund der Veränderung der Inaktivierungsgeschwindigkeit bei Zugabe von überschüssigem Inhibitor (und von überschüssigem Trypsin) zum Komplex einen Angriff von freiem Trypsin auf den im Komplex gebundenen Inhibitor. Tschesche und Klein<sup>[65]</sup> fanden, daß der proteolytische Abbau des sekretorischen Schweinepankreas-Inhibitors zu modifizierten und inaktiven Produkten sowohl in Lösung (mit gelöstem Trypsin) als auch an unlöslichem Trypsinharz, das zur Komplexbildung verwendet wurde, erfolgte. Sie bevorzugten daher aus sterischen Gründen einen Abbau aus dem Assoziat L oder L\* unter einfacher Umorientierung des Enzymmoleküls. Gestützt wird diese Ansicht durch die Beobachtung des fortschreitenden Abbaus des Inhibitors auch unter völlig unphysiologischen Bedingungen im pH-Bereich von 2.5–10 und bei Trypsin-Unterschluß, wobei zunächst keine tryptische Aktivität gegenüber natürlichen oder synthetischen Substraten feststellbar ist<sup>[65]</sup>. Das Maximum der Modifizierung und Inaktivierung liegt bei pH = 3.4<sup>[65, 78]</sup>. Laskowski, Sr. et al.<sup>[77]</sup> konnten zeigen, daß die vollständige Wiederfreisetzung des Trypsins aus einem Ansatz von überschüssigem Inhibitor und Trypsin, der bei pH = 3.4 bis zum Auftreten von 20% der Ausgangsaktivität inkubiert worden war, schließlich rascher nach Neutralisation auf pH = 8.0 erfolgt, als wenn die Inkubation in saurer Lösung fortgesetzt wird. Diese Beobachtung rechtfertigte den Schluß, daß die inaktivierende Spaltung nach der modifizierenden Proteolyse im reaktiven Zentrum (pH-Optimum bei pH < 7) erfolgte und daß das pH-Optimum für die inaktivierende Spal-



spielen“<sup>[177]</sup>. Bei symbiotisch mit Bakterien lebenden Pflanzen (z. B. Leguminosen) ist auch der Schutz pflanzlicher Gewebe am Besiedlungsort vor den bakteriellen Proteininasen sowie eine Schutzfunktion vor Überwucherung durch die Bakterien diskutiert worden<sup>[8]</sup>.

Von *Green* und *Ryan*<sup>[216]</sup> wurde in allen Blättern von Kartoffeln und Tomaten ein drastischer Anstieg des Proteinase-Inhibitorspiegels als Ergebnis einer durch Insekten verursachten Verletzung einzelner Blätter registriert. Dieser Effekt kann auch durch mechanische Verletzung erreicht werden und geht auf die Ausschüttung eines „Wundhormons“ (PIIF, Proteinase Inhibitor Inducing Faktor) an der Verletzungsstelle zurück<sup>[217]</sup>.

Die physiologische Aufgabe der sekretorischen Pankreas-Inhibitoren, die bei allen Säugetieren vorkommen, ist sehr wahrscheinlich in einer Verhinderung der vorzeitigen Zymogenaktivierung der Verdauungsenzyme durch Hemmung des aktivierenden Schlüsselenzyms Trypsin - bei vorzeitiger Trypsinogen-Aktivierung - im Gangsystem und in den Speicherungsorten (Acinarzellen) der Drüsen zu sehen. Im Duodenaltrakt wird das Trypsinogen dann durch Enterokinase aktiviert. Eine starke Stütze dieser Ansicht ist die gleichzeitige und parallele Sekretion der Pankreas-Inhibitoren mit den Zymogenen<sup>[42, 43]</sup> sowie die begrenzte Spezifität dieser Inhibitoren und ihre temporäre Hemmung. Letztere Eigenschaft gestattet die Rückgewinnung des gehemmten Trypsins nach Sekretion in den Duodenaltrakt für die Verdauungsaufgabe.

Dagegen kann die Aufgabe des gewebsständig vorliegenden Trypsin-Kallikrein-Inhibitors (Kunitz) wohl kaum im Bereich der biochemischen Grundvorgänge liegen, da er nicht bei allen Säugetieren vorkommt und erst nach der Geburt<sup>[178]</sup> in den Geweben erscheint. Seine Funktion ist mit der Sonderstellung der Wiederkäuer in Zusammenhang gebracht worden<sup>[8]</sup>, bei denen ein besonderer Stoffwechsel durch die Magen-Darm-Fauna berücksichtigt werden muß. Der homologe Colostrum-Inhibitor (s. Abschnitt 2 und 8.1), der von allen Säugetieren sezerniert werden dürfte<sup>[179]</sup>, hat möglicherweise die Aufgabe, die Immunkörper der Mutter<sup>[180]</sup> bei ihrer Dünndarmpassage vor dem enzymatischen Abbau zu schützen und ihre Resorption in unversehrter Form zu ermöglichen<sup>[179]</sup>.

Die Inhibitoren der Schnecke<sup>[36, 63]</sup>, die ein breiteres Hemmspektrum als der Trypsin-Kallikrein-Inhibitor (Kunitz) aufweisen, werden in den Schneckenschleim sezerniert<sup>[36]</sup> und könnten daher als Schutzstoffe gegen die Proteininasen aus dem natürlichen Biotop der Schnecke fungieren. Für die *Ascaris*-Inhibitoren ist die Schutzfunktion gegenüber den Verdauungsenzymen ihrer Wirtsorganismen offenkundig<sup>[13, 72]</sup>. Aber es sind auch Einwände gegen diese einfache Vorstellung eines „Verteidigungs-Mechanismus“ erhoben worden<sup>[243]</sup>, und die Inhibitoren sind als Teil eines makromolekularen Transportsystems, das lebensnotwendig für den Wurm ist, betrachtet worden<sup>[243]</sup>.

Für die Inhibitoren des Säugetierspermias und Spermplasmas wurde die Hemmung des Akrosins in vitro und in vivo<sup>[47, 48, 181, 182, 184]</sup> eindeutig nachgewiesen. Akrosin, das trypsin-ähnliche Enzym aus der Akrosomenkappe des Spermienkopfes, ist für die Penetration der Eizellen-Membran (zona pellucida) verantwortlich und neben dem „corona penetrating enzyme“ sowie Hyaluronidase und Neuraminidase<sup>[183, 186]</sup> das Schlüsselenzym für den Befruchtungsvorgang (Abb. 14). Die Akrosin-Aktivität ist hoch in epididymalen

Spermien (Speicherform) und fehlt in ejakulierten Spermien, die mit dem Sekret der Vesiculardrüsen in Berührung gekommen sind. Sie tritt jedoch in „kapazitierten“ Spermien, die längere Zeit im weiblichen Genitaltrakt verweilt haben, wieder auf. Erst durch diesen Vorgang der „Kapazitierung“ erlangen die Spermien ihre Fähigkeit zur Befruchtung der Eizelle. *Zaneveld, Polakoski, Robertson* und *Williams*<sup>[47, 182, 185]</sup> sowie *Stambaugh* und *Buckley*<sup>[183]</sup> zeigten, daß kapazitierte Spermien durch in-vitro-Behandlung mit Seminal-Inhibitoren der Vesiculardrüse wieder dekapazitiert werden, wodurch in vivo die Befruchtung der Eizelle verhindert werden kann.

Durch diese Befunde sind Ansatzpunkte für eine antienzymatische Kontrazeption mit Proteinase-Inhibitoren gegeben.

Durch die Spermien mit ihren lysosomalen Enzymen wird ein beträchtliches Potential an proteolytischen Enzymen in den weiblichen Genitaltrakt eingebracht, die durch das Sekret der Vesiculardrüsen (Seminalplasma) gehemmt werden. Ob hier nur ein Schutz für das weibliche Schleimhautepithel oder eine noch unbekannte physiologische Funktion im Zusammenhang mit der Kapazitierung vorliegt, ist noch ungeklärt. Die hormonelle Steuerung der Spermplasma-Inhibitoren in den Vesiculardrüsen, den Orten ihrer Biosynthese, ist bekannt<sup>[187]</sup> (Abb. 15).

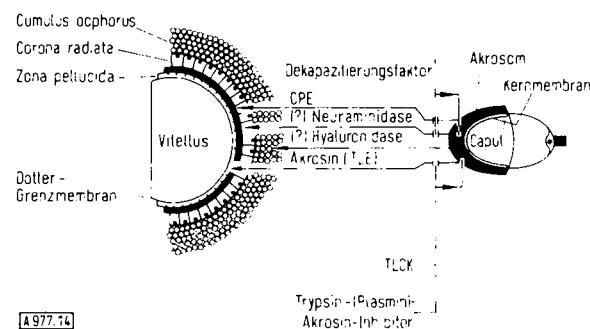


Abb. 14. Schematische Darstellung von Eizelle und Spermium mit den Penetrationsenzymen des Akrosoms sowie deren Inhibitoren [184]. Cumulus oophorus = Granulosezellen; CPE = „corona penetrating enzyme“. TLCK = irreversible Akrosin-Inhibitor 7-Amino-1-chlor-3-tosylamino-2-heptanon ( $N^7$ -Tosyl-L-lysyl-chlormethylketon).

Die Konzentration der Trypsin- und Chymotrypsin-Inhibitoren des Blutplasmas unterliegt gleichfalls der hormonellen Kontrolle<sup>[188]</sup>. Der Inhibitorspiegel steigt von der Geburt bis zur Geschlechtsreife bei Maus und Ratte signifikant an<sup>[189]</sup>. Die physiologische und pathophysiologische Funktion der Serum-Inhibitoren ist jedoch noch weitgehend unklar.

Möglicherweise spielen Inhibitoren auch eine Rolle bei der Steuerung des Hormonspiegels mancher Polypeptidhormone im Blutkreislauf. Wie *Tschesche, Kolb, Standl* und *Dietl*<sup>[219]</sup> beim Menschen und *Tschesche* und *Brush*<sup>[220]</sup> an der Ratte erstmals nachweisen konnten, läßt sich ein insulin-abbauendes Sulfhydrylenzym durch Proteinase-Inhibitoren in vitro hemmen und dadurch der Abbau verzögern. Der Nachweis eines Inhibitors für die insulin-spezifische Proteinase der Ratte in menschlichem Serum gelang *Brush*<sup>[221]</sup>.

Im Zusammenhang mit den biochemischen Vorgängen bei der Befruchtung steht die Beobachtung von *Schumacher*<sup>[190]</sup>, daß Inhibitoren des Serums, insbesondere  $\alpha_1$ -Antitrypsin, im Cervicalschleim der Frau vorkommen und daß ihre Konzentration zyklusabhängig und ein bis zwei Tage vor der Ovulation extrem erniedrigt ist<sup>[190]</sup> (Abb. 16). Neben diesen Hemm-

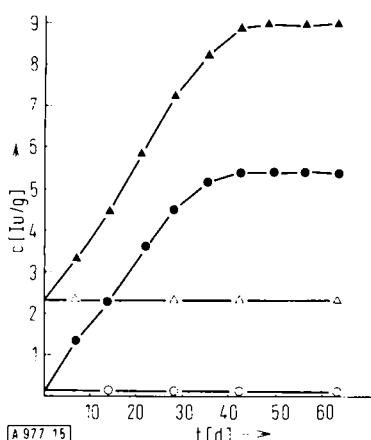


Abb. 15. Inhibitorkonzentration  $c$  in der Vesiculardrüse der Maus [187]. Normalstatus: ( $\Delta$  —  $\Delta$ ), 30 Tage nach Kastration: ( $\circ$  —  $\circ$ ), nach Stimulierung der normalen ( $\blacktriangle$  —  $\blacktriangle$ ) und der kastrierten Mäuse ( $\bullet$  —  $\bullet$ ) mit Testosteron. 1 IF hemmt ca. 1 mg Trypsin.

stoffen findet sich möglicherweise noch ein niedermolekularer Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor im Cervixsekret<sup>[206]</sup> der Frau. Akrosin wird auch durch Serum-Inhibitoren gehemmt ( $\alpha_1$ -Antitrypsin und Antithrombin III als Progressiv-Inhibitoren<sup>[191]</sup> und Inter- $\alpha$ -Trypsin-Inhibitor mit sofortiger Wirkung<sup>[191, 207]</sup>). Für die Hemmung der Spermaproteinasen nach der Penetration des Spermatozoons in die Eizelle stehen genügend Ovo inhibitoren oder Ovomucoide zur Verfügung. Die Hemmung des Eberakrosins durch Ovomucoid aus Hühnereiklar<sup>[47, 192]</sup> und den Inhibitor aus der Nidamentaldrüse von Tintenfischen<sup>[193]</sup> wurde bereits nachgewiesen. Über die Hemmung des akrosin-ähnlichen Pankreasenzymes Trypsin durch eine Vielzahl von Ovo inhibitoren und Ovomucoiden aus Geflügelern berichtete Feeney<sup>[35]</sup>.

Den Plasma-Inhibitoren aus den Seren von Warm- (und Kalt-)blütern dürften vielfältige Kontroll- und Regelfunktionen zukommen. Bekanntlich gehen viele Krankheitsbilder mit Konzentrationsänderungen in der  $\alpha_1$ -Globulinfraktion einher, deren größter Anteil von den  $\alpha_1$ -Antienzymen ( $\alpha_1$ -Antitrypsin,  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin und  $\alpha_1$ -Antiplasmin) gebildet wird und die 90% der trypsin-hemmenden Kapazität des menschlichen Serums ausmachen<sup>[81]!</sup> Eine wesentlich erhöhte Anfälligkeit für Lungenemphysem wurde bei Homozygoten mit genetisch bedingtem  $\alpha_1$ -Antitrypsinmangel beobachtet<sup>[194]</sup>, und auch das angioneurotische Ödem wird auf einen erblichen Mangel

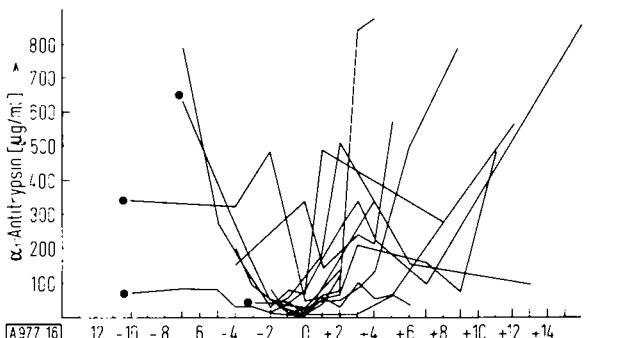


Abb. 16. Gehalt an  $\alpha_1$ -Antitrypsin im Cervicalschleim der Frau im Verlauf von 12 Monatszyklen. Zum besseren Vergleich wurde als Abszissen-Nullpunkt der Tag der Ovulation (letzter Tag niedriger Basaltemperatur) gewählt [190]. ●: Ovulation durch Gonadotropine induziert.

[\*] Die Bezeichnungen Antitrypsin und Antichymotrypsin für diese Proteinase-Inhibitoren des Blutplasmas sind irreführend, da diese Pankreasenzyme zwar gehemmt werden, aber nicht im Serum vorkommen.

an Komplementesterase-Inhibitor zurückgeführt. Proteinase-Inhibitoren scheinen auch das Wachstum transformierter Zellen selektiv zu hemmen, während normale Zellen nicht oder weniger stark beeinflusst werden. Hieraus könnten sich neue Ansatzpunkte für die Therapie maligner Zellen ergeben<sup>[218]</sup>.

## 12. Ausblick

Das Prinzip der lokalen und zeitlichen Begrenzung von Enzymaktivitäten durch Inhibitoren mit Proteinnatur wurde nicht nur bei Endoproteininasen des Serinhydrolase-Typs gefunden. In letzter Zeit wurden auch Inhibitoren für Exopeptidasen wie Carboxypeptidase A und B<sup>[195]</sup>, Lipase<sup>[196]</sup>, Phospholipase<sup>[197]</sup>, Amylase<sup>[222]</sup>, Ribonuclease und Desoxyribonuclease<sup>[223]</sup> isoliert. Mit der Entdeckung weiterer Inhibitoren für wichtige Enzyme des Stoffwechsels muß daher gerechnet werden. Damit ist den bereits bekannten biologischen Regulatoren eine dritte Möglichkeit zur Steuerung von Enzymaktivitäten im Organismus an die Seite zu stellen:

1. Reprimierung (oder Aktivierung) der genetisch gesteuerten Proteinsynthese auf der Stufe der DNA-Transkription,
2. Hemmung (oder Aktivierung) allosterischer Enzyme durch Effektoren des intermediären Stoffwechsels (incl. interkonvertierbarer Enzyme) und
3. Hemmung (temporär, permanent oder progressiv) von vorhandenen Enzymen durch spezifische Inhibitoren.

Bei der Erforschung der spezifischen Enzym-Inhibitor-Wechselwirkung und deren physiologischer und pathologischer Aspekte für die medizinische Molekularbiologie und angewandte Therapie stehen wir erst am Anfang, wenn auch heute schon Proteinase-Inhibitoren kommerziell verfügbar sind und vielfältig therapeutisch eingesetzt werden<sup>[249]</sup>.

*Für die Möglichkeit, Einsicht in noch unveröffentlichte Arbeiten zu nehmen, bin ich zu besonderem Dank verbunden den Herrn Prof. Dr. M. Laskowski, Jr. (Purdue University, Lafayette), Priv.-Doz. Dr. R. Huber (Max-Planck-Institut für Biochemie, München) und Herrn Priv.-Doz. Dr. H. Fritz (Universität München), dem ich hiermit auch für viele anregende Diskussionen danken möchte. Die hier erwähnten eigenen Untersuchungen wurden unterstützt von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Stiftung Volkswagenwerk, dem Fonds der Chemischen Industrie und dem Sonderforschungsbereich SFB 51.*

Eingegangen am 23. März 1973,  
ergänzt am 4. Oktober 1973 [A 977]

- [1] C. Fermi u. L. Pernossi, Z. Hyg. Infektionskr. 18, 83 (1894).
- [2] Zusammenstellung von N. Heimburger, H. Haupt u. H. G. Schwick in [24].
- [3] E. Weinland, Z. Biol. 44, 1 (1903).
- [4] M. Kunitz u. J. H. Northrop, J. Gen. Physiol. 19, 991 (1936).
- [5] M. Kunitz, Science 101, 668 (1945).
- [6] M. Kunitz, J. Gen. Physiol. 29, 149 (1946).
- [7] M. Kunitz, J. Gen. Physiol. 30, 311 (1947).
- [8] R. Vogel, I. Trautschold u. E. Werle: Natural Proteinase Inhibitors. Academic Press, New York 1968.
- [9] E. M. Weyer, Ann. N. Y. Acad. Sci. 146, 361 (1968).
- [10] R. F. Steiner u. V. Frattali, J. Agr. Food Chem. 17, 513 (1969).
- [11] A. Puzta, Nutr. Abstr. Rev. 37, 1 (1967).
- [12] I. E. Liener u. I. M. Kakade in I. E. Liener: Toxic Constituents of Plant Foodstuffs. Academic Press, New York 1969, S. 7.
- [13] M. Laskowski u. M. Laskowski, Jr. in M. L. Anson, K. Bailey u. J. T. Edsall: Advances in Protein Chemistry. Academic Press, New York 1954, Bd. 9, S. 203.

[14] M. Laskowski, Sr. in S. P. Colowick u. N. O. Kaplan: *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York 1955, Bd. 2, S. 36.

[15] N. M. Green u. H. Neurath in H. Neurath u. K. Bailey: *The Proteins*. Academic Press, New York 1954, Bd. 2B, S. 1057.

[16] P. Desnuelle in P. D. Boyer, H. Lardy u. K. Myrbäck: *The Enzymes*. Academic Press, New York 1960, Bd. 4, S. 128.

[17] R. E. Feeney u. R. G. Allison: *Evolutionary Biochemistry of Proteins*. Wiley, New York 1969.

[18] M. Laskowski, Jr. in P. Desnuelle, H. Neurath u. M. Ottesen: *Structure-Function Relationships of Proteolytic Enzymes*. Munksgaard, Copenhagen 1970, S. 89.

[19] M. Laskowski, Jr. u. R. W. Sealock in P. D. Boyer: *The Enzymes*. Academic Press, New York 1971, S. 375.

[20] S. P. Colowick u. N. O. Kaplan: *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York 1970, Bd. 19.

[21] B. Kassell in [20], S. 839; C. A. Ryan u. B. Kassell, *ibid.* S. 883.

[22] P. J. Burck in [20], S. 906; F. C. Monkhouse, *ibid.* S. 915.

[23] F. Markwardt in [20], S. 924.

[24] H. Fritz u. H. Tchesche: *Proceedings of the International Research Conference on Proteinase Inhibitors*. de Gruyter, Berlin 1971.

[25] K. Shimada u. K. Matsushima, *Agr. Biol. Chem.* 33, 544, 549 (1969).

[26] H. Umezawa in H. Umezawa: *Enzyme Inhibitors of Microbial Origin*. University Park Press, Baltimore 1972; N. T. L. Torstensson, *Arch. Microbiol.* im Druck.

[27] H. Van Vunakis u. R. M. Herriott, *Biochim. Biophys. Acta* 22, 537 (1956).

[28] T. Astrup, U. Nissen u. J. Rasmussen, *Biochim. Biophys. Acta* 113, 634 (1966).

[29] M. Righi u. M. Sela, *Biochemistry* 3, 629 (1964).

[30] F. C. Stevens in [24], S. 149.

[31] K. Hochstrasser, E. Werle, R. Siegelmann u. S. Schwarz, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 350, 249 (1969).

[32] K. Hochstrasser, E. Werle, R. Siegelmann u. S. Schwarz, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 350, 897 (1969); H. D. Belitz, K. P. Kaiser u. K. Santarius, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42, 420 (1971).

[33] K. Hochstrasser u. E. Werle in [24], S. 169.

[34] C. A. Ryan u. L. K. Shumway in [24], S. 175.

[35] R. E. Feeney in [24], S. 189.

[36] H. Tchesche u. Th. Dietl, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 353, 1189 (1972).

[37] G. Uhlenbruck, I. Sprenger u. I. Ishiyama, *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 9, 361 (1971); G. Uhlenbruck, G. Sprenger u. G. Hermann, *ibid.* 9, 494 (1971).

[38] H. Tchesche u. A. v. Rücker, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 354, 1447, 1510 (1973).

[39] H. Kraut, E. K. Frey u. E. Werle, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 192, 1 (1930).

[40] L. A. Kazal, D. S. Spicer u. R. A. Brahinsky, *J. Amer. Chem. Soc.* 70, 3034 (1948).

[41] H. Fritz, F. Woitinas u. E. Werle, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 345, 168 (1966).

[42] L. J. Greene, M. Righi u. D. S. Fackre, *J. Biol. Chem.* 241, 5610 (1966).

[43] H. Fritz, I. Hüller, M. Wiedemann u. E. Werle, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 348, 405 (1967).

[44] L. J. Greene, J. J. DiCarlo, A. J. Sussman u. D. C. Bartelt, *J. Biol. Chem.* 243, 1804 (1968).

[45] H. Tchesche, E. Wachter, S. Kupfer u. K. Niedermeier, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 350, 1247 (1969).

[46] N. Heimburger, H. Haupt u. H. G. Schwick in [24], S. 1.

[47] L. J. D. Zanereld, K. L. Polakoski, R. T. Robertson u. W. L. Williams in [24], S. 236.

[48] E. Fink, G. Klein, F. Hammer, G. Müller-Bardorff u. H. Fritz in [24], S. 225.

[49] H. Tchesche u. Th. Dietl in: *Protides of the Biological Fluids*. Pergamon Press, London 1973, Bd. 20, S. 1021.

[50] D. Čechová, V. Jonáková u. F. Šorm in [24], S. 105.

[51] H. U. Bergmeyer: *Methoden der enzymatischen Analyse*. Verlag Chemie, Weinheim 1970, Bd. 1.

[52] F. J. Kezdy u. E. T. Kaiser in [20], S. 3.

[53] T. Chase, Jr. u. E. Shaw in [20], S. 20.

[54] H. D. Orth u. W. Brümmer, *Angew. Chem.* 84, 319 (1972); *Angew. Chem. internat. Edit.* 11, 249 (1972).

[55] H. Fritz, H. Schult, M. Neudecker u. E. Werle, *Angew. Chem.* 78, 775 (1966); *Angew. Chem. internat. Edit.* 5, 735 (1966).

[56] H. Fritz, K. Hochstrasser, E. Werle, B. Brey u. M. Gebhardt, *Z. Anal. Chem.* 243, 452 (1968).

[57] H. Fritz, H. Schult, M. Hutzel, M. Wiedemann u. E. Werle, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 348, 308 (1967).

[58] H. Fritz, M. Gebhardt, E. Fink, W. Schramm u. E. Werle, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 350, 129 (1969).

[59] H. Fritz, B. Brey, M. Müller u. M. Gebhardt in [24], S. 28.

[60] K. Hochstrasser, M. Muss u. E. Werle, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 348, 1337 (1967).

[61] E. Fink, E. Jaumann, H. Fritz, H. Ingrisch u. E. Werle, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 352, 1591 (1971).

[62] H. Fritz, B. Brey u. L. Beress, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 353, 19 (1972).

[63] H. Tchesche u. Th. Dietl, *Eur. J. Biochem.* 30, 560 (1972).

[64] H. Tchesche, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 348, 1216, 1653 (1967).

[65] H. Tchesche u. H. Klein, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 349, 1645 (1968).

[66] H. Tchesche, E. Wachter u. G. Kallup, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 350, 1662 (1969).

[67] N. M. Green, *J. Biol. Chem.* 205, 535 (1953); N. M. Green u. E. Work, *Biochem. J.* 54, 347 (1953).

[68] S. A. Bernhard u. H. Gutfreund, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 53, 1238 (1965); G. Brandt u. G. P. Hess, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 22, 447 (1966).

[69] G. Feinstein u. R. E. Feeney, *Biochemistry* 6, 749 (1967).

[70] T. Chase, Jr. u. E. Shaw, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 29, 508 (1967).

[71] N. M. Green, *Biochem. J.* 66, 407 (1957).

[72] R. J. Peanasky u. G. M. Abu-Erreish in [24], S. 281.

[73] H. Fritz, M. Gebhardt, R. Meister u. E. Fink in [24], S. 271.

[74] Y. Birk u. A. Gertler in [24], S. 142.

[75] L. Gorini u. L. Audrain, *Biochim. Biophys. Acta* 8, 702 (1952).

[76] M. Laskowski, Sr. u. F. C. Wu, *J. Biol. Chem.* 204, 797 (1953).

[77] M. Laskowski, Sr., S. I. Schneider, K. A. Wilson, L. F. Kress, J. H. Mozejko, S. R. Martin, U. Kucich u. M. Andrews in [24], S. 66.

[78] H. Tchesche, H. Klein u. G. Reidel in [24], S. 299.

[79] P. C. Harpel, *J. Exp. Med.* 132, 329 (1970); J. Gigli, J. W. Mason, R. W. Colman u. K. F. Austen, *J. Immunol.* 104, 574 (1970).

[80] H. Fritz, B. Brey, A. Schmal u. E. Werle, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 350, 1551 (1969); H. Fritz, G. Wunderer, K. Kummer, N. Heimburger u. E. Werle, *ibid.* 353, 906 (1972).

[81] J. Lebowitz u. M. Laskowski, Jr., *Biochemistry* 1, 1044 (1962); 3, 469 (1964).

[82] H. Fritz, I. Trautschold u. E. Werle, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 342, 253 (1965); L. W. Nichol u. D. J. Winzor, *Biochem. Biophys. Acta* 94, 591 (1965); G. A. Gilbert, *Nature* 210, 299 (1966).

[83] E. Sheppard u. A. D. McLaren, *J. Amer. Chem. Soc.* 75, 2587 (1953).

[84] R. F. Steiner, *Arch. Biochem. Biophys.* 49, 71 (1954).

[85] D. Millar, K. Minzghor u. R. F. Steiner, *Arch. Biochem. Biophys.* 65, 135 (1962).

[86] A. Berger u. I. Schechter, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27, 157 (1967).

[87] D. Kowalski u. M. Laskowski, Jr., *Biochemistry* 11, 3451 (1972).

[88] K. Ozawa u. M. Laskowski, Jr., *J. Biol. Chem.* 241, 3955 (1966).

[89] R. Haynes u. R. E. Feeney, *Biochemistry* 7, 2879 (1968).

[90] J. Chauvet u. R. Acher, *J. Biol. Chem.* 242, 427 (1967).

[91] L. J. Greene u. J. S. Giordano, Jr., *J. Biol. Chem.* 244, 285 (1969); L. J. Greene u. D. C. Bartelt, *ibid.* 244, 2646 (1969).

[92] H. Tchesche, E. Wachter, S. Kupfer, R. Obermeier, G. Reidel, G. Haenisch u. M. Schneider in [24], S. 207.

[93] R. W. Sealock u. M. Laskowski, Jr., *Biochemistry* 8, 3703 (1969).

[94] H. Tchesche u. Th. Dietl in [209].

[95] M. Righi in [24], S. 74.

[96] U. DeV. Bidlingmeyer, T. R. Leary u. M. Laskowski, Jr., *Biochemistry* 11, 3303 (1972).

[97] J. A. Luthy, M. Praissman, W. R. Finkenstadt u. M. Laskowski, Jr., *J. Biol. Chem.* 248, 1760 (1973).

[98] W. R. Finkenstadt u. M. Laskowski, Jr., *J. Biol. Chem.* 242, 771 (1967); H. F. Hixson, Jr. u. M. Laskowski, Jr., *ibid.* 245, 2027 (1970).

[99] C. W. Nickamp, H. F. Hixson, Jr. u. M. Laskowski, Jr., *Biochemistry* 8, 16 (1969).

[100] M. Righi u. L. J. Greene, *J. Biol. Chem.* 243, 5457 (1968).

[101] H. Tchesche u. R. Obermeier in [24], S. 135.

[102] L. F. Kress, K. A. Wilson u. M. Laskowski, Sr., *J. Biol. Chem.* **243**, 1758 (1968).

[103] M. Laskowski, Jr., R. W. Duran, W. R. Finkenstadt, S. Herbert, H. F. Hixon, Jr., D. Kowalski, J. A. Luthy, J. A. Matis, R. E. McKee u. C. W. Niekamp in [24], S. 117.

[104] W. R. Finkenstadt u. M. Laskowski, Jr., Abstracts of Papers, 162nd National Meeting of the Amer. Chem. Soc., Washington D. C., Sept. 1971, No. Biol. 231.

[105] N. C. Robinson, R. W. Tye, H. Neurath u. D. A. Walsh, *Biochemistry* **10**, 2743 (1971).

[106] V. Frattali u. R. F. Steiner, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **34**, 480 (1969).

[107] F. A. Anderer u. S. Hörnle, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **146**, 381 (1968).

[108] H. Jering u. H. Tschesche, unveröffentlicht.

[109] D. Shotton, *New Scientist* **45**, 546 (1970); in [24], S. 47.

[110] B. Kassell u. R. B. Chow, *Biochemistry* **5**, 3449 (1966).

[111] H. Fritz, E. Fink, M. Gebhardt, K. Hochstrasser u. E. Werle, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **350**, 933 (1969).

[112] D. Kowalski u. M. Laskowski, Jr., *Biochemistry* **11**, 3451 (1972).

[113] H. Fritz, H. Schulte, R. Meister u. E. Werle, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **350**, 1531 (1969).

[114] H. Tschesche, H. Jering u. R. Schorp, unveröffentlichte Ergebnisse.

[115] H. Tschesche u. E. Wachter, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **351**, 1449 (1970).

[116] B. Kassell u. M. Laskowski, Sr., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **17**, 792 (1964); B. Kassell, M. Radicetic, M. J. Ansfield u. M. Laskowski, Sr., *ibid.* **18**, 255 (1965); B. Kassell u. M. Laskowski, Sr., *ibid.* **20**, 463 (1965).

[117] J. Chauvet, G. Nouvel u. R. Acher, *Biochim. Biophys. Acta* **92**, 200 (1964); J. Chauvet u. R. Acher, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **49**, 985 (1967).

[118] V. Dlouhá, P. Pospíšilová, B. Meloun u. F. Šorm, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **33**, 1363 (1968).

[119] F. A. Anderer, Z. Naturforsch. **20b**, 499 (1965); F. A. Anderer u. S. Hörnle, *J. Biol. Chem.* **241**, 1568 (1966).

[120] H. Tschesche u. E. Wachter, *Eur. J. Biochem.* **16**, 187 (1970).

[121] D. C. Bartelt u. L. J. Greene, *J. Biol. Chem.* **246**, 2218 (1971).

[122] K. Hochstrasser, W. Schramm, H. Fritz, S. Schwarz u. E. Werle, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **350**, 893 (1969).

[123] H. Tschesche u. G. Haenisch, *FEBS Lett.* **11**, 209 (1970).

[124] P. Portmann u. W. Fraefel, *Helv. Chim. Acta* **50**, 2078 (1967).

[125] W. Fraefel u. R. Acher, *Biochim. Biophys. Acta* **154**, 615 (1968).

[126] T. Koide, S. Tsunashima u. T. Ikenaka, *J. Biochem.* **71**, 165 (1972).

[127] D. E. Bowman, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **63**, 547 (1946).

[128] S. Odani, T. Koide u. T. Ikenaka, *Proc. Jap. Acad.* **47**, 621 (1971).

[129] G. Jones, S. Moore u. W. H. Stein, *Biochemistry* **2**, 66 (1963); R. Haynes u. R. E. Feeney, *J. Biol. Chem.* **242**, 5378 (1967).

[130] C. G. L. Tan u. F. C. Stevens, *Eur. J. Biochem.* **18**, 503, 515 (1971).

[131] K. Hochstrasser, K. Ilchmann u. E. Werle, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **351**, 1503 (1970).

[132] K. Hochstrasser, K. Ilchmann u. E. Werle, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **351**, 721 (1970).

[133] M. O. Dayhoff u. R. V. Eck: *Atlas of Protein Sequence and Structure*, National Biomedical Research Foundation, Silver Spring, Maryland 1972, D-169.

[134] L. J. Greene u. O. Guy in [24], S. 201.

[135] O. Guy, R. Shapanaka u. L. J. Greene, *J. Biol. Chem.* **246**, 7740 (1971).

[136] H. Tschesche, M. Schneider, G. Reidel u. H. Klein, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **353**, 763 (1972).

[137] A. Induni, Dissertation, Universität Freiburg (Schweiz) 1969; A. Induni in [20], S. 879.

[138] J. R. Brown, N. Lerman u. Z. Bohak, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **23**, 561 (1966).

[139] R. Huber, D. Kukla, A. Rühlmann, O. Epp u. H. Formanek, *Naturwissenschaften* **57**, 389 (1970).

[140] R. Huber, D. Kukla, A. Rühlmann u. W. Steigemann in [24], S. 56.

[141] R. Huber, D. Kukla, A. Rühlmann u. W. Steigemann, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **36**, 141 (1971).

[142] D. M. Blow, C. S. Wright, D. Kukla, A. Rühlmann, W. Steigemann u. R. Huber, *J. Mol. Biol.* **69**, 137 (1972).

[143] R. M. Stroud, L. M. Kay u. R. E. Dickerson, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **36**, 125 (1971).

[144] R. Henderson, *J. Mol. Biol.* **54**, 341 (1970).

[145] D. M. Blow, J. J. Birktoft u. B. S. Hartley, *Nature* **221**, 337 (1969).

[146] R. E. Feeney in [24], S. 162.

[147] G. Feinstein u. R. E. Feeney, *J. Biol. Chem.* **241**, 5183 (1966).

[148] R. J. Foster u. C. A. Ryan, *Fed. Proc.* **24**, 473 (1965).

[149] V. Dlouhá u. B. Keil, *FEBS Lett.* **3**, 137 (1969).

[150] J. P. Vincent u. M. Lazdunski, *Biochemistry* **11**, 2967 (1972).

[151] H. Fritz, H. Schießler, B. Förg-Brey, H. Tschesche u. E. Fink, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **353**, 1013 (1972).

[152] H. Fritz, B. Förg-Brey, M. Meier, M. Arnhold u. H. Tschesche, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **353**, 1950 (1972).

[153] C. C. Yip, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **68**, 1312 (1971).

[154] H. Tschesche u. F. Fiedler, unveröffentlichte Ergebnisse.

[155] R. E. Feeney, G. E. Means u. J. C. Bigler, *J. Biol. Chem.* **244**, 1957 (1969).

[156] C. Figarella, G. A. Negri u. O. Guy, persönliche Mitteilung.

[157] L. J. Greene u. M. H. Puhols in [24], S. 196.

[158] F. C. Wu u. M. Laskowski, Sr., *J. Biol. Chem.* **213**, 609 (1955).

[159] H. Deisenhofer u. W. Steigemann, unveröffentlichte Ergebnisse.

[160] N. Sevilla u. M. Rigbi, *Israel J. Chem.* **7**, 130p (1969).

[161] T. Ogawa, T. Higasa u. T. Hata, *Agr. Biol. Chem.* **32**, 484 (1968).

[162] Y. Birk, A. Gertler u. S. Khalef, *Biochim. Biophys. Acta* **147**, 402 (1967).

[163] C. A. Ryan u. J. J. Clary, *Arch. Biochem. Biophys.* **108**, 169 (1964).

[164] F. C. Stevens, *Proc. Can. Fed. Biol. Soc.* **12**, 16 (1969).

[165] R. Haynes u. R. E. Feeney, *J. Biol. Chem.* **242**, 5378 (1967); R. Haynes, D. T. Osuga u. R. E. Feeney, *Biochemistry* **6**, 541 (1967).

[166] A. Puzta, *Eur. J. Biochem.* **5**, 232 (1968).

[167] Y. Tomimatsu, J. J. Clary u. J. J. Burtulorich, *Arch. Biochem. Biophys.* **115**, 536 (1966).

[168] M. B. Rhodes, N. Bennett u. R. E. Feeney, *J. Biol. Chem.* **235**, 1686 (1960).

[169] T. W. Mehl, W. O'Connell u. J. Degroot, *Science* **145**, 821 (1964).

[170] B. J. Haverback, B. Dyce, H. F. Bundy, S. K. Wirtschafter u. H. A. Edmondson, *J. Clin. Invest.* **41**, 972 (1962).

[171] P. J. Burck, R. L. Hamill, E. W. Cerwinsky u. E. L. Grinnan, *Biochemistry* **6**, 3180 (1967).

[172] H. Tschesche, S. Kupfer, O. Lengel, M. Meier u. H. Fritz in [209].

[173] B. Kassell u. M. Laskowski, Sr., *Fed. Proc.* **24**, 593 (1965).

[174] B. Kassell u. T.-W. Wang in [24], S. 89.

[175] H. Tschesche, M. Schneider u. G. Reidel in [209].

[176] Y. Shain u. A. M. Mayer, *Physiol. Plant.* **18**, 853 (1965).

[177] V. Mansfeld, A. Ziegelhöffer, Z. Horakova u. J. Hladové, *Naturwissenschaften* **46**, 172 (1959).

[178] E. Werle, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **338**, 228 (1964).

[179] M. Laskowski, Jr. u. M. Laskowski, Sr., *J. Biol. Chem.* **190**, 563 (1951); M. Laskowski, Sr., B. Kassell u. G. Hagerty, *Biochim. Biophys. Acta* **24**, 300 (1957).

[180] L. Schneider u. J. Szathmary, *Z. Immunitätsforsch.* **94**, 465 (1938); **95**, 169, 177, 189 (1939); **98**, 24 (1940).

[181] H. Fritz, B. Förg-Brey, E. Fink, H. Schießler, E. Jaumann u. M. Arnhold, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **353**, 1007 (1972); H. Fritz, B. Förg-Brey, M. Meier, M. Arnhold u. H. Tschesche, *ibid.* **353**, 1950 (1972).

[182] L. J. D. Zanereld, R. T. Robertson, M. Kessler u. W. L. Williams, *J. Reprod. Fert.* **25**, 387 (1971).

[183] R. L. Stambaugh in K. S. Moghissi u. E. S. E. Hafez: *Biology of Mammalian Fertilization and Implantation*, Charles C. Thomas, Springfield, Ill. 1972.

[184] H. Fritz, E. Fink u. R. Marx in R. Marx u. H. A. Thies: *Sexualhormone und Blutgerinnung*, Schattauer, Stuttgart 1971, S. 33.

[185] L. J. Zanereld, R. T. Robertson u. W. L. Williams, *FEBS Lett.* **11**, 345 (1970).

[186] R. Stambaugh, B. G. Brackett u. L. Mastroianni, *Biol. Reprod.* **1**, 223 (1969).

[187] H. Haendle, H. Fritz, I. Trautschold u. E. Werle, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **343**, 185 (1965).

[188] J. Bodman, *Clin. Chim. Acta* **3**, 108 (1958).

[189] E. Geiringer, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **108**, 658 (1961); P. G. Stansley u. D. S. Ramsey, *Cancer Res.* **17**, 572 (1957); J. S. Ram, L. Terminello, M. Bier u. F. F. Nord, *Arch. Biochem. Biophys.* **52**, 451 (1954).

[190] G. F. B. Schumacher in [24], S. 253.

[191] F. Fritz, N. Heimbürger, M. Meier, M. Arnhold, L. J. D. Zanereld u. G. F. B. Schumacher, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **353**, 1953 (1972).

[192] J. M. Bedford, *Reprod. Biology. Excerpta Medica*, Amsterdam 1972; K. Conrad, J. Buckley u. R. J. Stambaugh, *J. Reprod. Fert.* **27**, 133 (1971).

[193] H. Tschesche, A. v. Rücker, H. Schießler u. H. Fritz, unveröffentlichte Ergebnisse.

[194] C. B. Laurell u. S. Eriksson, *Clin. Chim. Acta* 11, 395 (1965); S. Eriksson, *Acta Med. Scand.* 177, Suppl. 432 (1965).

[195] C. A. Ryan, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44, 1265 (1971).

[196] K. Hochstrasser, H. Feuth u. E. Werle, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 353, 855 (1972).

[197] B. M. Braganza, Y. M. Sambray u. R. J. Sambray, *Eur. J. Biochem.* 13, 410 (1970).

[198] A. Rühlmann, D. Kukla, P. Schwager, K. Bartels u. R. Huber, *J. Mol. Biol.* 77, 417 (1973).

[199] J. J. Birktoft u. D. M. Blow, *J. Mol. Biol.* 68, 187 (1972).

[200] R. M. Sweet, J. Janin u. D. M. Blow in [209].

[201] R. Henderson, C. S. Wright, G. P. Hess u. D. M. Blow, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 36, 63 (1971).

[202] H. Fritz, E. Jaumann, R. Meister, P. Pasquay, K. Hochstrasser u. E. Fink in [24], S. 257.

[203] H. Tschesche, O. Lengel, W. D. Schleuning u. H. Fritz, unveröffentlichte Ergebnisse.

[204] I. F. Kress u. M. Laskowski, Sr. in [209]; N. Heimburger, persönliche Mitteilung.

[205] S. L. Schneider u. M. Laskowski, Sr. in [209].

[206] H. Haendle, H. Ingrisch u. E. Werle, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 351, 545 (1970).

[207] N. Heimburger u. H. Trobisch, *Angew. Chem.* 83, 89 (1971); *Angew. Chem. internat. Edit.* 10, 85 (1971).

[208] H. D. Belitz, H. P. Wässner u. J. Weder, *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* 137, 211 (1968); H. H. Ortanderl u. H. D. Belitz, *Lebensm.-Wiss. Technol.* 4, 85 (1971); J. Weder u. H. D. Hory, *ibid.* 5, 54, 86 (1972).

[209] H. Fritz, H. Tschesche, L. J. Greene u. E. Truscheit: Proteinase Inhibitors. Proceedings of the Second International Research Conference - Bayer Symposium V. Springer, Berlin 1974, im Druck.

[210] K. A. Wilson u. M. Laskowski, Sr. in [209].

[211] T. R. Leary u. M. Laskowski, Jr., Abstract Papers, Amer. Chem. Soc. Meeting 1973.

[212] D. Kowalski, T. R. Leary, R. E. McKee, R. W. Sealock, D. Wang u. M. Laskowski, Jr. in [209].

[213] H. Tschesche u. H. Jering in [209].

[214] H. Tschesche u. T. Dietl in [209].

[215] T. Dietl u. H. Tschesche, noch unveröffentlicht.

[216] T. R. Green u. C. A. Ryan, *Science* 175, 776 (1972).

[217] C. A. Ryan in [209].

[218] H. P. Schnebli u. M. Burger in [209].

[219] H. Tschesche, K. Kolb, E. Standl u. T. Dietl in [209].

[220] H. Tschesche u. J. S. Brush in [209].

[221] J. S. Brush, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 53, 894 (1973).

[222] R. Shainkin u. Y. Birk, *Biochim. Biophys. Acta* 221, 502 (1970).

[223] A. A. M. Gribnau, J. G. G. Shoemaker, M. van Kraakamp, M. Hiltak u. H. Bloemendaal, *Biochim. Biophys. Acta* 224, 55 (1970); A. A. Gribnau, J. G. G. Shoemaker, M. van Kraakamp u. H. Bloemendaal, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 38, 1063 (1970); P. Lesca u. C. Paolletti, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 64, 913 (1969); U. S. Shapot, I. A. Chudinova, G. D. Krechetova u. I. Pushina, *FEBS Lett.* 13, 13 (1971).

[224] T. Ikenaka, S. Odani, M. Sakai u. Y. Nabeshima in [209].

[225] P. Hsiao Yu, M. R. Kula u. H. Tsai, *Eur. J. Biochem.*, im Druck.

[226] R. C. Roberts, W. A. Riesen u. P. K. Hall in [209].

[227] J. A. Mattis u. M. Laskowski, Jr., *Biochemistry* 12, 2239 (1973).

[228] S. Odani, T. Koide u. T. Ikenaka, *J. Biochem.* 71, 831 (1972).

[229] S. Odani u. T. Ikenaka, *J. Biochem.* 71, 839 (1972).

[230] S. Odani u. T. Ikenaka, *J. Biochem.* 74, 697 (1973).

[231] H. Jering u. H. Tschesche, unveröffentlicht.

[232] R. W. Sealock u. M. Laskowski, Jr., *Biochemistry* 12, 3139 (1973).

[233] J. Krah u. F. C. Stevens, *Biochemistry* 11, 1804 (1972); 12, 1330 (1973).

[234] F. C. Stevens, S. Wierz u. J. Krah in [209].

[235] D. J. Strydom, *Nature New Biol.* 243, 88 (1973).

[236] H. Takahashi, S. Iwanaga, Y. Hokama, T. Suzuki u. T. Kitawaga in [209].

[237] M. Laskowski, Jr., persönliche Mitteilung; M. Laskowski, Jr., et al. in [209].

[238] L. J. Greene u. D. C. Bartelt in [209].

[239] S. Odani u. T. Ikenaka, *J. Biochem.* 74, 857 (1973).

[240] T. Koide u. T. Ikenaka, *Eur. J. Biochem.* 32, 401, 417 (1973).

[241] T. Koide, S. Tsunasawa u. T. Ikenaka, *Eur. J. Biochem.* 32, 408 (1973).

[242] R. Huber, D. Kukla, W. Steigemann, J. Deisenhofer u. A. Jones in [209].

[243] R. J. Peanasky, G. M. Abu-Erreish, C. R. Gausch, G. A. Homandberg, D. O'Heeron, R. K. Linkenheil u. U. Kucich in [209].

[244] H. Schweitz, J. P. Vincent u. M. Lazdunski, *Biochemistry* 12, 2841 (1973).

[245] J. P. Vincent u. M. Lazdunski, *Eur. J. Biochem.* 38, 365 (1973).

[246] M. Laskowski, Jr., et al. in [209].

[247] M. Lazdunski, J. P. Vincent, H. Schweitz, M. Peron-Renner u. J. Pudles in [209].

[248] J. Engel, U. Quast, H. Heumann, G. Krause u. E. Steffen in [209]; J. Bieht in [209].

[249] E. Werle in [24].

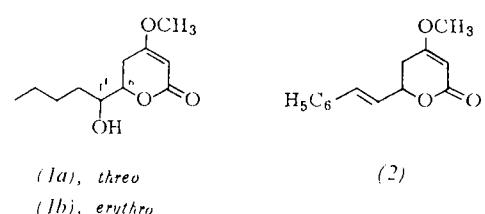
## ZUSCHRIFTEN

### Ergiebige Synthese von ( $\pm$ )-Pestalotin und ( $\pm$ )-Epipestalotin. Optisch reines ( $-$ )-Pestalotin durch asymmetrische Synthese<sup>\*\*</sup>

Von Dieter Seebach und Hartmut Meyer<sup>\*</sup>

Kimura et al.<sup>[1]</sup> isolierten Pestalotin (1), eine Substanz mit gibberellin-synergistischer Wirkung, aus dem phytopathogenen Pilz *Pestalotia cryptomeriaecola*. Ellestad et al.<sup>[2]</sup> konnten die gleiche Verbindung (LL-P880 $\alpha$ ) aus der unidentifizierten *Penicillium*-Spezies der Lederle-Kultur P880 isolieren. Für die Stereochemie machten sie die (6S,1'-S)-Konfiguration (1a)

( $[\alpha]_D = -86.2$ ) wahrscheinlich; inzwischen isolierte die Arbeitsgruppe zwei weitere 1'-Hydroxy-4-methoxy-dihydroxypropane als Metabolite aus derselben Quelle<sup>[3]</sup>. Methoxydihydroxypropane kommen in weiteren Naturstoffen vor, z. B. Kawain (2) in der Kawa-Wurzel. Diese Verbindungen wurden bisher durch Reformatsky-Synthese mit  $\beta$ -Methoxy- $\gamma$ -brom-crotonäureestern<sup>[1, 4]</sup> oder über Hydroxy-propiolsäureester<sup>[5]</sup> darge-



[\*] Prof. Dr. D. Seebach  
Institut für Organische Chemie  
Fachbereich 14 Chemie der Universität  
63 Gießen, Ludwigstraße 21

Dr. H. Meyer  
Institut für Organische Chemie der Technischen Universität  
Hannover

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.

stellt. Wir berichten hier über eine einfache und ergiebige Darstellung von (1), die auf Analoge übertragbar ist und es gestattet, ( $\pm$ )- sowie (+)- und (-)-Pestalotin (1a) und das diastereomere Epipestalotin (1b) zu erhalten.