

- [67] a) J. Chatt, R. C. Fay u. R. L. Richards, J. Chem. Soc. A 1971, 702;  
b) M. Mercer, R. H. Crabtree u. R. L. Richards, J. C. S. Chem. Comm. 1973, 808.
- [68] D. E. Harrison u. H. Taube, J. Amer. Chem. Soc. 89, 5706 (1967).
- [69] J. Chatt, G. J. Leigh u. R. L. Richards, J. Chem. Soc. A 1970, 2243.
- [70] a) C. M. Elson, J. Gulens u. J. A. Page, Can. J. Chem. 49, 207 (1971);  
b) A. Yamamoto, S. Kotazume, L. S. Pu u. S. Ikeda, J. Amer. Chem. Soc. 89, 3071 (1967).
- [71] J. N. Armor u. H. Taube, J. Amer. Chem. Soc. 92, 2560 (1970).
- [72] a) M. W. Bee, S. F. A. Kettle u. D. B. Powell, J. C. S. Chem. Comm. 1972, 767; b) J. E. Bercaw, E. Rosenberg u. J. D. Roberts, J. Amer. Chem. Soc. 96, 612 (1974).
- [73] G. D. Watt, J. Amer. Chem. Soc. 94, 7351 (1972).
- [74] J. Chatt, G. A. Heath u. R. L. Richards, J. C. S. Chem. Comm. 1972, 1010.
- [75] Vgl. [1c], dort S. 89, 90 und 101 sowie [1b].
- [76] A. Shilor, N. Denisor, O. Efimov, N. Shuvalov, N. Shuvalova u. A. Shilova,

- Nature 231, 460 (1971); vgl. auch: G. N. Schrauzer, P. A. Doemeny, R. H. Frazier u. G. W. Kiefer, J. Amer. Chem. Soc. 94, 7378 (1972).
- [77] S. N. Foner u. R. L. Hudson, J. Chem. Phys. 28, 719 (1958).
- [78] K. Rosengren u. G. C. Pimentel, J. Chem. Phys. 43, 507 (1965).
- [79] A. Trombetti, Can. J. Phys. 46, 1005 (1968).
- [80] N. Wiberg, H. Bachhuber u. G. Fischer, Angew. Chem. 84, 889 (1972); Angew. Chem. internat. Edit. 11, 829 (1972).
- [81] D. Sellmann, J. Organometal. Chem. 44, C 46 (1972).
- [82] D. Sellmann, A. Brandl u. R. Endell, J. Organometal. Chem. 49, C 22 (1973).
- [83] G. A. Heath, R. Mason u. K. M. Thomas, J. Amer. Chem. Soc. 96, 259 (1974).
- [84] D. Sellmann, A. Brandl u. R. Endell, Angew. Chem. 85, 1122 (1973); Angew. Chem. internat. Edit. 12, 1019 (1973).
- [85] D. Sellmann, A. Brandl u. R. Endell, Angew. Chem. 85, 1121 (1973); Angew. Chem. internat. Edit. 12, 1019 (1973).
- [86] Vgl. J. Alster u. L. A. Burnelle, J. Amer. Chem. Soc. 89, 1261 (1967); L. J. Schaad u. H. B. Kinser, J. Phys. Chem. 73, 1901 (1969); L. Radan, W. J. Hehre u. J. A. Pople, J. Amer. Chem. Soc. 93, 289 (1971).

## ZUSCHRIFTEN

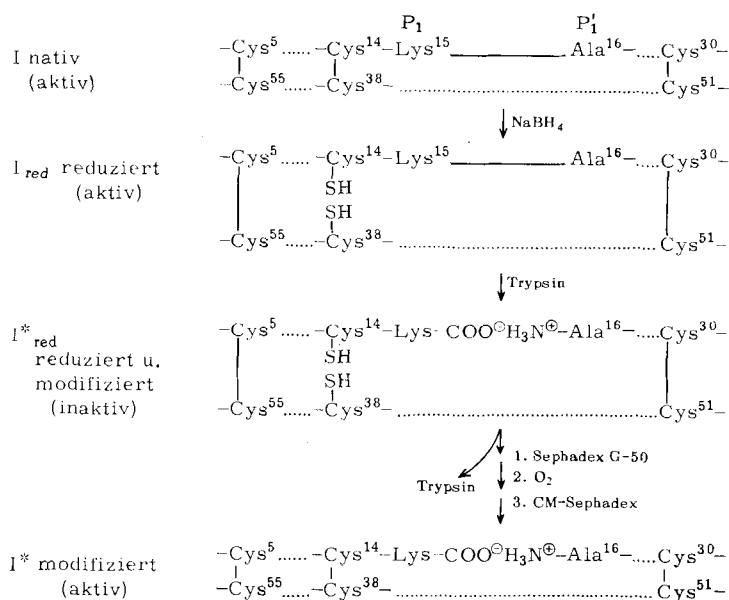
### Darstellung des aktiven Derivates von Rinder-Trypsin-Kallikrein-Inhibitor (Kunitz) mit im reaktiven Zentrum geöffneter Peptidbindung<sup>[\*\*]</sup>

Von Helmut Jering und Harald Tschesche<sup>[\*]</sup>

Unter den natürlichen, niedermolekularen Proteinase-Inhibitoren I<sup>[1, 2]</sup> nimmt die Klasse der Trypsin-Kallikrein-Inhibitoren (Typ Kunitz)<sup>[2, 3]</sup> eine Sonderstellung ein. In der Regel

unterliegen die Inhibitoren bei der substratanalogen Bindung an das Enzym einer teilweisen Proteolyse. Dabei wird die Peptidbindung —P<sub>1</sub>—P<sub>1</sub>'— im reaktiven Zentrum<sup>[1, 2]</sup> geöffnet, und es entstehen modifizierte Inhibitoren I\* mit noch voller Hemmaktivität. Diese Modifizierungsreaktion ließ sich bei den Trypsin-Kallikrein-Inhibitoren (Typ Kunitz) bisher nicht feststellen<sup>[1, 2, 4]</sup>.

Es gelang uns jetzt, auch aus einem Inhibitor vom Typ Kunitz die modifizierte Form I\* darzustellen. Dazu reduzierten wir



Schema 1

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

[\*\*] Vorgetragen anlässlich der 2nd International Research Conference „Proteinase Inhibitors“ Bayer Symposium V, Grosse Leuder, Oktober 1973. — Teil der Dissertation von H. Jering. Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt. Wir danken Fräulein C. Frank für die Durchführung der Aminosäure-Analysen. Der Bayer AG, Wuppertal, danken wir für die Überlassung von Trasylol® (Trypsin-Kallikrein-Inhibitor (Kunitz) aus Rinderlunge).

zunächst von den drei Disulfidbrücken selektiv die dem reaktiven Zentrum benachbarte Disulfidbrücke Cys 14—Cys 38 mit NaBH<sub>4</sub> in wässriger Lösung<sup>[5]</sup>. Der selektiv reduzierte Inhibitor wird von Trypsin durch sukzessive Spaltung der Bindungen Lys 15—Ala 16, Arg 39—Ala 40 und Arg 17—Ile 18 abgebaut, wobei die Spaltung der ersten Bindung den Inhibitor inaktiviert<sup>[5]</sup>. Um hauptsächlich nur die Bindung Lys 15—Ala 16 zu spalten, wurde selektiv reduzierter Inhibitor mit 20 Mol-% Trypsin bei pH=3.7 unter O<sub>2</sub>-Ausschluss (zur Vermeidung der Reoxidation der Disulfidbrücke Cys 14—Cys 38) nur so

lange inkubiert, bis überschüssiger Inhibitor inaktiviert war. Anschließend wurde das Trypsin durch Gelfiltration an Sephadex G-50 vom Inhibitor abgetrennt und die Disulfidbrücke Cys 14—Cys 38 durch  $O_2$  bei pH = 8.6 (0.1 M Na-Borat) wieder reoxidiert. Die Reinigung des modifizierten Inhibitors erfolgte an CM-Sephadex durch Ionenaustauschchromatographie mit einem NaCl-Gradienten bei pH = 8.6 (siehe Schema 1).

Die Struktur des modifizierten Rinder-Inhibitors I\* (Kunitz) ergibt sich aus folgenden Daten<sup>[6]</sup>: a) Gleiche Aminosäure-Zusammensetzung wie das Ausgangsmaterial I; b) einheitliche Bande in der Disc-Elektrophorese bei pH = 9.3; wegen der zusätzlichen negativen Ladung wandert I\* langsamer (70 % der Laufstrecke) als I; c) Perameisensäure-Oxidation und Isolierung der beiden entstehenden Polypeptidketten (Aminosäurereste 1–15 und 16–58); d) vollständige Inaktivierung von I\* durch Abspaltung von Lys 15 mit 0.03 Mol-% Carboxypeptidase B innerhalb einer Stunde bei Raumtemperatur; e) enzymatisch katalysierte Resynthese der Peptidbindung Lys 15—Ala 16 unter Rückgewinnung des Ausgangsmaterials I<sup>[7]</sup>.

Der modifizierte Inhibitor I\* hemmt die Enzyme Trypsin und Chymotrypsin (vom Rind), wobei sich aus Enzym und modifiziertem Inhibitor der gleiche Komplex bildet wie aus Enzym und nativem (unmodifiziertem) Inhibitor<sup>[8]</sup>. Die Quotienten der Geschwindigkeitskonstanten der Komplexbildung von nativem (k) und modifiziertem (k\*) Inhibitor sind jedoch für  $\alpha$ -Chymotrypsin ( $k/k^* = 2.2 \times 10^4$ ) und  $\beta$ -Trypsin ( $k/k^* = 50$ ) verschieden<sup>[8]</sup>.

Eingegangen am 18. Juni 1974,  
ergänzt am 16. Juli 1974 [Z 68a]

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

[2] H. Tschesche, Angew. Chem. 86, 21 (1974); Angew. Chem. internat. Edit. 13, 10 (1974).

[3] B. Kassel u. M. Laskowski, Sr., Biochem. Biophys. Res. Commun. 20, 463 (1965).

[4] H. Tschesche u. R. Obermeier in H. Fritz u. H. Tschesche: Proceedings of the International Research Conference on Proteinase Inhibitors, de Gruyter, Berlin 1971, S. 135.

[5] L. F. Kress u. M. Laskowski, Sr., J. Biol. Chem. 242, 4925 (1967); L. F. Kress, K. A. Wilson u. M. Laskowski, Sr., ibid. 246, 3555 (1971); W. K. Liu u. J. Meienhofer, Biochem. Biophys. Res. Commun. 31, 467 (1968).

[6] H. Tschesche, H. Jering, G. Schorp u. T. Dietl in H. Fritz, H. Tschesche, L. J. Greene u. E. Truscheit: Proteinase Inhibitors, 2nd International Research Conference – Bayer Symposium V, Springer, Berlin, im Druck.

[7] H. Jering u. H. Tschesche, Angew. Chem. 86, 703 (1974); Angew. Chem. internat. Edit. 13, Nr. 10 (1974).

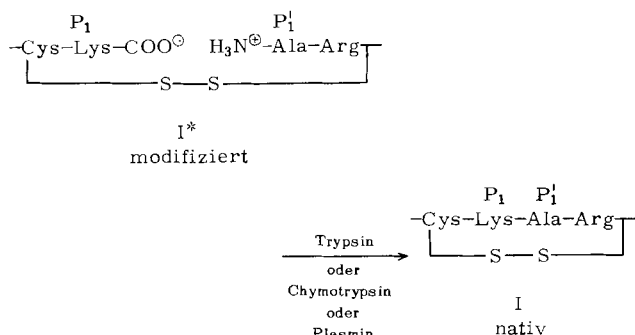
[8] U. Quast, J. Engel, E. Steffen, G. Mair, H. Tschesche u. H. Jering, Eur. J. Biochem., im Druck.

## Proteinase-katalysierte Resynthese der Peptidbindung Lys 15—Ala 16 im Derivat des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors (Kunitz) mit geöffneter Peptidbindung<sup>[\*\*]</sup>

Von Helmut Jering und Harald Tschesche<sup>[\*]</sup>

Die im modifizierten Trypsin-Kallikrein-Inhibitor I\* (Kunitz) aus Rinderorganen geöffnete Peptidbindung —P<sub>1</sub>—P'<sub>1</sub>— (Lys

15, Ala 16)<sup>[1]</sup> läßt sich mit Trypsin, Chymotrypsin oder Plasmin resynthetisieren. Zur Abkürzung der durch die langsame Dissoziation des Enzym-Inhibitor-Komplexes bedingten langen Reaktionszeiten (Halbwertszeit 17 Wochen<sup>[2]</sup>) wurden äquimolare Mengen Trypsin (Schwein) oder Chymotrypsin (Rind) bei pH = 7.8 (0.2 M Tris(2-hydroxyäthyl)ammoniumchlorid/NaOH, 0.01 M CaCl<sub>2</sub>) bei Raumtemperatur verwendet. Nach 1 h (Trypsin) bzw. 48 h (Chymotrypsin) wurden die Komplexe bei pH = 1.7 dissoziiert und Enzym und Inhibitor an Sephadex G-50 bei gleichem pH-Wert getrennt. In beiden Fällen isolierten wir neben dem Enzym ausschließlich nativen Inhibitor I mit intakter Peptidbindung —P<sub>1</sub>—P'<sub>1</sub>— (kinetisch kontrollierte Komplex-Dissoziation<sup>[3]</sup>). Eine vollständige Resynthese gelang auch mit katalytischen Mengen (20 Mol-%)  $\beta$ -Trypsin (Rind) bei Raumtemperatur und pH = 3.7 innerhalb 24 h (thermodynamisch kontrollierte Resynthese).



Die Struktur des Inhibitors mit resynthetisierter Peptidbindung geht daraus hervor, daß er in folgenden Daten mit dem nativen Inhibitor übereinstimmt: a) Aminosäure-Zusammensetzung; b) Wanderungstrecke des homogenen Inhibitors bei der Disc-Elektrophorese bei pH = 9.3; c) Perameisensäure-Oxidation und Gelfiltration an Sephadex G-50 ergeben nur eine Polypeptidkette (Aminosäuren 1–58); d) kinetische Konstanten der Komplexbildung mit Enzym (Hemmkurve)<sup>[4]</sup>; e) Differenzspektren der Komplexe von Enzym mit I sowie I\*<sup>[4]</sup>; g) Resistenz gegen Inaktivierung mit Carboxypeptidase B (2 Mol-% in 0.025 M Tris-HCl-Puffer, pH = 7.2, 24 h, 25 °C). Die Resynthese zeigt, daß unter thermodynamisch kontrollierten Bedingungen die Lage des enzymatisch katalysierten Proteolysegleichgewichtes für die Peptidbindung —P<sub>1</sub>—P'<sub>1</sub>— ganz auf der Seite des nativen Inhibitors ist. Dies erklärt die erfolglosen Bemühungen zur Darstellung des modifizierten Inhibitors durch direkte Partialproteolyse des nativen Proteins.

Die Resynthese der Peptidbindung Lys 15—Ala 16 mit katalytischen Mengen Trypsin, Chymotrypsin oder Plasmin beweist ferner, daß das reaktive Zentrum des Inhibitors für diese drei Enzyme gleich ist. Damit ist der Trypsin-Kallikrein-Inhibitor (Kunitz) als „single-headed“ zu klassifizieren<sup>[5, 6]</sup>.

Eingegangen am 18. Juni 1974,  
ergänzt am 16. Juli 1974 [Z 68b]

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

[\*\*] Vorgetragen anlässlich der 2nd International Research Conference „Proteinase Inhibitors“ – Bayer Symposium V, Grosse Lecler, Oktober 1973. Teil der Dissertation von H. Jering. – Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt. Wir danken Fräulein C. Frank für die Durchführung der Aminosäure-Analysen. Der Bayer AG, Wuppertal, danken wir für die Überlassung von Trasylol® (Trypsin-Kallikrein-Inhibitor (Kunitz) aus Rinderlungen).

[1] H. Jering u. H. Tschesche, Angew. Chem. 86, 702 (1974); Angew. Chem. internat. Edit. 13, Nr. 10 (1974).

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

[3] W. R. Finkenzstadt u. M. Laskowski, Jr., J. Biol. Chem. 242, 771 (1967).

[4] U. Quast, J. Engel, E. Steffen, G. Mair, H. Tschesche u. H. Jering, Eur. J. Biochem., im Druck.

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

[6] H. Tschesche, Angew. Chem. 86, 21 (1974); Angew. Chem. internat. Edit. 13, 10 (1974).