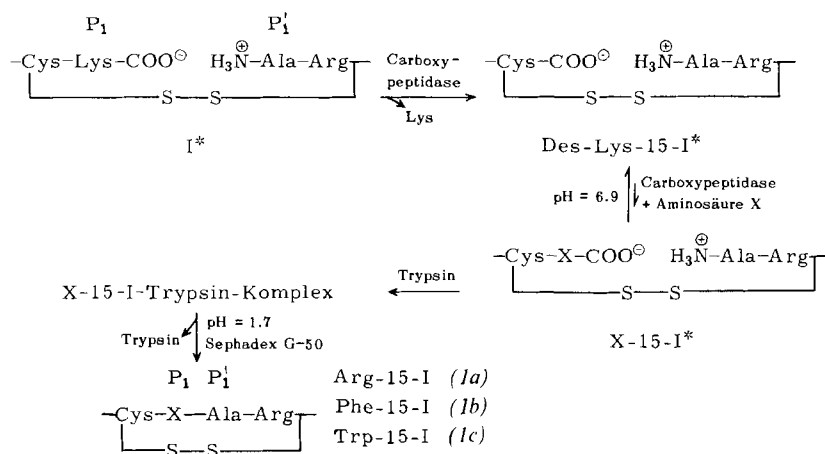


# Austausch von Lysin gegen Arginin, Phenylalanin und Tryptophan im reaktiven Zentrum des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors (Kunitz)<sup>[\*\*]</sup>

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

Die Abspaltung des Restes P<sub>1</sub> aus dem reaktiven Zentrum von modifizierten Proteinase-Inhibitoren I\* mit Carboxypeptidase B inaktiviert die Inhibitoren<sup>[1]</sup>. Mit der Abspaltung ist eine Verringerung der Assoziationskonstante K<sub>Ass</sub> (Bildung des Enzym-Inhibitor-Komplexes) um 5 bis 10 Zehnerpotenzen verbunden. Der Wiedereinbau des Restes P<sub>1</sub>, z. B. in der Rückreaktion der Carboxypeptidase-Abspaltung bei hohem Überschuß an freier Aminosäure P<sub>1</sub>, erhöht K<sub>Ass</sub> um den gleichen Betrag. In Gegenwart einer Proteinase (z. B. Trypsin) kann die hohe Assoziationskonstante der Komplexbildung (K<sub>Ass</sub> ≈ 10<sup>10</sup> bis 10<sup>14</sup> mol/l) zur Gleichgewichtsverschiebung der durch Carboxypeptidase katalysierten Reaktion, d. h. zum Wiedereinbau des Restes P<sub>1</sub>, genutzt werden<sup>[2, 3]</sup>.

säuern bei pH = 1.7 durch Molekularsiebfiltration an Sephadex G-50 in Enzym- und Inhibitorfraktionen getrennt. Durch Ionenaustauschchromatographie der Inhibitorfraktion an CM-Sephadex C-25 wurden 0.25 µmol unmodifizierter Arg-15-Trypsin-Kallikrein-Inhibitor (Kunitz) gewonnen (Schema 1). Der durch enzymatische Austauschreaktion erhaltene Arg-15-Inhibitor (1a) ist durch folgende Daten charakterisiert: a) Aminosäure-Zusammensetzung; b) einheitlich wandernde Bande in der Disc-Elektrophorese; c) völlige Resistenz gegen Inaktivierung durch Carboxypeptidase B (2 Mol-% für 2 Tage) und d) gleiche Hemmaktivität gegenüber den Enzymen Trypsin, Chymotrypsin und Plasmin wie der native Lysin-Inhibitor. Ob Unterschiede in den Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation zum Enzym-Inhibitor-Komplex zwischen nativem und Arg-15-Inhibitor vorliegen, wird zur Zeit untersucht. In analoger Reaktionsfolge gelang mit Carboxypeptidase A und Chymotrypsin unter entsprechenden Bedingungen der Einbau der Aminosäuren Phenylalanin und Tryptophan als Reste



Schema 1. Für den Arg-Einbau mit Trypsin wurde Carboxypeptidase B, für den Phe- und Trp-Einbau mit Chymotrypsin Carboxypeptidase A verwendet. (a), X = Arg; (b), X = Phe; (c), X = Trp.

Wir verwendeten diese Reaktion, um in den modifizierten Trypsin-Kallikrein-Inhibitor I\* (Kunitz)<sup>[4]</sup> nach Abspaltung des Lysinrestes 15 Arginin in Position 15 einzubauen (50 mg I\*, 20 Einheiten Carboxypeptidase-B-Merck in 1 ml 0.025 M Tris/HCl, pH = 7.2, 0.1 M NaCl, 16 h bei Raumtemperatur). Der modifizierte Des-Lys-15-Inhibitor ließ sich als in der Disc-Elektrophorese einheitliche Verbindung erhalten, die wegen des Fehlens einer positiven Ladung langsamer als I\* wandert und bei der Aminosäure-Analyse exakt ein Lysin weniger als I\* aufweist. Der modifizierte Des-Lys-15-Inhibitor ist im üblichen Test<sup>[5]</sup> gegenüber Trypsin inaktiv.

Zum Einbau von Arginin wurden 1.23 µmol Des-Lys-15-Inhibitor mit 2.46 µmol Trypsin (Schwein) und 0.02 µmol Carboxypeptidase B (Merck) bei pH = 6.9 in 2.4 ml Puffer (0.1 M Tris(2-hydroxyäthyl)ammoniumchlorid/NaOH, 0.15 M KCl, 0.03 M CaCl<sub>2</sub> und 0.01 M Na<sub>2</sub>N<sub>3</sub>) gelöst und mit 0.6 ml 0.25 M L-Arginin im gleichen Puffer 6 Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Der gebildete Trypsin-Inhibitor-Komplex wurde nach An-

P<sub>1</sub>. Im Gegensatz zu den Inhibitoren mit Lys oder Arg im reaktiven Zentrum sind die homologen Phe- und Trp-Inhibitoren (1b) bzw. (1c) schlechte Trypsin-, aber gute Chymotrypsin-Inhibitoren. Entsprechende Ergebnisse wurden mit dem Sojabohnen-Inhibitor (Kunitz) erhalten<sup>[2, 3]</sup>.

Der Arg-15-Inhibitor besitzt eine einsträngige Polypeptidkette und entspricht damit einem Protein mit der Mutation Lys 15 → Arg 15. Wir haben diese Mutation auch in den homologen Isoinhibitoren aus Schnecken (*Helix pomatia*) gefunden<sup>[6]</sup>.

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

[\*] 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

[\*\*] 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).

[1] W. R. Finkenzstadt u. M. Laskowski, Jr., J. Biol. Chem. 240, PC 962 (1965); M. Laskowski, Jr. u. R. W. Sealock in P. D. Boyer: The Enzymes. Vol. III, Academic Press, New York 1971, S. 375.

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

[3] D. Kowalski, T. R. Leary, R. E. McKee, R. W. Sealock, D. Wang u. M. Laskowski, Jr. in H. Fritz, H. Tschesche, L. J. Greene u. E. Trusheit: Proteinase Inhibitors, 2nd International Research Conference - Bayer Symposium V. Springer, Berlin, im Druck.

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

[5] H. Fritz, I. Trautshold u. E. Werle in H. U. Bergmeyer: Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim 1970. 2. Aufl., Vol. 1, S. 1011ff.

[6] H. Tschesche u. T. Dietl, Eur. J. Biochem. 30, 560 (1972); T. Dietl u. H. Tschesche in [3].