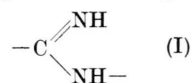


Besprechung der Ergebnisse

Bei den vorliegenden Versuchen gingen wir von der Frage aus, ob Strahlenschutz bei einer Bestrahlung von einzeln lebenden Zellen durch Verbindungen, die keine SH-Gruppen in ihrer Struktur enthalten und keine Reduktionseigenschaften zeigen, festgestellt werden können. Zu diesem Zwecke bestrahlten wir Suspensionen von *E. coli*, *Anthrax*, *B. Cereus*, *Candida albicans* und *Staph. aureus* in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen einiger aromatischer Amidine. Unsere bisherigen Ergebnisse scheinen dafür zu sprechen, daß alle von uns untersuchten Amidine einen starken Schutzeffekt besitzen, der dem des Cysteamins nahe liegt. Unserer Meinung

nach liegt wahrscheinlich die Amidinstruktur I den Strahlenschutz-Eigenschaften zugrunde.



Es ist merkwürdig, daß eine Verbindung, die bei gewissen Bakterienarten Strahlenschutzwirkung ausübt, sich bei anderen stark als Radiosensibilisator erweist. Der Erweiterung dieser Ergebnisse und eventuell ihrer weiteren theoretischen Klärung werden unsere zukünftigen Untersuchungen gewidmet sein.

³ ST. ROBEV, C. R. Acad. Sci. (Bulgarien) **8**, 2, 29 [1955].

⁴ ST. ROBEV, Dokl. Akad. Nauk USSR **101**, 277 [1955].

⁵ ST. ROBEV, Chem. Ber. **91**, 244 [1958].

Über einen Hemmkörper für Kallikrein und verschiedene Proteinase aus Rinderleber II*

VON E. WERLE und W. APPEL **

Aus dem wissenschaftlichen Laboratorium der Chirurgischen Klinik der Universität München
(Z. Naturforschg. **14 b**, 385—392 [1959]; eingegangen am 10. März 1959)

Das Vorkommen des Kallikrein-Inaktivators (KI) wurde in verschiedenen Organen von 23 Spezies (einschließlich Mensch) untersucht. Der KI wurde praktisch nur bei den Wiederkäuern gefunden. Das Blutserum enthielt bei allen untersuchten Arten einen Kallikrein-Inaktivator sowie einen vom KI verschiedenen Trypsin-Inhibitor. KI-haltige Organextrakte enthielten auch Trypsin-Inhibitor (TI). Das Verhältnis KI : TI war in gewissen Grenzen konstant. Der KI wurde aus Rinderleber bis zur Einheitlichkeit gereinigt. Dabei blieb die Inhibitorwirkung für Trypsin erhalten.

Das Anreicherungsverfahren, es führt über enteiweißende Extraktion mit Trichloressigsäure — Fraktionierungen mit Ammoniumsulfat und Pikrinsäure — Anionen- und Kationenaustausch-Chromatographie — präparative Papierchromatographie — wird genau beschrieben. Anreicherung etwa 10 000—20 000-fach. 1,0 g des einheitlichen Kallikrein-Trypsin-Inhibitors entspricht 2 000 000 KIE und 4 000 000 TIE. Ausbeute etwa 5 Prozent. Bei etwa 10-mal geringerem Reinheitsgrad, der nach der 8. Stufe erreicht wird, beträgt die Ausbeute etwa 30—50 Prozent.

Stark angereicherte Lösungen des Kallikrein-Inaktivators aus Lymph- und Ohrspeicheldrüsen von Rindern haben eine sehr ausgeprägte Hemmwirkung für Trypsin^{1,2}. Wenn Kallikrein-Inaktivierung und Trypsin-Hemmung auf ein und dieselbe Substanz zurückgehen, so muß in allen Organextrakten, die den Kallikrein-Inaktivator enthalten, auch ein Inhibitor für Trypsin nachweisbar sein. Unsere Untersuchungen haben ergeben, daß dies der Fall ist. Die aufgeworfene Frage war aber nur nach der Isolierung des Kallikrein-Inaktivators in Reinsubstanz entscheidbar.

Im folgenden werden Nachweis und quantitative Bestimmung des Kallikrein-Trypsin-Inhibitors, seine Verbreitung in tierischem Material sowie seine Isolierung beschrieben.

Methodik

a) Bestimmung der Inaktivatorwirkung von Organextrakten für Kallikrein

Eine Kallikrein-Inaktivator-Einheit (1 KIE)^{***} ist diejenige Menge KI, die bei pH 7,2 (eingestellt mit 0,067-m. Phosphatpuffer) und 37° C innerhalb einer Stde. eine Kallikrein-Einheit (1 KE) zu 50% inaktiviert.

* Siehe dazu die kurze Originalmitteilung von E. WERLE und W. APPEL in Naturwissenschaften **45**, 60 [1958].

** Derzeitige Anschrift: Institut für Siliciumchemie der Universität Marburg, Marburg/Lahn.

¹ E. K. FREY, H. KRAUT u. E. WERLE, „Padutin“ (Kallikrein), Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1950.

² E. WERLE, L. MAIER u. R. RINGELMANN, Naturwissenschaften **39**, 328 [1952].

^{***} Wir verwenden in dieser Abhandlung die Abkürzungen: KI=Kallikrein-Inaktivator, K=Kallikrein, TI=Trypsin-Inhibitor und HK=Hemmkörper für beide Substanzen. TES=Trichloressigsäure. Weitere Abkürzungen sind im Text erläutert.

Die Bestimmung der Kallikrein-Aktivität erfolgt jeweils am Carotisblutdruck des narkotisierten Hundes¹.

Der Reinheitsgrad eines KI-Präparates ist definiert als diejenige Gewichtsmenge organischer Substanz in mg, an die die Wirkung von 1 KIE gebunden ist.

b) Bestimmung der Inhibitorwirkung der Organextrakte für Trypsin

Die Bestimmung der Trypsin-Aktivität erfolgte unter Verwendung der etwas modifizierten Methode nach ANSON³. Als Substrat diente harnstoff-denaturiertes Rinderhämoglobin. Die zu testenden TI-Lösungen (TI + dest. Wasser ad 1,0 ml) wurden jeweils 10 Min. mit 0,200 mg Trypsin (= 0,2 ml)**** bei pH 7,2 und 37,0°C vorinkubiert, dann wurden 5,0 ml der Substratlösung 10 Min. bei pH 7,2 und 37,0°C verdaut. Das verbleibende Protein wurde mit 10,0 ml einer 0,3-m. TES-Lösung gefällt und nach 10 Min. filtriert. Die Tyrosin + Tryptophanmenge des Filtrats wurde mit dem Phenol-Reagens von FOLIN-CIOCALTEU am Beckman-Spektrophotometer bei 6600 Å bestimmt.

Zur Berechnung wurde von dem Extinktionswert nach 10 Min. Verdauung der Leerwert (= Extinktionswert bei 0 Min. Verdauung) subtrahiert. Der erhaltene Wert (= „10-Minutenwert“) eines Trypsin-Ansatzes ohne TI wurde gleich 100% gesetzt, die „10-Minutenwerte“ nach Zusatz verschiedener Mengen TI darauf bezogen und in „% Hemmung“ angegeben. Nach graphischer Interpolation an Hand einer „Hemmkurve“ (Ordinate: % Hemmung, Abszisse: TI-Konzentration – Abb. 1) erhält man einen Wert für diejenige TI-Menge, die genau zu 50% hemmt.

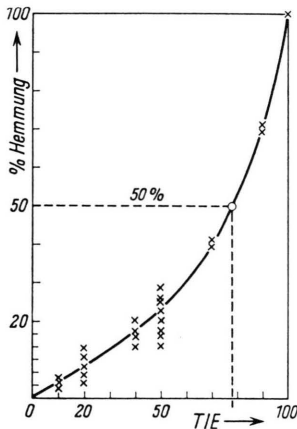


Abb. 1. „Kurve“ der Trypsin-Hemmung. Abszisse: Konzentration des Hemmkörpers in Trypsin-Inhibitor-Einheiten (TIE). Ordinate: Hemmungsgrad in Prozent. Zur Demonstration der Streuung sind die jeweils gefundenen Hemmwerte gegenüberer TI-Konzentrationen aufgeführt.

Die Trypsin-Hemmkapazität wird in Trypsin-Inhibitor-Einheiten (TIE) ausgedrückt. Eine TIE enthält die-

jenige Menge Substanz, die 1 γ Trypsin unter den gegebenen Standardbedingungen zu 50% hemmt.

I. Vorkommen des Kallikrein-Inaktivators und Trypsin-Inhibitors in tierischen Organen und Körperflüssigkeiten *

Die Organe wurden möglichst frisch aufgearbeitet. Bei Extraktion mit TES wurde je 1 g Organ zuerst mit 1 ml Wasser und dann weiter mit 2 ml 10-proz. TES homogenisiert. Die Homogenate wurden zentrifugiert, die TES ausgeäthert und die verbleibende Lösung mit NaOH vorsichtig neutralisiert. Wurde mit Wasser oder Essigsäure extrahiert, so wurden die Organe in dem 3–5-fachen Volumen (g/v) des Extraktionsmittels homogenisiert, vorsichtig neutralisiert und vom Ungelösten abzentrifugiert. Der KI- und TI-Gehalt der Homogenate und Extrakte wurde, wie unter a und b beschrieben, bestimmt.

Im folgenden sind die Tierarten und Organe zusammengestellt, in denen der Inaktivator in meßbaren Mengen angetroffen wurde. Das jeweilige Extraktionsmittel ist in Klammern angegeben: (W) = Wasser, (T) = 10-proz. TES, (E) = 0,02-n. Essigsäure. Die Zahlenangaben bedeuten KIE/g Organfrischgewicht.

Rind: Leber (W) 200–400; (T) 200–400. Milz (W) 40–100; (E) 40–100. Niere (T) 80 bis 200. Parotis (E) 400. Lymphdrüsen (E) 80 bis 800. Schilddrüse (T) 400–800. Pankreas (T) 200 bis 600. Thymus (T) 30. Knochenmark (W) 3–10. Großhirn (T) 20. Magenschleimhaut (T) 80–120. Aorta (W) 3–30. Darm (T) 200–250. Muskel (T) 120–320. Haut (T) 20. Ovar (T) 200–400. Euter (W) 30. Colostrum 2–7. Blutserum 8–12.

Schaf: Milz (T) 50–160; (W) 30–150. Parotis (E) 10–50. Schilddrüse (T) 15. Darm (T) 120–160.

Ziege: Leber (W) 100. Milz (W) 10–90; (E) 80–160. Lymphdrüsen (W) 10.

Reh: Milz (W) 0–50.

Hirsch: Milz (W) 75–100. Parotis (W) 0–10. Lymphdrüsen (W) 10.

Schwein: Schilddrüse (T) 12. Ovar (T) 12. Pankreas (T) 10. Serum 10.

In Bestätigung und Erweiterung früherer Befunde¹ findet sich der KI in größeren Mengen nur in Organen einiger Wiederkäuer. Eine Ausnahme macht das Blutserum, das bei *allen* untersuchten

(W.) einen Inaktivator für Kallikrein und Trypsin in sehr hoher Konzentration in der Rinderlunge nachgewiesen und angereichert.

³ M. ANSON u. A. MIRSKY, J. gen. Physiol. **22**, 79 [1939].

**** Trypsin „Worthington“, 2-mal kristallisiert, salzfrei.

* An m. b. d. Korr.: Inzwischen hat der eine von uns

Tierarten, sogar bei Kaltblütern (Fisch, Frosch, Schildkröte und Weinbergschnecke⁴) KI enthält. In Organen vom Menschen, von Pferd, Hund, Katze, Kaninchen, Rentier, Elch, Gemse, Meerschweinchen, Ratte, Maus, Goldhamster, Huhn, Ente, Taube, Frosch, Fisch und Schildkröte wurde der KI nicht angetroffen. Es wurden untersucht: Leber, Lunge, Niere, Milz, Darm, Magen, Muskulatur, Pankreas, Thymus, Schilddrüse, Submaxillaris-Drüse, Parotis, Lymphdrüsen, Knochenmark, Euter, Speichel und Colostrum, in Einzelfällen auch andere Organe, wie Ovar, Haut, Aorta, Groß- und Kleinhirn u. a. sowie Sperma.

Eine größere Reihe KI-haltiger Organe und Flüssigkeiten wurde auch auf Hemmfähigkeit für Trypsin untersucht. Im folgenden sind die KI (jeweils 1. Zahl)- und TI-Werte gegenübergestellt. Die Grenze der Nachweisbarkeit liegt für den KI bei 10 KIE/g, für den TI bei 30 TIE/g Frischgewebe.

Rind: Leber 200–400 : 150–300. Milz 40 bis 100 : 200. Niere 80–200 : 0–150. Kleinhirn 10 : 0. Pankreas 200–600 : 400. Lymphdrüsen 100 : 200. Schilddrüse 400–800 : 1000. Parotis 400 : 300–400. Magen 120–160 : 0. Magenschleimhaut 80–120 : 0. Magenmuskel 600 : 70. Darm 200–250 : 300–550. Muskel 120–320 : 0–400. Haut 20 : 0. Ovar 200–400 : 400. Colostrum 2–7 : 400.

Schaf: Leber 0 : 0*. Milz 50–160 : 100–300. Schilddrüse 15 : 0. Pankreas 0 : 0.

Schwein: Pankreas 10 : 200. Magen 0 : 0. Darm 0 : 0. Haut 0 : 0.

Pferd: Lymphdrüsen 0 : 0*. Parotis 0 : 0*. Serum bei p_H 5,0 15 : 1000–1500; bei p_H 7,2 10 : 1000–1500.

Kaninchen: Serum 5–10 : 300–1400.

Hund: Lymphe 10** : 200.

Mensch: Serum 5–10 : 300–1400. Lymphe 0 : 0.

Die Hemmfähigkeit für Kallikrein und Trypsin tritt, wie schon erwähnt, stets vergesellschaftet auf. Das bei den einheitlichen Präparaten des HK festgestellte Verhältnis von Kallikrein-Inaktivierung zu Trypsin-Hemmung findet sich größenordnungs-

mäßig gewahrt (1 g des einheitlichen HK entspricht etwa 2 000 000 KIE und 4 000 000 TIE) auch in den Organen. Eine Ausnahme macht neben dem Magen auch hier das Serum, das neben dem Kallikrein-Inaktivator einen besonderen Trypsin-Inhibitor enthält. In den bisher untersuchten Seren wurden 300–1700 TIE/ml (in der Lymphe des Hundes 200 TIE/ml) gegenüber 5–10 KIE/ml Serum (10 KIE/ml Lymphe) festgestellt. Auch im Pankreas kann neben dem Kallikrein- und Trypsinhemmkörper noch ein weiterer Trypsin-Inhibitor vorkommen.

II. Anreicherung des Hemmkörpers für Trypsin und Kallikrein ***

Für die Isolierung des HK kommt neben den Ohrspeicheldrüsen⁵ die Milz⁶ und die Leber von Rindern in Betracht. Es wurde die Leber gewählt und dabei in Kauf genommen, daß der HK von großen Mengen der verschiedensten Begleitsubstanzen abgetrennt werden muß. Der HK-Gehalt der Lebern schwankt sowohl von Tier zu Tier als auch in Abhängigkeit von der Jahreszeit: er beträgt im Frühjahr und Winter 30–50% des übrigen Jahresdurchschnitts von 200–400 KIE/g.

1. Bereitung eines Homogenats und Enteiweißung

Die zur Aufarbeitung bestimmten Rinderlebern sollen möglichst ausgeblutet sein. Werden sie nicht sofort verarbeitet, so können sie monatelang ohne HK-Verlust bei -15°C eingefroren werden. Die Lebern werden ohne Wasserzusatz homogenisiert und mit dem gleichen Volumen (v/v) 10-proz. TES enteiweißt. Der abzentrifugierte Niederschlag wird zweimal mit dem gleichen Volumen (v/v) 0,1-proz. TES ausgewaschen, evtl. unter nochmaligem Homogenisieren. Die Überstände der Fällung enthalten zwischen 70–100% der in der Frischleber enthaltenen HK-Menge, der Reinheitsgrad liegt zwischen 0,200–0,500 mg/KIE, die Konzentration zwischen 50–600 KIE/ml; Anreicherung etwa 2–3-fach.

Versuche, den HK mit Salzlösungen, Säuren, Alkalien oder organischen Solventien in guten Ausbeuten aus der Leber zu extrahieren, schlugen fehl. Ebenso mißlangen Fraktionierungen von Leberhomogenaten mit organischen Solventien, Eiweiß- und Basen-Fällungsmitteln. Verfahren, die sich bei der Anreicherung des KI aus Lymph- und Ohrspeicheldrüsen bewährt haben, z. B. die Extraktion von

⁴ E. WERLE, W. APPEL u. H. HAPP, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pathol. Pharmacol. **234**, 364 [1958].

* Das Homogenat wird durch Trypsin abgebaut.

** Verschieden hohe Inaktivierungsfähigkeit für Harn- und Pankreaskallikrein.

*** E. WERLE u. W. APPEL, DBP 1 011 576 und 1 014 288.

⁵ H. KRAUT u. R. KÖRBELE-ENKhardt, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **309**, 244 [1957].

⁶ L. GARDNER u. W. W. WESTERFELD, Amer. J. Physiol. **142**, 541 [1944].

frischen oder mit Aceton/Äther getrockneten Organen mit Wasser und nachfolgende Enteiweißung der gewonnenen Extrakte mit TES, wie sie erstmals von GARDENER und WESTERFELD⁶ zur Anreicherung des KI aus Rindermilch angewandt wurde und wie sie in Untersuchungen von KRAUT und KOEBEL-ENKHARDT⁵ bei der Konzentrierung des KI aus Rinder-Ohrspeicheldrüsen erfolgreich war, erwiesen sich für die Anreicherung des KI aus Rinderleber als ungeeignet.

2. Entfernung der Lipoide und der Trichloressigsäure

Zur Entfernung der Lipoide und des größten Teils der TES wird die HK-Lösung in einer kontinuierlichen Extraktions-Apparatur mit Äther 12 Std. lang extrahiert. Die Lösung hat dann ein pH von 3–4; sie kann bei 20° C wochenlang ohne HK-Verluste aufbewahrt werden. Die vereinigten, ausgeätherten TES-Extrakte werden vorsichtig mit NaOH neutralisiert und unter Zusatz von Octylalkohol im Vakuum bei 60° C auf $\frac{1}{10}$ bis $\frac{1}{20}$ des ursprünglichen Volumens eingengt. Die syrupösen, tief gelbbraunen, trüben Konzentrate werden scharf zentrifugiert und die Niederschläge verworfen.

Reinheitsgrad: 0,050 – 0,100 mg/KIE, HK-Konzentrationen zwischen 500 – 5000 KIE/ml. Anreicherung 5 – 50-fach ohne Verluste. Das Konzentrat ist bei Zimmertemperatur ohne Konservierungsmittel haltbar. Fäulniserscheinungen oder Schimmelbildung treten nicht auf.

Das Konzentrat enthält außer dem HK u. a. noch Aminosäuren, Peptide, anorganische Salze, Gallenfarbstoffe und Kohlenhydrate.

3. Fällung des Hemmkörpers mit Ammoniumsulfat

Bei 40-proz. Sättigung der HK-Konzentrate mit $(NH_4)_2SO_4$ fallen 70–90% des HK aus, unter Zurücklassung von etwa 90% der gelben Pigmente (gemessen am Beckmann-Spektrophotometer bei 4200 Å) und rund 95% der gesamten reduzierenden Zucker (Bestimmung nach Hagedorn-Jensen). Der gut wasserlösliche Niederschlag enthält neben dem HK vor allem Aminosäuren und Peptide. Er wird in wenig Wasser aufgenommen. Reinheitsgrad des HK: 0,020 – 0,080 mg/KIE, Ausbeute 70 bis 90 Prozent.

4. Fällung des Hemmkörpers mit Basen-Fällungsmitteln

Aus Rohkonzentraten oder Lösungen von Schritt 3 kann der HK durch Pikrin-, Pikrolon-, Flavian-, Reinecke-, Nitranil- und Sozodolsäure sowie durch Kalignost (Natriumtetraphenylborat) ausgefällt werden, wobei neutrale und saure Begleitsubstanzen abgetrennt werden. Die Niederschläge werden durch Behandeln mit Säuren und Entfernen des überschüssigen Fällungsmittels zerlegt. Die so gewonnenen Lösungen inaktivieren Kallikrein und hemmen Trypsin. Das Reineckat, Rufianat und Flavianat (Abb. 2 a) des HK wurde in *kristallinem* Zustand erhalten.

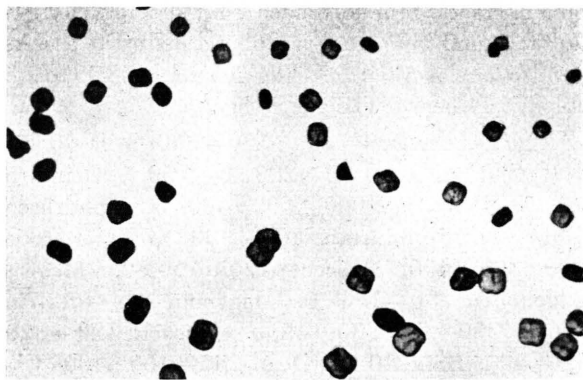


Abb. 2 a. Flavianat des Hemmkörpers. Wäßrige Suspension. Vergrößerung 180-fach.

Die Kristallite erwiesen sich allerdings bei der papierchromatographischen Untersuchung als nicht einheitlich; offenbar handelt es sich um Mischkristalle.

Versuche, den HK durch weitere Fraktionierungen mit $(NH_4)_2SO_4$ zur Kristallisation zu bringen, miß-

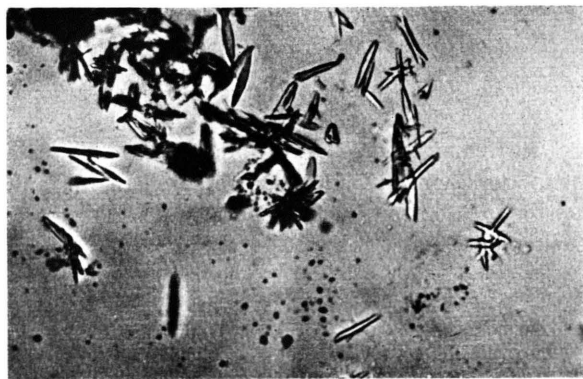


Abb. 2 b. Hydrochlorid des Hemmkörpers. Trockenpräparat. Vergrößerung 180-fach.

langen. Beim Eindunsten entsprechender HK-Lösungen bei 50 °C erhält man jedoch das Hydrochlorid (Abb. 2 b), Sulfat und Nitrat des HK in kristallinem Zustand.

Zur weiteren Anreicherung können die konzentrierten HK-Lösungen, z. B. von Schritt 3, mit dem doppelten Volumen einer kaltgesättigten, wäßrigen Lösung von Pikrinsäure oder Pikrolonsäure gefällt werden. Der sofort ausfallende dicke gelbe Niederschlag, der die gesamte HK-Menge enthält, bleibt zur Kornvergrößerung über Nacht stehen und wird dann abfiltriert. Der Niederschlag wird in Wasser suspendiert und die überschüssige Pikrolonsäure durch Essigester entfernt. Dann wird mit Essigsäure angesäuert.

Es entsteht eine tief gelbe Lösung, aus der die freigewordene Pikrolonsäure mit Essigester extrahiert wird. Reinheitsgrad des HK: 0,020 bis 0,005 mg/KIE. Ausbeute 70%, bezogen auf die zur Pikrolonsäure-Fällung eingesetzte HK-Menge.

5. Ionenaustausch-Chromatographie

Die weitere Anreicherung des schwach basischen HK erfolgt mit Hilfe der Ionenaustausch-Chromatographie.

a) Zur Abtrennung saurer Begleitsubstanzen dient der Anionen-Austauscher Amberlite IR 4-B (20 bis 40 mesh).

Als basisches Peptid wird der HK von der OH-Form des Austauschers nicht gebunden. Es können HK-Lösungen aller Konzentrationen und Reinheitsgrade streng reproduzierbar chromatographiert werden, so daß die Schritte 3 und 4 übersprungen werden können. Zur präparativen Reinigung wird das HK-Konzentrat (100 bis 3000 KIE/ml, 0,200–0,400 mg/KIE, Einsatz bis zu 500 000 KIE) auf eine 2,5 · 40 cm Säule der OH-Form des Harzes aufgegeben.

Der HK erscheint im Filtrat und wird mit Wasser nachgewaschen. Der Reinheitsgrad beträgt um 0,180 mg/KIE, die Ausbeute rund 98 Prozent.

b) Neutrale Substanzen werden vom HK mit Hilfe des Kationen-Austauschers Amberlite IRC-50 (20 bis 40 mesh) abgetrennt.

Der Austauscher hält in der H⁺-Form den HK in einer schmalen Zone unmittelbar an der Auftragsstelle, während die gesamten neutralen Begleitsubstanzen, vor allem über 95% der noch vorhandenen Farbstoffe und alle Zucker, im Filtrat erscheinen. Zur Elution der gebundenen basischen Peptide, Aminosäuren und Amine (Histamin) wird mit sauren Elutionsmitteln bei fallenden pH-Werten entwickelt: dest. Wasser–0,1-n. CH₃COOH–0,001-n. HCl–0,1-n. HCl. Der HK bleibt bis zu einem pH-Wert von 2,3 sitzen und beginnt dann bei niedrigeren pH-Werten in einer langsam breiter werdenden Zone zu wandern. Die Elution erfolgt mit 0,1-n. HCl, mit der der HK in einer scharfen, bei genügend großer Konzentration gelb gefärbten, im UV-Licht gelbgrün fluoreszierenden Zone wandert. Die Eluate werden

auf einem Fraktionsschneider in 5 ml Portionen gesammelt und auf Hemmfähigkeit gegenüber Trypsin und Kallikrein geprüft. Es wird ferner die Extinktion bei 4600 und 3200 Å (Flavin) sowie bei 2600 Å (Purine) gemessen und der Proteingehalt, die Zahl der freien Aminogruppen (nach TROLL und CANNAN⁷) sowie das Gesamtrockengewicht bestimmt. Bei hochgereinigten Lösungen werden außerdem Papierchromatogramme angefertigt.

Die Kationenaustausch-Chromatographie ist die beste Methode zur Reinigung von HK-Rohkonzentraten. Die aktiven Eluate werden nach der Neutralisation über Amberlite Xe-59 (200 bis 400 mesh) erneut der Kationenaustausch-Chromatographie zugeführt. Bei mehrmaligem Kationenaustausch werden Präparate erhalten, deren Reinheit unter 0,001 mg/KIE liegt und die nur aus 3 bis 4 Peptiden und 1 bis 2 Aminosäuren bestehen. Die Ausbeuten bei der Chromatographie liegen zwischen 70 und 100 Prozent.

Bei genügend scharfer Abtrennung wird der HK in einheitlicher Form erhalten. Die chromatographi-

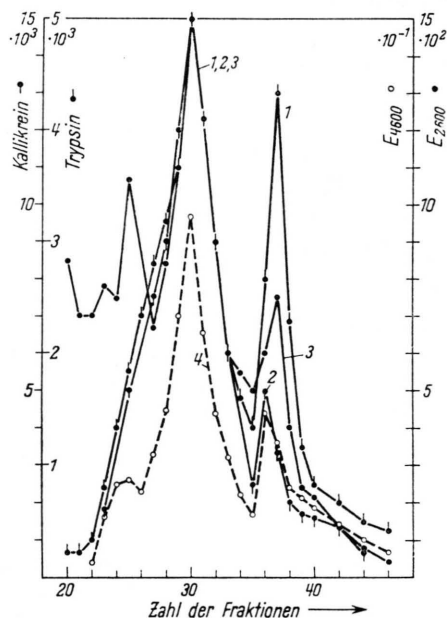


Abb. 3. Kationenaustausch-Chromatographie: I. Auswertung des Chromatogramms. Träger: Amberlite XE-64, H⁺-Form, 0,9 · 40 cm Säule; Eluat mit 0,1-n. HCl; Abszisse: Anzahl der Fraktionen (je 3,0 ml); Ordinate: Ordinate-Einheiten (O.E.). Zeichenerklärung: 1 = ● = Trypsin-Hemmung (1 O.E. = 1000 TIE), 2 = ▲ = Kallikrein-Hemmung (1 O.E. = 1000 KIE), 3 = ● = Purin: Extinktion bei 2600 Å (1 O.E. = Extinktion von 1,0), 4 = ○ = Flavin: Extinktion bei 4600 Å (1 O.E. = Extinktion von 1,0). Die Nummern der Fraktionen stimmen mit denen von Abb. 4 a und 5 überein.

⁷ W. TROLL u. R. W. CANNAN, J. biol. Chemistry **200**, 803 [1952].

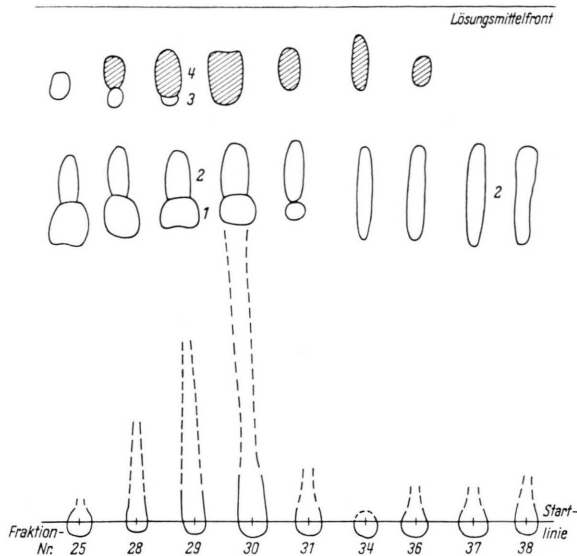


Abb. 4 a. Kationenaustausch-Chromatographie: II. Papierchromatographie der Elutionsfraktionen. Papier Schleicher & Schüll 2043 b, 15 Stdn. aufsteigend, entwickelt im System n-Butanol/Eisessig/Wasser 40 : 30 : 55; angefärbt mit Amidoschwarz 10 B. Sonstige Daten s. Abb. 3. 1=Inaktives, violett anfärbbares Protein (Maximum in Fraktion 28), 2=Modifikation des Hemmkörpers — Nebengipfel — (Maximum in Fraktion 37), 3=inaktives, violett anfärbbares Protein (Maximum in Fraktion 27), 4=Hemmkörper — Hauptgipfel — (Maximum in Fraktion 30). Die Nummern der Fraktionen stimmen mit denen von Abb. 3 und 5 überein.

sche Ausbeute beträgt 10%, der Reinheitsgrad 0,0004–0,0006 mg/KIE bei einer Anreicherung von 1 : 10 000–1 : 20 000 und einer Gesamtausbeute von 1–5 Prozent.

Der HK erscheint hierbei in 2 Formen, die sich auf Grund der Zonen- und Papierchromatogramm- R_f -Werte, ihrer Stabilität gegenüber dem Eintrocknen auf Papier und dem Verhältnis der Kallikrein- und Trypsinhemmung unterscheiden (Abb. 3 und 4). Die Hauptsubstanz wandert in der Säule schneller, besitzt im Papierchromatogramm einen R_f -Wert von 0,73–0,75 (s. u.) und ein Hemmungsverhältnis von Kallikrein : Trypsin wie 1 : 1,5–1 : 2,0; sie wird als „bifunktionaler Hemmkörper für Trypsin und Kallikrein“ bezeichnet, stellt ein Flavoprotein oder -peptid dar ohne Purinanteil und macht etwa 75% der in die Säule eingesetzten Aktivität aus. Der Nebenkörper läuft in der Säule langsamer, besitzt einen R_f -Wert von 0,55–0,60 und ein Hemmungsverhältnis von KI : TI wie 1 : 4–1 : 5; es gibt Hinweise dafür, daß sich dieser Körper aus dem als Hauptsubstanz bezeichneten sekundär bildet. Unterschiede in der Zahl und Art der Aminosäuren wur-

den bei der Bausteinanalyse (3. Mitt.) nicht gefunden. Eine Identifizierung der Flavinkomponente auf Grund ihres Absorptionsspektrums ist nicht möglich. Abb. 5 gibt die Gesamtspektren des Haupt- und Nebengipfels sowie einer weiteren Fraktion wieder. Das Spektrum zeigt keine ausgeprägten Banden mit Ausnahme eines Maximums bei 2580 Å, das noch vorhandenen Verunreinigungen an Purinen zuzuschreiben ist.

6. Verteilungs-Chromatographie an Kieselgur

Als Träger dient Kieselgur „Schleicher & Schüll zur Chromatographie“, als Systeme vor allem die zweiphasigen Gemische n-Butanol/Eisessig/H₂O 90 : 10 : 100 und 100 : 10 : 90. Die Auswertung der mit einem Fraktions-schneider gesammelten Fraktionen erfolgt wie bei der Kationenaustausch-Chromatographie.

Wiederum erscheinen rund 5–7% der Gesamtaktivität in einem schneller laufenden Nebengipfel, der sich papierchromatographisch mit der „Nebenfraction“ des Kationenaustausches identifizieren läßt. Rund 95% der eingesetzten Aktivität erscheint in einer gut abgegrenzten Zone, die langsamer wan-

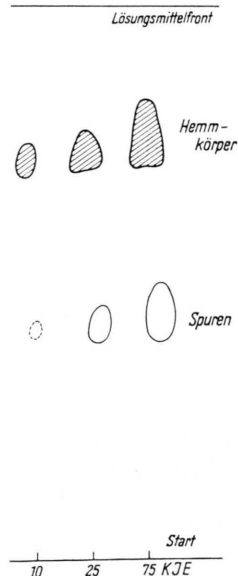


Abb. 4 b. 3-malige Kationenaustausch-Chromatographie: III. Papierchromatographie des einheitlichen Hemmkörpers. Aufgetragen sind Kallikrein-Inaktivator-Einheiten (KIE). Papier Schleicher & Schüll 2040 b, 15 Stdn. aufsteigend, entwickelt im System n-Butanol/Eisessig/Wasser 40 : 30 : 55. Angefärbt mit Ninhydrin (Hemmkörper und Spuren positiv) und Amidoschwarz 10 B (nur der Hemmkörper positiv). Die Spuren können von der Aufarbeitung her miteingeschleppt worden sein. Der Hemmkörper ist vor dem Anfärben aktiv eluierbar.

dert und auf dem Papierchromatogramm noch 2–3 amidoschwarz-positive Substanzen aufweist; dabei sind 40% der Aktivität in einer einzigen Fraktion bei einer Gesamtzahl von 80 Fraktionen enthalten.

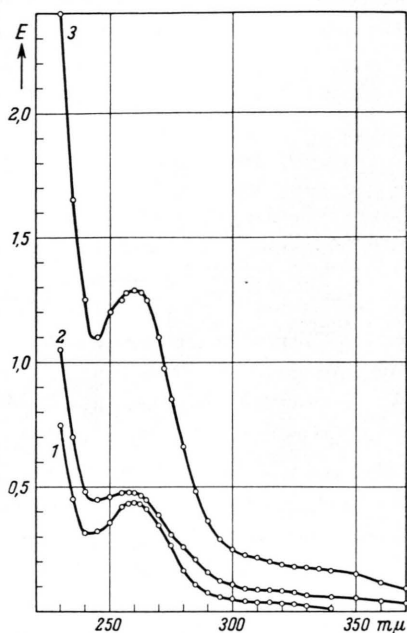


Abb. 5. Kationenaustausch-Chromatographie: IV. Spektren dreier Fraktionen. Daten s. Abb. 3. Abszisse: Wellenlänge in $m\mu$. Ordinate: Dekadische Extinktion E , gemessen an einem „Beckman“ Spektrophotometer, Modell DU. 1=Fraktion 26 (inaktives Protein), 2=Fraktion 36 (Nebengipfel der Hemmung), 3=Fraktion 30 (Hauptgipfel der Hemmung). Die Nummern der Fraktionen stimmen mit denen von Abb. 3 und 4 überein.

Unterwirft man diese Hauptfraktion (also ohne Nebenkörper) nochmals der Verteilung unter gleichen Bedingungen, so kann noch eine Reihe von Flavin- und Purinkörpern ohne Protein- oder Peptidnatur abgetrennt werden (Abb. 6). Davon unabhängig erscheint der HK in einem fast symmetrischen, uv-negativen Gipfel. Dieser enthält bei der papierchromatographischen Untersuchung nur ein Peptid, das aktiv eluiert werden kann. Diese Substanz ist im Säulen- und Papierchromatogramm gelb gefärbt und fluoresziert. Die Ausbeute an diesem einheitlichen HK beträgt rund 10–20 Prozent.

7. Präparative Papierchromatographie

Zur Verteilungs- wie auch präparativen Papierchromatographie (Schritt 7) werden nur die nicht einheitlichen Fraktionen des Kationenaustauschers ein-

gesetzt. Sie können auf dickem Karton (Schleicher & Schüll Nr. 2071) aktiv eluierbar chromatographiert werden.

Die mit UV-Licht fluoreszierenden Verbindungen des entwickelten Papierchromatogramms werden mit Ninhydrin oder Amidoschwarz 10 B nach GRASSMANN⁸ entwickelt. Letztere Anfärbung arbeiteten wir zu einer vergleichend quantitativen Bestimmung unserer Proteine und Peptide aus: die angefärbten Verbindungen werden mit 0,1-n. NaOH eluiert und die blaue Farbe bei 6600 Å an einem Spektrophotometer vermessen. Es werden bis zu 0,005 mg Protein bei einer Genauigkeit von 15–20% erfaßt. Durch Variierung der Wellenlänge konnten mit violetter Farbe anfärbbare Eiweißkörper identifiziert werden.

In den gebräuchlichen Lösungsmitteln bleibt der HK stets am Startpunkt sitzen. Bei der Prüfung von etwa 60 neuen Systemen erwiesen sich folgende Gemische (nach ihrer Brauchbarkeit geordnet) als geeignet.

n-Butanol/Eisessig/Wasser	R_f
40 : 30 : 55	0,72 – 0,74
n-Butanol/n-Propanol/ <i>i</i> -Propanol/0,1-n. HCl	
50 : 20 : 20 : 100	0,8
n-Butanol/Eisessig/Pyridin/Wasser	
30 : 6 : 20 : 24	0,6
n-Butanol/Propanol/tert. Butanol/0,1-n. HCl	
50 : 20 : 20 : 100	0,8

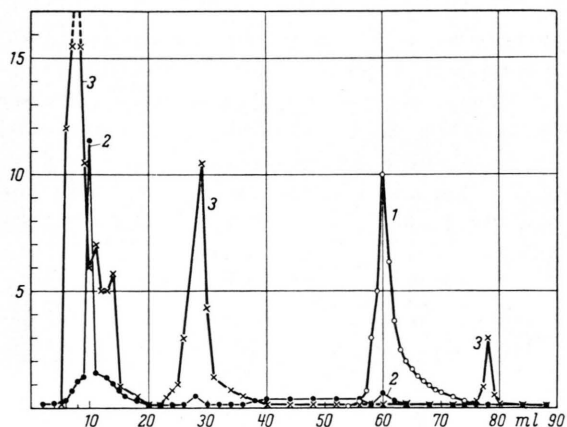


Abb. 6. Verteilungs-Chromatographie: Auswertung des Chromatogramms. Träger: Kieselgur „Merck“, 0,9·20 cm Säule; Verteilung im System n-Butanol/Eisessig/Wasser 90 : 30 : 100. Abszisse: Anzahl der Fraktionen (je 3,0 ml), Ordinate: Maßzahlen in Ordinateinheiten (O.E.). Zeichenerklärung: 1 = ○ = Kallikrein-Hemmung (1 O.E.=500 KIE), 2 = ● = Flavin: Extinktion bei 3200 Å (5 O.E.=Extinktion von 1,0), 3 = × = Purin: Extinktion bei 2600 Å. (1 O.E.=Extinktion von 1,0).

⁸ W. GRASSMANN, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **296**, 30 [1954].

Pyridin/Collidin/Wasser	30 : 10 : 10	0,0
Phenol/n-Butanol/Eisessig/Wasser	20 : 10 : 2 : 10	0,6

Bei einer systematischen Untersuchung hochgereinigter Lösungen im System n-Butanol/Eisessig/Wasser ist die Wanderungstendenz des mit Amidoschwarz rein blau angefärbten Hemmkörpers gut zu beobachten. Mit zunehmenden Wassergehalten der Gemische wandern die (violett angefärbten) Begleit-substanzen stetig schneller, während der HK lange Zeit am Start sitzen bleibt, um dann jedoch – bei hohem Wassergehalt der Gemische – vor den Begleitsubstanzen zu laufen.

Eine Elution des HK gelang nur mit 0,1-n. TRIS-Puffer p_H 9,0–9,5 und mit 1,0-m. Ameisensäure in Ausbeuten von 90–100 Prozent. Für präparative Zwecke benutzen wir das System n-Butanol/Eisessig/Wasser 40 : 30 : 55 und den Karton Schleicher & Schüll 2071; die HK-Lösung wurde auf einer langen Startlinie aufgetragen, 15 Stdn. aufsteigend entwickelt und Probestreifen mit Amidoschwarz angefärbt. Die HK-Zone wurde aus dem Bogen mit 1,0-m. HCOOH kontinuierlich absteigend mit kleinen Volumina eluiert, die Säure am Anionenaustauscher Amberlite IR 4-B entfernt und die neutralen Lösungen lyophilisiert. Die wäßrige, konzentrierte Lösung des Trockenpulvers wurde nochmals chromatographiert. Als Lösungsmittelgemisch diente nunmehr aber das System n-Butanol/Eisessig/Wasser 80 : 30 : 30, in dem sämtliche noch vorhandenen Verunreinigungen an Aminosäuren und Peptiden wandern, der HK jedoch am Start sitzen bleibt. Die Elution und weitere Verarbeitung erfolgt wie beim ersten Mal. Der so gewonnene Hemmkörper erweist sich papierchromatographisch und -elektrophoretisch als völlig einheitlich. Gesamtausbeute 30–50% der zur Papierchromatographie eingesetzten HK-Menge.

8. Papier-Elektrophorese

Für besondere Zwecke können die Eluate der Papierchromatographie noch anschließend der Papier-Elektrophorese unterworfen werden. Wir verwendeten die präparative vertikale Papier-Elektrophorese nach GRASSMANN⁹ (Gerät Elphor Va, Papier Schleicher & Schüll 2040 b, 20 Stdn. Laufzeit in 0,5-m. HCOOH-Puffer p_H 1,8 bei 600 V und 18 mA. Anfärbung mit Ninhydrin und Amidoschwarz 10 B).

⁹ W. GRASSMANN u. H. ENDRES, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 306, 124 [1956].

Der Hemmkörper wird schwach abgelenkt und findet sich mit einer Gesamtausbeute von nur 5–10% aktiv im Eluat. Die papierchromatographische Prüfung und Bausteinanalyse dieser Eluate ergab keine Veränderung gegenüber der eingesetzten Substanz. Amidoschwarz-negative Verunreinigungen werden abgetrennt.

III. Diskussion

Der Kallikrein-Trypsininhibitor ist beim Rind in so vielen Organen und in so großen Mengen verbreitet, daß auf eine besondere funktionelle Bedeutung geschlossen werden darf. Wir haben uns davon überzeugt, daß es sich nicht um ein resorbiertes Produkt der Nahrungsprotein-Zersetzung durch die Pansen-Bakterien handelt: der Panseninhalt war frei von Kallikrein-Trypsininhibitor.

Die in den KI-haltigen Leber-Rohkonzentraten feststellbare Hemmkapazität für Trypsin geht bei der Anreicherung des KI bis zur Einheitlichkeit nicht verloren; sie ist demnach an ein und dieselbe Substanz gebunden. Auch das bisher einzige pflanzliche Material, in welchem ein KI nachweisbar war, nämlich die Kartoffel, besitzt eine starke Inhibitor-Wirkung gegenüber Trypsin, von der ein Teil bei der Anreicherung des KI über mehrere Stufen erhalten bleibt, während ein anderer Teil von der kallikrein-hemmenden Substanz abgetrennt wird. KI aus Leber oder Ohrspeicheldrüsen ist mit dem aus Kartoffeln nicht identisch. Sie unterscheiden sich durch ihre Löslichkeits-Eigenschaften, durch ihr Verhalten beim Kochen sowie in der p_H -Abhängigkeit ihrer Inaktivierungs-Fähigkeit für Kallikrein¹⁰. Der Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen besitzt keine Inaktivatorwirkung gegenüber Pankreas- oder Harnkallikrein.

Die Tatsache, daß der HK sowohl die spezifische Aktivität des Kallikreins als auch die des Trypsins aufzuheben vermag, spricht für eine Ähnlichkeit im Bau der aktiven Zentren des Wirkstoffes.

Leberrohextrakte haben außer der Hemmfähigkeit für Trypsin und Kallikrein noch Inhibitorwirkung gegenüber Kathepsin, Rennin, Oxytocinase und anderen Fermenten. Die sie verursachenden Faktoren werden aber bei der Anreicherung des HK von diesem abgetrennt.

¹⁰ E. WERLE, W. APPEL u. H. HAPP, Z. Vitamin-, Hormon- u. Fermentforsch. [Wien], im Druck.