

A parallelism is found between fluorescence intensity and viscosity. This can be attributed to known general viscosity effects in fluorescence.

Laboratoires de Chimie minérale et analytique
de l'Université de Genève

BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. & A. MARCANTONATOS & D. MONNIER, *Helv.* **48**, 194 (1965).
- [2] G. BIONDA & E. BRUNO, *Z. analyt. Chem.* **155**, 183 (1957); A. KRUGER, *J. South Afric. chem. Inst.* **4**, 109 (1951).
- [3] G. MARTIN & M. MAES, *Bull. Soc. Chim. biol.* **34**, 1178 (1952); G. MARTIN, *ibid.* **36**, 719 (1954); M. BASSET & G. MARTIN, *ibid.* **39**, 337 (1957); R. FABRE, R. TRUHAUT & N. P. LICH, *C. r. hebd. Séances Acad. Sci.* **249**, 490 (1959).
- [4] K. DRUCKER & R. KASSEL, *Z. physik. Chem.* **76**, 367 (1911).
- [5] N. F. HALL & H. H. VOGEL, *J. Amer. chem. Soc.* **55**, 242 (1933).
- [6] M. A. PAUL & F. A. LONG, *Chem. Reviews* **57**, 1 (1957); M. J. JORGENSEN & D. R. HARTTER, *J. Amer. chem. Soc.* **85**, 878 (1963).
- [7] N. F. HALL & W. F. SPENGE MAN, *J. Amer. chem. Soc.* **62**, 2487 (1940).
- [8] L. A. FLEXSER, L. P. HAMMETT & A. DINGWALL, *J. Amer. chem. Soc.* **57**, 2103 (1935).
- [9] R. STEWART & M. R. GRANGER, *Canad. J. Chemistry*, **39**, 2508 (1961).
- [10] C. T. DAVIS & T. A. GEISSMAN, *J. Amer. chem. Soc.* **76**, 3507 (1954).
- [11] S. BRUCKENSTEIN & I. M. KOLTHOFF, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 2974 (1956).
- [12] E. J. BOWEN & J. SAHU, *J. physic. Chemistry* **63**, 4 (1959); A. H. EWALD, *ibid.* **67**, 1727 (1963); E. J. BOWEN & W. S. METCALF, *J. chem. Soc.* **1954**, 976.

216. Trypsinhemmerstoffe aus *Ascaris lumbricoides var. suum*

I. Herstellung von reinen Trypsininhibitoren

von P. Portmann und W. Fraefel

(3. IX. 67)

1. Einleitung. – 1903 hat WEINLAND [1] festgestellt, dass Ascaridenextrakte Trypsin und Pepsin hemmen, was durch verschiedene Autoren [2] bestätigt wurde. GREEN [3] wies als erster nach, dass die Ascariden ausserdem auch einen Chymotrypsin-inhibitor enthalten. Eine partielle Reinigung des Trypsininhibitors beschrieb 1941 COLLIER [4]; PEANASKY [5] und Mitarbeitern gelang dagegen die Reinherstellung des Chymotrypsininhibitors der Ascariden. Die Arbeitsgruppe von PUDDLES [6] [7] beschrieb in jüngster Zeit auch die Reinherstellung eines Trypsininhibitors aus Ascariden. Unabhängig von diesen Arbeiten hatten wir seit Beginn 1962 die Reinherstellung des Trypsininhibitors aus Ascariden bearbeitet und bereits 1964 ein reines Präparat hergestellt. Dieses weicht in wesentlichen Punkten vom Hemmstoff ab, den PUDDLES *et al.* [7] beschreiben. Die seither durchgeführte Sequenzanalyse¹⁾ bestätigt unsere ersten Ergebnisse; im folgenden wird die von uns ausgearbeitete Reinherstellung eines Trypsininhibitors aus Ascariden beschrieben.

¹⁾ Der eine von uns (W.F.) hat im Laboratorium von R. ACHER, Paris, die Aminosäuresequenz des hier beschriebenen Hemmstoffes aufgeklärt. R. ACHER & W. FRAEFEL werden in Kürze die Ergebnisse ihrer Untersuchungen veröffentlichen.

2. Extraktion und Reinigung des Trypsininhibitors. – Ein nach COLLIER [4] aus 15 kg Ascariden hergestellter Trypsinhemmstoff enthielt im Gegensatz zu seinen Angaben ziemlich viel zuckerhaltige Begleitstoffe. Diese konnten durch eine mehrfach wiederholte Äthanolfraktionierung nur teilweise vom Inhibitor abgetrennt werden. Bei der Herstellung des Inhibitors nach COLLIER stellten wir auch fest, dass nur etwa die Hälfte des Hemmstoffes ausfällt, wenn der Ascaridenextrakt nach seiner Vorschrift bei Zimmertemperatur mit Magnesiumsulfat gesättigt wird. Dagegen wird der Inhibitor fast vollständig ausgefällt, wenn der mit Trichloressigsäure behandelte Extrakt bei 70° mit Magnesiumsulfat gesättigt wird. Eine Fällung mit Alkohol reduziert den Zuckergehalt des Präparates wesentlich; eine fast vollständige Entfernung der zuckerhaltigen Verunreinigungen konnte aber erst durch eine fünfmal wiederholte Ammoniumsulfatfällung erreicht werden (siehe Tabelle 1). Bei einer Verminderung des Zuckergehaltes um 95% trat fast kein Aktivitätsverlust ein.

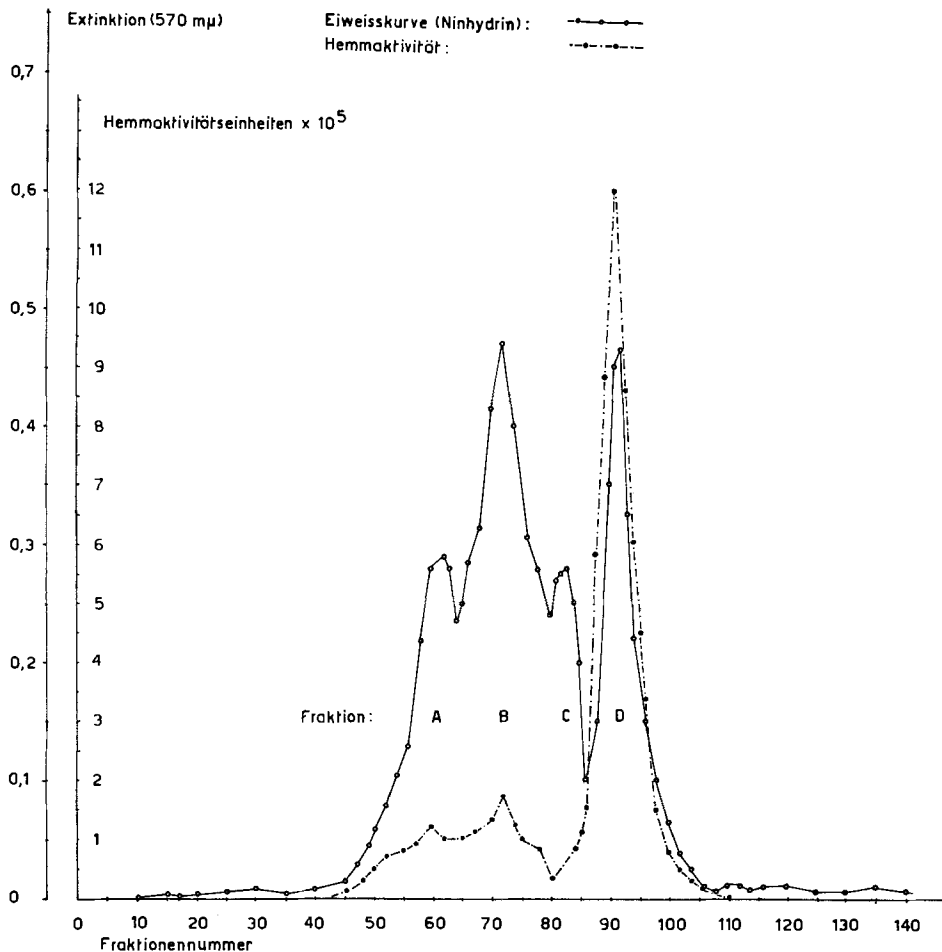


Fig. 1. *Sephadex-G-50-Chromatogramm des mit Pikrinsäure gefällten Trypsininhibitors*

Der gesuchte Hemmstoff muss offenbar ein zuckerfreies Protein oder Peptid sein. Eine Fällung des Inhibitors mit Pikrinsäure verminderte den Zuckergehalt des durch die fünfte Ammoniumsulfatfällung erhaltenen Präparates nochmals um ungefähr 50%

Tabelle 1. Ammoniumsulfatfraktionierung (80-proz. Sättigung) eines durch Magnesiumsulfat bei 70° gefällten und mit Äthanol zwischen 50–70 Vol. % fraktionierten Trypsinhemmstoffes mit einer Gesamtaktivität*) von $10,3 \cdot 10^6$ Einheiten und einem Zuckergehalt von 570 mg

Fällung		1.	2.	3.	4.	5.
Niederschlag	Aktivität ($E \cdot 10^6$)	10,4	10,0	10,1	10,0	9,8
	Zucker (mg)	124,4	48,0	39,9	30,0	28,0
Mutterlauge	Aktivität ($E \cdot 10^4$)	2,1	1,4	2,7	2,2	2,4
	Zucker (mg)	431,8	69,0	12,0	7,5	1,3

*) 1 Hemmaktivitätseinheit $E = 1 \mu\text{g}$ β -Naphthylamin, das wegen der Inhibitorwirkung durch Trypsin aus $\text{N}\alpha$ -Benzoyl-arginin- β -naphthylamid nicht abgespalten wird

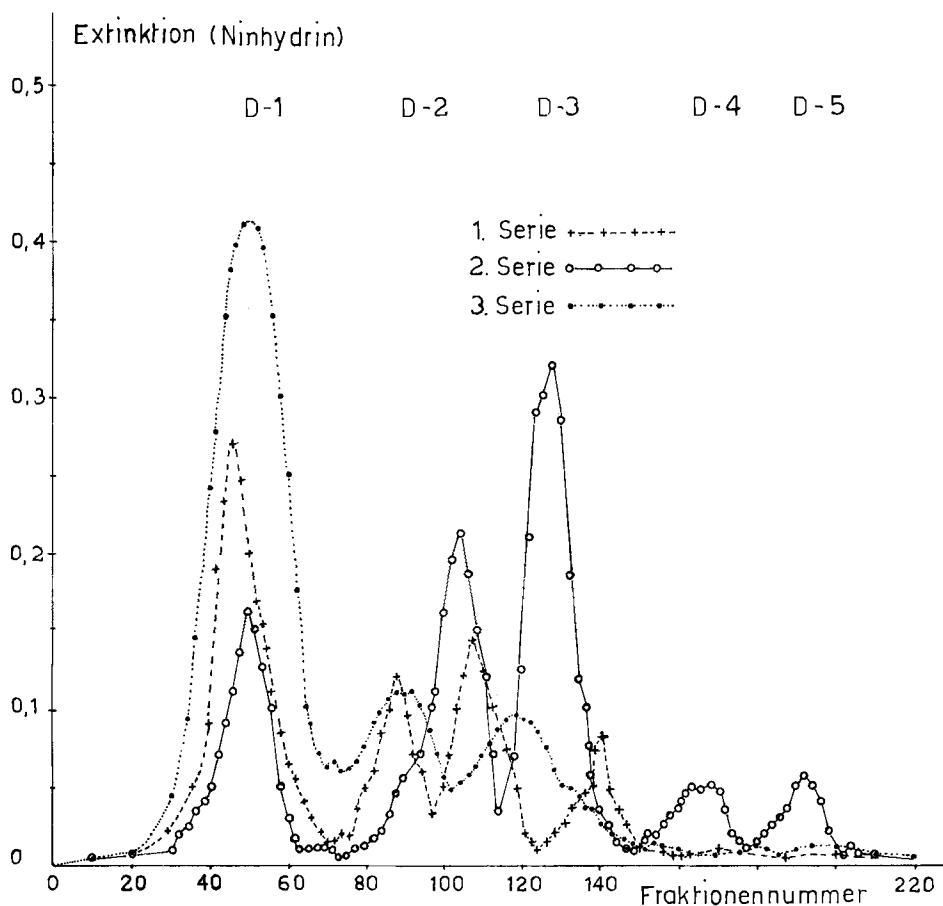


Fig. 2. DEAE-Sephadex-Chromatogramm des Trypsininhibitors (Fraktion D)
D-1 bis D-5: hemmaktive Fraktionen

und eliminierte gleichzeitig eine relativ grosse, aber fast inaktive Peptidnebenfraktion, deren Pikrat löslich bleibt. Durch Behandlung einer wässrigen Suspension des Hemmstoffpikrates mit Dowex-1-X8 (Hydrogencarbonatform) wurde der vollaktive Inhibitor zurückgewonnen. Eine nachfolgende Chromatographie auf Sephadex-G-50 zeigte aber, dass in diesem Präparat noch mindestens vier Eiweissfraktionen von verschiedenem Molekulargewicht vorliegen, wobei die ersten drei wenig aktiv waren. Die vierte Fraktion, D, enthielt über 70% der Hemmaktivität und wurde von den drei vorangehenden Fraktionen fast vollständig abgetrennt (siehe Fig. 1).

Aus dieser Durchwanderungsverzögerung der Fraktion D auf der Sephadex G-50-Kolonnen ging weiter hervor, dass das Molekulargewicht des gesuchten Hemmstoffes unter 10000 liegen dürfte. Die spezifische Aktivität der Fraktion D betrug 37000 E/mg N und ihr Hexosengehalt höchstens 31 $\mu\text{g}/\text{mg}$ N. Zur vollständigen Abtrennung der zuckerhaltigen Begleitstoffe wurde die Fraktion D auf einer DEAE-Sephadex-Säule durch Elution mit einem Magnesiumacetatgradienten (0,0025–0,1M) in einer Tris-Pufferlösung (0,01M) von pH 8,0 chromatographiert. In drei Aufarbeitungen erhielten wir je 3 bis 5 aktive Fraktionen (D-1 bis D-5), von denen eine immer wesentlich grösser war als die anderen (Fig. 2) und stets die höchste spezifische Aktivität aufwies (siehe Tabelle 2). Mit dem Anthronreagens waren Hexosen in keiner der DEAE-Sephadex-Chromatogrammfraktionen nachweisbar.

Tabelle 2. DEAE-Sephadex-Chromatogramm der Fraktion D
Gesamtaktivität (A) und spezifische Aktivität (A/mg N) der Fraktionen D-1 bis D-5

Aufarbeitung	Fraktion D-1	D-2	D-3	D-4	D-5
1. Serie A	$6,1 \cdot 10^6 E$	$9,7 \cdot 10^4 E$	$3,2 \cdot 10^5 E$	$2,8 \cdot 10^5 E$	–
A/mgN	47000	30000	41000	27000	–
2. Serie A	$1,3 \cdot 10^6 E$	$6,3 \cdot 10^5 E$	$1,3 \cdot 10^6 E$	$5,5 \cdot 10^4 E$	$7,5 \cdot 10^3 E$
A/mgN	19000	46000	56000	36000	22000
3. Serie A	$5,3 \cdot 10^6 E$	$2,8 \cdot 10^5 E$	$4,9 \cdot 10^4 E$	–	–
A/mgN	36000	21000	11000	–	–

Im DEAE-Sephadex-Chromatogramm konnten nur noch hemmaktive Fraktionen, aber keine inaktive Begleiteiweisse mehr nachgewiesen werden. Ihre spezifische Aktivität stieg im besten Falle von 37000 E/mg N der aufgetragenen Fraktion D auf 47000 bis 56000 E/mg N an. Der Aktivitätsanstieg pro mg N schien einem maximalen Wert zuzustreben, nachdem die spezifische Aktivität bei den früheren Reinigungsoperationen von 4700 E/mg N (Magnesiumsulfatfällung) rasch auf 37000 E/mg N angestiegen war. Erschwert wurde die Beurteilung des Reinigungsgrades deswegen, weil die Summe der Aktivitäten aller Chromatogrammfraktionen kleiner war, als die Aktivität der aufgetragenen Substanz. Dies hängt damit zusammen, dass der Trypsin-hemmstoff bei pH-Werten über 8,0 instabil wird. Bei der DEAE-Sephadex-Chromatographie war es aber nötig das pH 8,0 zu wählen, um eine genügende Haftung der Substanz an das Harz zu ermöglichen. Um die Einheitlichkeit der aktivsten Fraktionen und der Reproduzierbarkeit des Verfahrens zu prüfen, wurde eine quantitative Aminosäureanalyse aller Fraktionen D-1 bis D-5 durchgeführt. Ferner wurde die

elektrophoretische Einheitlichkeit dieser Fraktionen überprüft und deren UV.-Spektrum aufgenommen.

Aus der Aminosäureanalyse ging hervor, dass Methionin, Leucin, Tyrosin und Histidin fehlten oder nur in so kleinen Prozentgehalten anwesend waren, dass sie unvollständig entfernten Begleitpeptiden zugeschrieben werden mussten.

Die prozentuale Zusammensetzung der Fraktionen D-1 bis D-3 bezüglich der übrigen Aminosäuren war zwar sehr ähnlich, aber nicht identisch. Die relativ leicht und genau bestimmbar Aminosäuren: Alanin, Isoleucin und Phenylalanin zeigten weiter bei den Hauptfraktionen zum Teil Werte, die fast in der Mitte zwischen zwei geradzahligem molaren Verhältnissen lagen, wenn man der Berechnung 1 Mol Tryptophan pro Mol Hemmstoff zugrunde legte, wie es auf Grund der spektrophotometrischen Tryptophanbestimmung notwendig erschien.

Da weiter die Papierelektrophorese bei pH 2,0 eine Hauptfraktion neben 1–2 Nebenfraktionen ergab, entsprachen offenbar die Fraktionen D-1 bis D-5 noch nicht einheitlichen Peptiden. Wir chromatographierten deshalb die Hauptfraktionen der DEAE-Sephadex-Chromatogramme auf einer mit 0,01N Natriumacetatlösung von pH 5,5 äquilibrierte CM-Cellulose-Säule durch Elution mit einem steigenden Natriumacetat-Gradienten bei gleichbleibendem pH. Aus allen Präparaten konnten 3 aktive Fraktionen CM-1 bis CM-3 gewonnen werden. CM-2 folgte dem CM-1 unmittelbar nach, so dass die beiden Fraktionen nicht hundertprozentig voneinander getrennt werden konnten. Die Fraktion CM-1 wies immer die grösste Gesamtkativität und gleichzeitig auch die höchste spezifische Aktivität auf, die bei 128000 bis 130000 E/mg N lag. Die spezifische Aktivität der CM-2-Fraktionen wies dagegen Werte zwischen 97000 und 112000 E/mg N auf und die CM-3-Präparate waren wesentlich weniger aktiv als die ersten beiden Fraktionen. Jede der drei CM-Fraktionen erwies sich nun auch bei der Elektrophorese bei pH 2,0 als einheitlich. Mit Hilfe der Hochspannungselektrophorese konnte allerdings gezeigt werden, dass die Präparate CM-1 noch 1–2 Prozent CM-2 und dass umgekehrt die Hemmstoffe CM-2 sehr wenig CM-1 enthielten, wie dies aus dem Verhalten der beiden Fraktionen beim CM-Cellulose-Chromatogramm zu erwarten war. Da aber die Aminosäurezusammensetzung dieser beiden Fraktionen sehr ähnlich ist, erhielt man bei der Aminosäureanalyse vor und nach elektrophoretischer Reinigung (pH 7,5; 20 V/cm; 2 Std.) praktisch dieselben Werte.

Die Aminosäureanalyse des mit Perameisensäure oxydierten Hemmstoffes CM-1 ergab – wie in der nächsten Publikation ausführlich gezeigt werden wird – folgende Zusammensetzung: Asp₅ Thr₄ Ser₁ Glu₁₁ Pro₆ Gly₆ Ala₅ Val₂ [(Cys)1/2]₁₀ Ile₃ Phe₂ Lys₇ Arg₃ Try₁.

Aus den Resultaten mehrerer Aminosäureanalysen des nativen CM-2 und seines mit Perameisensäure erhaltenen Oxydationsproduktes ergab sich dagegen für diesen Inhibitor folgende etwas verschiedene molare Zusammensetzung: Asp₄ Thr₄ Ser₁ Glu_{9–10} Pro₅ Gly₆ Ala₅ Val₂ [(Cys)1/2]₈ Ile₃ Phe₂ Lys₆ Arg_{3–4} Try₁.

Nach dieser Zusammensetzung wäre die Molekel von CM-1 um 1 Asp, 1–2 Glu, 1 Pro, 2 (Cys)1/2 und 1 Lys grösser als die Molekel von CM-2; dagegen wäre es möglich, dass CM-2 1 Arg mehr enthält als CM-1.

Die Berechnung der Molekulargewichte auf Grund dieser Formeln ergibt für CM-1 (66 Aminosäurereste) den Wert 7192 und für CM-2 (59–61 Aminosäurereste) 6389 bis

6675. Aus der Verzögerung der Elution des CM-1 gegenüber Testproteinen auf Sephadex G 100 konnte auf ein Molekulargewicht von ca. 7000 geschlossen werden, was mit dem aus der Aminosäureanalyse berechneten Wert gut übereinstimmt.

Ob diese beiden Peptide *in vivo* nebeneinander vorkommen oder ob CM-2 ein partielles Hydrolysenprodukt von CM-1 darstellt, konnten wir bisher nicht mit Sicherheit abklären.

Neben diesen beiden Hemmstoffen kommen sicher noch höhermolekulare Trypsin-inhibitoren in den Ascariden vor, von denen nur CM-3 in reinem Zustand isoliert wurde (Molekulargewicht zwischen 15000 und 20000; Dimer von CM-1 oder CM-2?). Die übrigen in dieser Arbeit erwähnten aktiven Fraktionen A, B und C (Fig. 1) und D-2 bis D-5 (Fig. 2) sind vielleicht Assoziate zwischen niedermolekularen Hemmstoffpeptiden und inerten Proteinen oder aggregierte kleinemolekulare Inhibitoren. Es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass ein höhermolekularer Hemmstoff in den Ascariden vorkommt, der während der Autolyse und der Aufarbeitung eine partielle Hydrolyse erleidet und damit zu einer Vielzahl von hemmaktiven Bruchstücken führt.

Da die von uns isolierten reinen Hemmstoffe CM-1 und CM-2 praktisch nur Trypsin hemmen (wie wir in einer späteren Publikation zeigen werden), so handelt es sich bei diesen Peptiden wirklich um spezifische Trypsininhibitoren, die jenem Hemmstoff entsprechen sollten, den PUDDLES, RÔLA & MATIDA [7] aus Ascariden kürzlich isoliert haben. Vergleicht man aber die Zusammensetzung unserer Präparate mit jener des von PUDDLES *et al.* beschriebenen Hemmstoffes, so zeigt sich zunächst, dass unsere Hemmstoffe kein Tyrosin enthalten, während im letztgenannten Inhibitor 2 Tyrosinreste vorkommen; dazu kommen Differenzen im Gehalt an Arginin, Glutaminsäure, Cystin und Lysin, so dass der Hemmstoff von PUDDLES weder mit unserem CM-1, noch mit unserem CM-2 übereinstimmt. Das von PUDDLES *et al.* aus ihrer Aminosäureanalyse berechnete Molekulargewicht von 7600 ist uns übrigens unverständlich, weil die von uns ausgeführte Nachrechnung 6734 ergibt, ein Wert, der dem Molekulargewicht, das wir für unser Präparat CM-2 fanden, ziemlich genau entspricht.

Wir vermuten auf Grund der von PUDDLES *et al.* angegebenen Resultate der Aminosäureanalyse (Ala: 4,45; Arg: 3,54; Ile: 2,62 Reste!), dass der von ihnen beschriebene Hemmstoff noch ein Gemisch von verschiedenen Peptiden darstellt.

Experimenteller Teil

A. Isolierung eines reinen Trypsinhemmstoffes. – 1. *Herstellung des Rohextraktes:* 25 kg bis zu ihrer Verarbeitung unter 90-proz. Äthanol aufbewahrte Schweine-Ascariden werden im Fleischwolf zerkleinert. Der Gewebebrei wird mit 5–6 l 1-proz. Kochsalzlösung verrührt und portionenweise in einem kräftigen «Turmix» möglichst fein homogenisiert. Nach Zugabe von 1 g Diastase wird der dünnflüssige Brei nochmals mit einem Polytron (MOBIL AG, Aarau) oder Ultra-Turrax homogenisiert, bis die Suspension feinflockig und homogen wird. Man überlässt nun das mit Toluol überschichtete Homogenat während 7 Tagen der Autolyse. Dann stellt man durch Zugabe von 25-proz. Trichloressigsäure (ca. 1,5 l) den pH-Wert auf 2,3–2,5 ein, erhitzt die Mischung rasch auf 80° und kühlt sie sofort wieder ab. Man zentrifugiert den ausgefallenen Eiweissniederschlag ab, resuspendiert ihn in 3 l 2,5-proz. Trichloressigsäure und zentrifugiert die Suspension ein zweites Mal. Die vereinigten überstehenden gelben und leicht trüben Lösungen enthalten praktisch die gesamte, in den Ascariden enthaltene Hemmaktivität.

2. *Magnesiumsulfatfällung:* Der vereinigte Extrakt (ungefähr 13–14 l) wird mit 1 N Natronlauge auf pH 3,0 gebracht und auf 70° erwärmt. Nach Sättigung mit Magnesiumsulfat wird die

Lösung bei 70° gehalten, bis sich die hemmaktive Fällung als ölig-breiige Aufräumung an der Oberfläche abgeschieden hat und leicht abgeschöpft werden kann. Die Mutterlauge enthält relativ wenig Hemmstoff und wird verworfen.

3. *Alkoholfractionierung*: Die viskose, dunkelgelb gefärbte Lösung des Hemmstoffniederschlags in 3 l Wasser wird mit 1 N Natronlauge auf pH 5,0 eingestellt, mit einem gleichen Volumen abs. Alkohol versetzt und auf 4° gekühlt. Nach 24 Std. wird der ausgefallene Magnesiumsulfatniederschlag abgenutscht und mit 50-proz. Äthanol gewaschen, bis er rein weiss erscheint. Der gesamte Hemmstoff bleibt in den Filtraten, die vereinigt mit Natronlauge bis auf pH 6,0 neutralisiert und im Rotationsverdampfer unter Vakuum auf 200 ml eingeeengt werden. Mit Natronlauge bringt man das pH dieser hochviskosen Lösung vorsichtig auf 7,5 und fügt ein gleiches Volumen abs. Alkohol zu. Der ausfallende, wenig aktive Niederschlag wird abzentrifugiert und verworfen. Die bei Erhöhung der Alkoholkonzentration auf 70 Vol. % entstehende Fällung enthält nur etwa 1% der Gesamtaktivität. Durch Zugabe von Alkohol zur klarzentrifugierten Lösung bis 90 Vol.-% Äthanol wird die Hauptmenge des Hemmstoffes ausgefällt. Der Niederschlag wird abzentrifugiert und in 200 ml Wasser gelöst. In der 90-proz. Alkohollösung bleiben ungefähr 10% des Hemmstoffes, der durch weitere Alkoholzugabe nicht gefällt werden kann. Will man diesen Anteil gewinnen, muss die Lösung im Vakuum eingedampft und der Rückstand lyophilisiert werden.

4. *Ammoniumsulfatfällung*: Die Lösung des Hemmstoffniederschlags (70–90 Vol.-% Äthanol) in 200 ml Wasser wird 24 Std. bei 4° aufbewahrt. Es bildet sich dabei ein kleiner inaktiver Niederschlag, der abzentrifugiert wird (verworfen). Den klaren Überstand sättigt man zu 80% mit Ammoniumsulfat. Der klebrige, gelbe Niederschlag, der dabei ausfällt, wird abzentrifugiert und in 200 ml Wasser gelöst. Man wiederholt diese Fällung noch viermal und zentrifugiert den Niederschlag jeweils ab. Der Niederschlag der fünften Ammoniumsulfatfällung ist gelblich und feinkörnig und enthält 97% der Ausgangsaktivität.

5. *Pikrinsäurefällung*: Die Lösung des letzten salzhaltigen Niederschlags in 200 ml Wasser wird mit einem gleichen Volumen abs. Alkohol versetzt und über Nacht bei 4° aufbewahrt. Das dabei ausfallende Ammoniumsulfat wird auf einem Glasfilter abfiltriert. Das Filtrat wird im Vakuum auf 150 ml eingedampft. Durch Zugabe von 450 ml gesättigter Pikrinsäurelösung (ca. 1,2-proz.) wird der Hemmstoff als schwerlösliches Pikrat ausgefällt. Man zentrifugiert den Niederschlag ab, wäscht ihn im Zentrifugenglas dreimal mit 50 ml absolutem Alkohol und suspendiert ihn in 150 ml Wasser. Durch Zugabe von Dowex-1-X8 (Hydrogencarbonatform) [8] bis zum Aufhören der CO₂-Entwicklung wird der Niederschlag unter Rühren in Lösung gebracht. Das pH der Lösung soll dabei nicht über 7,5 bis höchstens 8,0 steigen. Man nutscht das gelbgefärbte Dowex-1 ab und wäscht 3mal mit ca. 25–30 ml Wasser aus. Die vereinigten, leicht gelblichen Filtrate werden im Vakuum eingeeengt.

6. *Chromatographie auf Sephadex G-50*: 60 g Sephadex G-50, die über Nacht in 5 l Wasser zur Quellung gebracht wurden, werden in ein Chromatographierohr (3,5 × 55 cm) eingeschlämmt und die im Vakuum auf 30 ml eingeeengte Hemmstofflösung vorsichtig auf die vollständig sedimentierte Sephadexschicht aufgetragen. Nach Eindringen der Lösung wird der an der Rohrrinnenfläche haftende, noch nicht eingedrungene Anteil der Hemmstofflösung mit 2 ml Wasser in die Sephadexschicht eingespült. Man entwickelt das Chromatogramm mit Wasser, dessen Druck man so regelt, dass alle 3 min 1 ml Eluat die Kolonne verlässt. Es werden in einem Fraktionensammler 5-ml-Portionen fortlaufend aufgefangen und auf ihre Hemmaktivität geprüft. In jeder Fraktion wird auch der Eiweissgehalt entweder mit der Ninhydrinreaktion oder durch Messen der Extinktion bei 280 bzw. 225 nm bestimmt. Man erhält im allgemeinen 4 Fraktionen, deren drei erste (A, B und C der Fig. 1) relativ wenig Hemmstoff enthalten. Die letzte Fraktion (D; ungefähr 25 × 5 ml), die etwa 70% der aufgetragenen Hemmaktivität enthält, wird im Rotationsverdampfer unter Vakuum bis fast zur Trockene eingedampft und in 15 ml Trispuffer (0,01 M; pH 8,0) gelöst.

7. *Chromatographie an DEAE-Sephadex A 25*: 60 g DEAE-Sephadex A 25 werden in 3 l Wasser suspendiert. Nach erfolgter Quellung dekantiert man die überstehende Lösung, gibt 0,5 N Salzsäure im Überschuss hinzu, filtriert das Gel auf einer Glasnutsche ab und wäscht es mit Wasser säurefrei. Darauf behandelt man den Ionenaustauscher mit 0,5 N Natronlauge, filtriert und wäscht ihn solange mit Wasser, bis aller Alkaliüberschuss entfernt ist. Das Sephadexgel wird nun in Trispuffer von pH 8 [pro Liter 1,21 g Tris (0,01 M) und 0,525 g Magnesiumacetat (0,0025 M), mit Essigsäure auf pH 8,0 eingestellt] suspendiert und in ein Chromatographierohr (3,5 × 55 cm) eingeschlämmt.

Nach Sedimentation des Gels wird die Kolonne solange mit dem gleichen Trispuffer durchgespült, bis das pH der ausfliessenden Lösung 8,0 beträgt. Nach sorgfältigem Auftragen der Hemmstofflösung (Fraktion D) wird das Chromatogramm mit einem Magnesiumacetatgradienten in Trispuffer (0,01 M; pH 8,0) entwickelt, der von 0,0025 M bis 0,1 M evtl. bis 0,2 M geht. Ein annähernd linearer Gradient wird dadurch erreicht, dass man 500 ml Anfangspufferlösung in einer 500-ml-Saugflasche unter Rühren mit einem Magnetrührer langsam aus einem Tropftrichter mit dem Endpuffer versetzt und die aus dem seitlichen Ansatz austretende Lösung auf die Kolonne fliessen lässt. Bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/3 min werden Eluatfraktionen von 5 ml aufgefangen und deren Hemmaktivität bestimmt. Die aktiven Lösungen werden entsprechend den 3 bis 5 gefundenen Aktivitätsgipfeln vereinigt und jede dieser Fraktionen im Vakuumrotationsverdampfer bis auf 5 ml eingengt. Die Hemmstofffraktionen D-1 bis D-5 werden dann bei pH 7,5 unter Kühlung auf 4° mit abs. Äthanol bis zu einer Alkoholkonzentration von 95 Vol.-% versetzt. Der ausfallende Hemmstoff jeder Fraktion wird bei 4° abzentrifugiert, mit 20 ml 95-proz. Äthanol gewaschen und nach nochmaliger Zentrifugation in bidestilliertem Wasser gelöst. Die erhaltenen Hemmstofflösungen werden lyophil getrocknet.

8. *Chromatographie an CM-Cellulose*: Die Hemmstoffpräparate D-1 bis D-5 werden in je 3–5 ml Natriumacetatpuffer (0,01 M; pH 5,5) gelöst. Diese Lösung wird auf eine CM-Cellulose-Säule (1,2×30 cm; SERVA, Heidelberg) aufgetragen, die durch langes Durchspülen mit dem gleichen Natriumacetatpuffer sorgfältig äquilibriert worden war. Das Chromatogramm wird mit einem Natriumacetatpuffer-Gradienten (0,01 M bis 0,1 M) bei pH 5,5 entwickelt. In einigen Fällen muss die Gradientenkonzentration bis auf 1,0 M gesteigert werden, um die stärksthäftenden Fraktionen zu eluieren. Die Aktivitätsbestimmung des in Portionen von 3 oder 5 ml aufgefangenen Eluates ergibt 3 Aktivitätsgipfel, deren jeweilige Fraktionen vereinigt werden. Nach Eindampfen im Vakuum auf 5 ml fügt man zu jeder der drei Lösungen abs. Äthanol, bis die Alkoholkonzentration 95 Vol.-% beträgt, und hält die Lösung solange auf –20°, bis die überstehende Flüssigkeit ganz klar geworden ist. Der Niederschlag wird in der Kälte zentrifugiert, zweimal mit 95-proz. Äthanol gewaschen, in 0,1-proz. Essigsäure gelöst und lyophilisiert. Die Präparate CM-2 und CM-3, nicht aber CM-1, ergeben je zwei Unterfraktionen, wenn ihre bei Zimmertemperatur gesättigte Lösung auf –20° abgekühlt wird. Es fällt ein bei dieser Temperatur schwerer löslicher Anteil aus, der in der Kältezentrifuge abgetrennt wird. Der schwerlösliche Anteil der Fraktion CM-3 ist bedeutend grösser als jener des Präparates CM-2.

B. Bestimmung der Hemmaktivität gegenüber Trypsin

1. *Herstellung der Reagenslösungen*. – a) *Substratlösung*: 250 mg N α -Benzoyl-arginin- β -naphthylamid (FLUKA) werden in 100 ml Methanol gelöst.

b) *Pufferlösung*: Man löst 684 mg Veronalnatrium (*p. a.* MERCK) in etwa 50 ml Wasser, fügt 16,9 ml 0,1 N Salzsäure hinzu und stellt den pH-Wert dieser Lösung auf 7,80 ein. Darauf wird das Volumen mit Wasser auf 100 ml ergänzt.

c) *Trypsinlösung*: 10,0 mg Trypsin (BOEHRINGER) werden in ungefähr 40 ml 0,1 N Salzsäure gelöst. Man setzt 0,1 ml Chloroform und 3 Tropfen einer gesättigten Calciumchloridlösung zu und bringt das Volumen mit 0,1 N Salzsäure auf 100 ml. Diese Fermentstammlösung ist bei 4° etwa 2–3 Wochen haltbar. Vor Gebrauch wird sie mit Wasser 1:10 verdünnt (Trypsinkonzentration der Gebrauchslösung: 20 μ g/ml).

d) *Echtblausalz-B-Lösung*: 100 mg Echtblausalz-B (tetraazotiertes Di-*o*-anisidin-Zinkdoppelsalz, FLUKA) werden unmittelbar vor Gebrauch in 100 ml Wasser gelöst.

e) *1 N Trichloressigsäurelösung*: 163,5 g Trichloressigsäure (*p. a.* MERCK) werden mit Wasser zu 1000 ml gelöst.

2. *Bestimmung der Hemmaktivität*: In ein Schliffreagensglas (A) werden 3 ml, in ein zweites (B) 4 ml der Pufferlösung (1 b) und in beide Gläser je 1 ml Substratlösung (1 a) pipettiert. Beide Lösungen werden im Thermostaten auf 38° erwärmt. Zum Ansatz A wird 1 ml der Hemmstofflösung in geeigneter Verdünnung (Rohextrakt 1:200; Magnesiumsulfatfällung 1:1000; Äthanol-fällung (70–90%) 1:5000; Ammoniumsulfatfällung 1:5000; Pikrinsäurefällung 1:10 000; Fraktion D 1:25 000; Fraktionen D-1 bis D-5 1:500 bis 1:25 000, je nach Grösse der Fraktion; CM-1 bis CM-3 1:10 000 bis 1:20 000) zugefügt. Die Reaktion wird im Ansatz A und B durch Zupipettieren von je 1 ml Trypsinlösung (1 c: 20 μ g/ml) eingeleitet. Nach 27 min werden in beide Gläser je 1 ml Echtblausalzlösung (1 d) hinzugefügt und die Fermentreaktion nach weiteren 3 min durch Hinzupip-

pettieren von 1 ml Trichloressigsäurelösung (1e) unterbrochen, was gleichzeitig auch die Kupplungsreaktion zwischen dem fermentativ freigesetzten β -Naphthylamin und Echtblausalz B unterbricht. Der gebildete Azofarbstoff wird in beiden Gläsern mit je 10 ml Essigsäure-äthylester ausgeschüttelt. Zur Trennung der beiden Phasen lässt man 30 min im Eisbad, dann 30 min bei Zimmertemperatur stehen und dekantiert die Essigesterphase in Reagensgläser, die eine Spatelspitze wasserfreies Natriumsulfat enthalten. Die klare Farblösung wird bei 525 nm im Spektrophotometer gemessen. Da der Farbstoff nicht stabil ist, muss die Messung nach genau gleichbleibenden Zeiten erfolgen. Aus den abgelesenen Extinktionswerten werden die entsprechenden μg β -Naphthylamin aus einer Standardkurve abgelesen. Sie stellen das β -Naphthylamin dar, das unter identischen Bedingungen durch die gleiche Trypsinmenge mit bzw. ohne Hemmstoff aus dem Substrat abgespalten wurde. Der Differenzwert (Ansatz B minus Ansatz A) multipliziert mit dem reziproken Wert der Hemmstoffverdünnung ergibt die Hemmaktivität/ml Lösung d.h. die Anzahl μg β -Naphthylamin, die wegen der Trypsinhemmung während den 30 min Inkubationszeit nicht aus dem Substrat abgespalten werden konnten. Um die Hemmaktivität verschiedener Präparate unter denselben Bedingungen prüfen zu können, soll die Hemmstoffverdünnung so gewählt werden, dass das eingesetzte Trypsin zu etwa 50% gehemmt wird.

C. Stickstoffbestimmung. – Nach KJELDAHL-Aufschluss wurde das gebildete Ammoniak entweder durch Halbmikrotitration (Einsatz pro Analyse: 0,15 bis 0,3 mg N) oder mit Hilfe der empfindlicheren Indophenolblaumethode [9] (Einsatz: 10–20 μg N) bestimmt.

D. Die Bestimmung der Hexosen erfolgte mit Hilfe der Anthronmethode [10].

E. Aminosäureanalyse. – Zur quantitativen Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung wurden je 1,2–1,5 mg Präparat in 6N Salzsäure während 36 und 72 Std. bei 110° hydrolysiert, die Säure im Vakuum verdampft und der Rückstand in 2,000 g 0,1N Salzsäure aufgenommen. 1,000 g dieser Lösung wurde mit 0,250 g L-Norleucin-Standardlösung (2,5 $\mu\text{Mol/g}$) und 1,875 g 0,1N Salzsäure vermischt. 1,000 g der so erhaltenen Lösung enthält neben den zu bestimmenden Aminosäuren 0,2 μMol L-Norleucin als internen Standard. Die Aminosäurechromatographie wurde nach der Vorschrift und mit dem Aminosäure-Analyser der TECHNICON CORP., New York, durchgeführt.

F. UV.-Spektrum. – Die Extinktionen der Fraktionen D-1 bis D-3 und der Präparate CM-1 bis CM-3 zwischen 450 und 220 nm wurden in saurer und in alkalischer Lösung in einem UNICAM S. P. 800 Spektrophotometer registriert. Die Lösungen enthielten 1,0–1,5 mg Eiweiss/ml 0,1N Salzsäure bzw. 0,05N Natronlauge.

G. Papierelektrophorese. – Die Elektrophoresen der Präparate D-1 bis D-3 und CM-1 bis CM-3 wurden auf WHATMAN No 1-Streifen in Natriumcitrat-Salzsäurepuffer bei pH 2,0 und 4,0 durchgeführt. Nach Anfärben mit Amidoschwarz 10 B erfolgte die photometrische Auswertung im Densicord (PHOTOVOLT CORP. New York). Die Hochspannungselektrophorese wurde in einer GILSON-Apparatur auf WHATMAN 3 M Filterpapier bei pH 7,5, 800 V und 25 mA während 2 Std. ausgeführt.

Wir danken der J. R. GEIGY AG, Basel, bestens für ein Doktorandenstipendium und weitere materielle Unterstützung dieser Untersuchungen. Weiter danken wir dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG, der uns im Rahmen einer anderen Untersuchung die Anschaffung eines Aminosäuren-Analyzers «TECHNICON» ermöglichte.

SUMMARY

The purification of a trypsin inhibitor from *Ascaris lumbricoides* var. *suum* is described. The electrophoretically pure preparation which inhibits trypsin in a specific manner is a relatively small peptide containing 5 Asp, 4 Thr, 1 Ser, 11 Glu, 6 Pro, 6 Gly, 5 Ala, 2 Val, 10 (Cys)_{1/2}, 3 Ile, 2 Phe, 7 Lys, 3 Arg and 1 Try.

Physiologisch-chemisches Institut
der Universität Freiburg

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] E. WEINLAND, Z. Biol. 44, 1 (1903).
 [2] L. B. MENDEL & H. F. BLOOD, J. biol. Chemistry 8, 177 (1910); J. M. HAMILL, J. Physiol. 33, 479 (1905); B. BONSDORFF, Acta med. scand. 100, 459 (1939).
 [3] N. M. GREEN, Biochem. J. 66, 416 (1957).
 [4] H. B. COLLIER, Canad. J. Res. 19B, 91 (1941).
 [5] R. J. PEANASKY, Federation Proc., 22, 246 (1963); R. J. PEANASKY & M. SR. LASKOWSKY, Biochim. biophysic. Acta, 37, 167 (1960); R. J. PEANASKY & M. M. SZUCS, J. biol. Chemistry 239, 2525 (1964).
 [6] J. PUDDLES, Ciência e Cultura, 14, 216 (1962); J. PUDDLES & F. H. RÔLA, Proc. 6th Intern. Congr. Biochem., New York 1964, Abstract IV 134; F. H. RÔLA & J. PUDDLES, Arch. Biochemistry Biophysics, 113, 134 (1966).
 [7] J. PUDDLES, F. H. RÔLA & A. K. MATIDA, Arch. Biochemistry Biophysics 120, 594 (1967).
 [8] E. F. HARTREE, Analyt. Biochemistry 7, 103 (1964).
 [9] M. P. E. BERTHELOT, Rép. Chim. appl. 1859, 282; A. HÄUSSLER & P. HADJU, Klin. Wschr. 38, 874 (1960); W. T. BOLLETER, Analyt. Chemistry 33, 593 (1961).
 [10] M. M. GRAF, J. Lab. clin. Med. 37, 736 (1951); C. VON HOLT, Klin. Wschr. 32, 661 (1954).

217. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen

60. Mitteilung [1]

Synthese der 8-Desoxynonactinsäure

von H. Gerlach und E. Huber

(22. IX. 67)

Das Antibiotikum Nonactin wurde bei der Strukturaufklärung unter anderm auch mit konzentrierter Bromwasserstoffsäure in der Wärme behandelt. Die reduktive Entbromierung der Reaktionsprodukte ergab neben β -Hydroxy- α -methyl-pelargon-säure eine weitere Säure $C_{10}H_{18}O_3$, die als Methylester und als kristallines Anilid charakterisiert wurde [2]. Es handelt sich dabei um eine von der Nonactinsäure (I, R = OH), dem Baustein des Nonactins, abgeleitete Säure I mit R = H, der die Hydroxylgruppe in 8-Stellung fehlt. Die relative Konfiguration der Kohlenstoffatome C-2, C-3 und C-6 ist in dieser 8-Desoxynonactinsäure erhalten geblieben. Dies wurde experimentell bewiesen durch Umwandlung des Nonactinsäure-methylesters in das *p*-Toluolsulfonat und das Bromid, gefolgt von einer hydrogenolytischen Entfernung des Broms [3]. Im folgenden wird über eine Synthese dieser Abbausäure berichtet.

Die 8-Desoxynonactinsäure ist ein 2,5-disubstituiertes Tetrahydrofuran-derivat mit *cis*-Stellung der beiden Substituenten. In einer früheren Arbeit wurde gezeigt, dass man bei der katalytischen Hydrierung von 5-Alkylfuran-2-carbonsäure-methylestern mit Rhodium auf Aluminiumoxid als Katalysator Tetrahydrofuran-derivate mit *cis*-Konfiguration erhält [3]¹⁾. Es schien daher der Versuch aussichtsreich, die 8-Desoxynonactinsäure durch Hydrierung unter den genannten Bedingungen aus

¹⁾ Durch eine NMR.-Analyse lässt sich zeigen, dass die entsprechende *trans*-Verbindung bei der Hydrierung nicht in nachweisbaren Mengen gebildet wird. Erst nach der Epimerisierung des hydrierten Esters mit Natriummethylat-Methanol sind im NMR.-Spektrum die Signale der *trans*-5-Alkyltetrahydrofuran-2-carbonsäure-methylester nachzuweisen.