

## Hydrolysis-Resynthesis Equilibrium of the Lysine-15—Alanine-16 Peptide Bond in Bovine Trypsin Inhibitor (Kunitz)

Harald TSCHESCHE and Sigrid KUPFER

Organisch-Chemisches Institut der Technischen Universität München Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie

(Received 13 April 1976)

*Dedicated to Prof. H. Zahn on the occasion of his 60th birthday*

**Summary:** Catalytic amounts of bovine  $\beta$ -trypsin, bovine  $\alpha$ -chymotrypsin and porcine plasmin establish a true thermodynamic equilibrium between virgin (I) (reactive site Lys<sup>15</sup>-Ala<sup>16</sup> peptide bond intact) and modified (I\*) (this bond hydrolyzed) bovine trypsin/kallikrein inhibitor (Kunitz). The very slow reaction rates for attaining equilibrium are pH-dependent and differ for different enzymes. Optimal rates are for  $\beta$ -trypsin at pH 3.75, for  $\alpha$ -chymotrypsin at pH 5.5, and for plasmin at pH 5.0. Under conditions of optimum pH the equilibrium is reached with the highest rate by plasmin. In  $10^{-5}$ M inhibitor solutions the

equilibrium concentrations of virgin and modified inhibitor are established by plasmin after almost 300 days starting from either pure virgin or pure modified inhibitor. Thus, the hydrolysis constant  $K_{\text{Hyd}} = [I^*]/[I]$  is determined to be 0.33 at pH 5.0. In spite of many unsuccessful attempts, this demonstrates that the reactive site peptide bond Lys<sup>15</sup>-Ala<sup>16</sup> in the bovine trypsin inhibitor (Kunitz) can be hydrolyzed by catalytic amounts of endopeptidase. It further confirms that the hydrolyzed Lys<sup>15</sup>-Ala<sup>16</sup> peptide bond in modified inhibitor is subject to thermodynamic control resynthesis.

### *Hydrolyse-Resynthese Gleichgewicht der Lysin-15—Alanin-16 Peptidbindung im Rinder-Trypsin-Inhibitor (Kunitz)*

**Zusammenfassung:** Katalytische Mengen an Rinder- $\beta$ -Trypsin, Rinder- $\alpha$ -Chymotrypsin und Schweine-Plasmin stellen ein echtes thermodynamisches Gleichgewicht zwischen „virgin“ (I) (Lys<sup>15</sup>-Ala<sup>16</sup> Peptidbindung im reaktiven Zentrum intakt) und „modifiziertem“ (I\*) (diese Bindung hydrolysiert) Trypsin-Kallikrein-Inhibitor (Kunitz) vom Rind ein. Die sehr langsamen Reaktionsgeschwindigkeiten zur Erreichung des Gleich-

gewichts sind pH-abhängig und unterscheiden sich für verschiedene Enzyme. Optimale Geschwindigkeiten erhält man für  $\beta$ -Trypsin bei pH 3.75, für  $\alpha$ -Chymotrypsin bei pH 5.5 und für Plasmin bei pH 5.0. Unter optimalen pH-Bedingungen wird das Gleichgewicht am schnellsten durch Plasmin erreicht. In  $10^{-5}$ M Lösungen von Inhibitor werden die Gleichgewichtskonzentrationen von „virgin“ und modifiziertem Inhibitor durch

#### *Enzymes:*

Chymotrypsin (EC 3.4.21.1); plasmin (EC 3.4.21.7); trypsin (EC 3.4.21.4).

#### *Abbreviations:*

B: ArgNHNp, *N*<sup>α</sup>-benzoyl-DL-arginine *p*-nitroanilide;

S: CpeNHNp, *N*-(3-carboxypropionyl)phenylalanine *p*-nitroanilide.