

# Über die Aminopeptidaseaktivität des Schwangerenserums und ihre Beziehung zu dessen Vermögen, Oxytocin zu inaktivieren\*

Von

H. Tuppy und H. Nesvadba

Aus dem II. Chemischen Institut der Universität Wien

Mit 5 Abbildungen

(Eingegangen am 30. September 1957)

Einige chromogene Aminopeptidasesubstrate,  $\beta$ -Naphthylamide von  $\alpha$ -Aminosäuren, werden durch Schwangerenserum schneller gespalten als durch Seren nichtschwangerer Frauen. Besonders stark erhöht ist während der Gravidität der Spiegel eines Enzyms, welches L-Cystin-di- $\beta$ -naphthylamid hydrolysiert und mit Hilfe dieses Substrats quantitativ bestimmt werden kann. Es wird diskutiert, ob dieses Enzym mit dem Oxytocin inaktivierenden Prinzip des Schwangerenserums identisch ist.

Das Serum schwangerer Frauen ist imstande, das Hypophysenhinterlappenhormon Oxytocin rasch zu inaktivieren<sup>1, 2, 3, 4</sup>; die Seren von Männern und nichtschwangeren Frauen hingegen zerstören Oxytocin nur sehr langsam. Die Konzentration des als Oxytocinase bezeichneten inaktivierenden Prinzips im Serum nimmt während der Gravidität ständig zu und erreicht ihren Höhepunkt zur Zeit des Einsetzens der Wehen<sup>3, 5, 6</sup>. Der Oxytocinasespiegel des Kreißendenserums übersteigt den des Serums der nichtschwangeren Frau um etwa das Tausendfache<sup>5, 6</sup>. Die Ermittlung des Serum-Oxytocinasespiegels ist sowohl zur Schwangerschaftsdiagnose als auch zur Feststellung des Alters der Frucht empfohlen

\* Herrn Prof. Dr. F. Wessely, unserem verehrten Lehrer und Institutsvorstand, zu seinem 60. Geburtstag gewidmet.

<sup>1</sup> K. Fekete, Endokrinol. **7**, 1 (1930); **10**, 16 (1932).

<sup>2</sup> E. Werle und G. Effkemann, Arch. Gynäkol. **171**, 286 (1941).

<sup>3</sup> E. Werle, A. Hevelke und K. Buthmann, Biochem. Z. **309**, 270 (1941).

<sup>4</sup> E. Werle, K. Semm und R. Enzenbach, Arch. Gynäkol. **177**, 211 (1950).

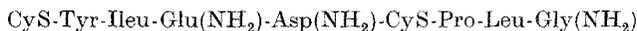
<sup>5</sup> E. W. Page, Amer. J. Obstet. Gynecol. **52**, 1014 (1946).

<sup>6</sup> E. W. Page, Science **105**, 292 (1947).

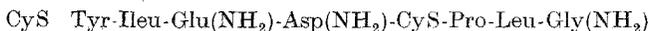
worden<sup>5, 6, 7, 8</sup>. Sie erfolgte bisher immer derart, daß die Aktivitätseinbuße, die Oxytocin bei Inkubation mit dem Serum erleidet, mit Hilfe des isolierten Ratten- oder Meerschweinchenuterus bestimmt wurde.

Die chemische Struktur des Oxytocins ist bekannt<sup>9, 10</sup>, nicht jedoch die Art seiner Inaktivierung durch die Oxytocinase. In der vorliegenden Arbeit werden Versuche beschrieben, deren Ergebnisse die Vermutung nahelegen, daß das inaktivierende Agens ein proteolytisches Ferment mit der Spezifität einer Aminopeptidase ist.

In einem informativen Experiment wurde Oxytocin mit dialysiertem Schwangerenserum inkubiert, bis seine hormonelle Wirksamkeit fast vollkommen zerstört war. Die Inkubationsmischung wurde mit Trichloressigsäure enteiweißt. Die in Lösung verbliebenen Produkte wurden mit Perameisensäure behandelt und hierauf papierchromatographisch untersucht: unter ihnen befand sich in beträchtlicher Menge freie Cysteinsäure (CySO<sub>3</sub>H) neben geringeren Mengen anderer freier Aminosäuren und einem Polypeptid, welches alle Aminosäurebausteine des oxydierten Oxytocins (CySO<sub>3</sub>H, Asp, Glu, Gly, Tyr, Pro und Leu/Ileu) enthielt. Als eine mögliche Deutung der Entstehung der freien CySO<sub>3</sub>H kam in Betracht, daß im Oxytocinmolekül



durch das inaktivierende Prinzip jene Peptidbindung angegriffen worden ist, welche dessen amino-endständigen Halbcystinrest (CyS) mit dem ihm benachbarten Tyrosinrest (Tyr) verknüpft, und daß die Perameisensäureoxydation das primäre Spaltprodukt



in CySO<sub>3</sub>H und Tyr-Ileu-Glu(NH<sub>2</sub>)-Asp(NH<sub>2</sub>)-CySO<sub>3</sub>H-Pro-Leu-Gly(NH<sub>2</sub>) verwandelt hat.

Wenn die Annahme zutrifft, daß die Oxytocinase den amino-endständigen Aminosäurerest in Oxytocin abspaltet, besitzt sie die Wirkungsweise einer Aminopeptidase; man sollte demnach erwarten, daß der enzymchemisch ermittelte Aminopeptidasespiegel im Serum von Schwangeren gegenüber jenem in Normalseren stark erhöht ist. Zur Prüfung dieser Annahme wurde die Aminopeptidaseaktivität in den Seren einiger schwangerer und nichtschwangerer Frauen ermittelt, wobei jeweils drei erprobte chromogene Aminopeptidasesubstrate, die  $\beta$ -Naphthylamide des Glycins<sup>11</sup>, DL-Alanins<sup>11</sup> und L-Leucins<sup>12, 13</sup>, zur Verwendung kamen.

<sup>7</sup> E. Werle und K. Semm, Arch. Gynäkol. **187**, 106 (1955).

<sup>8</sup> K. Semm, Klin. Wschr. **33**, 817 (1955).

<sup>9</sup> V. du Vigneaud, C. Ressler und S. Trippett, J. Biol. Chem. **205**, 949 (1953).

<sup>10</sup> H. Tuppy und H. Michl, Mh. Chem. **84**, 1011 (1953).

<sup>11</sup> G. Gomori, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **87**, 559 (1954).

<sup>12</sup> J. E. Folk und M. S. Burstone, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **89**, 473 (1955).

<sup>13</sup> M. N. Green, K.-C. Tsou, R. Bressler und A. M. Seligman, Arch. Biochem. Biophysics **57**, 458 (1955).

Die Bestimmung des bei der Spaltung dieser Substrate freiwerdenden  $\beta$ -Naphthylamins erfolgte nach *Green, Tsou, Bressler* und *Seligman*<sup>13</sup> mit Hilfe einer modifizierten *Bratton-Marshall*-Methode<sup>14</sup>.

Das Amin wird in saurer Lösung diazotiert und das Naphthyl-diazoniumsalz mit N-(1-Naphthyl)-äthylendiamin zu einem blauvioletten Farbstoff gekuppelt, der sich kolorimetrisch bestimmen läßt. Die Anwendung dieser Methode ergab anfänglich nicht reproduzierbare und bisweilen stark erniedrigte Meßwerte; nach langem Suchen wurde eine Fehlerquelle in einer beträchtlichen Lichtempfindlichkeit des Naphthyl-diazoniumsalzes gefunden; Diazotierung und Kupplung müssen unter Ausschluß direkter Sonnenstrahlung oder stärkeren diffusen Tageslichtes erfolgen. Auch eine Adsorption des Diazofarbstoffes an den Wandungen der Glasgefäße und der bei der kolorimetrischen Messung verwendeten Küvetten kann fehlerhafte Resultate verursachen; sie wird dadurch ausgeschlossen, daß man die

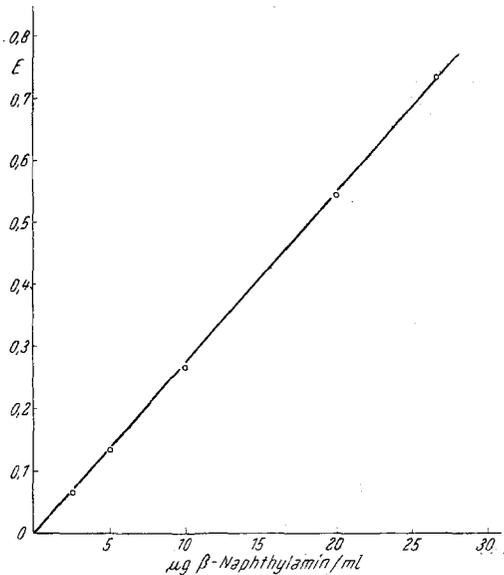


Abb. 1. Eichkurve für die kolorimetrische Aminopeptidasebestimmung

Tabelle 1. Spaltung verschiedener Aminosäure- $\beta$ -naphthylamide durch die Seren schwangerer und nichtschwangerer Frauen. Die enzymatische Aktivität der Seren wurde bei pH 7,4 bestimmt und ist in mg  $\beta$ -Naphthylamin/100 ml Serum/1 Std. angegeben<sup>13</sup>

Seren		Substrate: $\beta$ -Naphthylamide von					
		Glycin	DL-Alanin	L-Leucin	L-Cystin	L-Cystein	DL-Methionin
Schwangere im 10. Lunarmonat	S 43	16,25	79,2	47,2	<b>6,05</b>	0,60	2,75
	S 44	19,03	81,2	49,6	<b>5,80</b>	0,70	3,20
	S 45	16,40	77,6	50,4	<b>5,05</b>	0,58	2,95
Mittel ( $M_1$ )		17,23	79,3	49,1	<b>5,63</b>	0,63	2,97
Nichtschwangere	S 71	13,7	44,8	15,2	<b>0,50</b>	0,58	3,6
	S 72	7,35	26,1	12,8	<b>0,40</b>	0,56	2,5
	S 73	5,85	25,6	13,6	<b>0,40</b>	0,40	2,25
Mittel ( $M_2$ )		8,97	32,2	13,9	<b>0,43</b>	0,51	2,8
$M_1/M_2$		1,9	2,5	3,5	<b>13,1</b>	1,2	1,1

<sup>14</sup> A. C. *Bratton* und E. K. *Marshall*, J. Biol. Chem. 128, 537 (1939).

Bildung und Messung des Farbstoffes nicht in wäßriger Lösung, sondern in verdünntem Aceton vornimmt.

Es zeigte sich, daß durch Seren von Schwangeren im 10. Lunarmonat Glycin- $\beta$ -naphthylamid im Durchschnitt 1,9mal, DL-Alanin- und L-Leucin- $\beta$ -naphthylamid 2,5- bzw. 3,5mal so rasch gespalten wurden als durch Normalseren (Tabelle 1). *Green et al.*<sup>13</sup> hatten beobachtet,

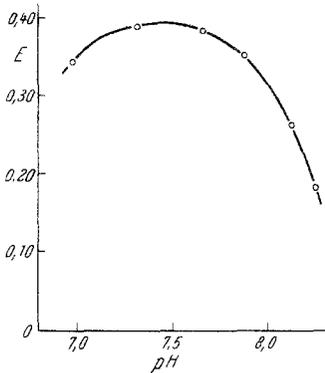


Abb. 2 (oben). pH-Abhängigkeit der Spaltung des L-Cystin-di- $\beta$ -naphthylamids durch Schwangerenserum

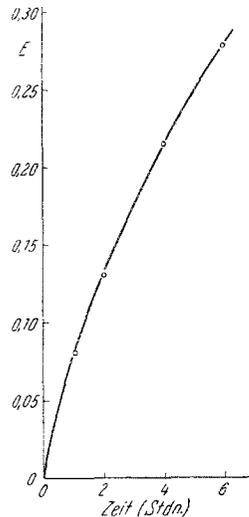


Abb. 3 (rechts). Abhängigkeit der Spaltung des L-Cystin-di- $\beta$ -naphthylamids durch Schwangerenserum von der Inkubationsdauer. pH 7,8

daß Schwangerenserum gegenüber L-Leucin- $\beta$ -naphthylamid als Substrat eine durchschnittlich 1,8mal höhere enzymatische Aktivität zeigen als andere Seren.

Die Aminopeptidaseaktivität des Serums ist also während der Gravidität in signifikanter Weise erhöht, aber bei weitem nicht so sehr wie der Oxytocinasespiegel. Auffallend war jedoch der Befund, daß die Verwendung verschiedener Enzymsubstrate eine verschieden starke Vermehrung der Aktivität ergab; er deutete darauf hin, daß im Serum nicht nur eine einzige Aminopeptidase vorkommt, sondern zwei oder mehrere Enzyme mit unterschiedlicher Substratspezifität. Denn wäre für die Spaltung der drei Substrate sowohl im Normal- als auch im Schwangerenserum ein und dasselbe Prinzip verantwortlich (ein einziges Enzym also mit großer Wirkungsbreite, wie z. B. die von *E. L. Smith* eingehend untersuchte „Leucin-Aminopeptidase“<sup>15, 16</sup>), so sollte die Erhöhung der Aktivität während der Gravidität alle Substrate in gleichem Maße betreffen.

<sup>15</sup> *E. L. Smith*, *Advanc. Enzymol.* **12**, 191 (1951).

<sup>16</sup> *E. L. Smith* und *D. H. Spackman*, *J. Biol. Chem.* **212**, 271 (1955).

Man konnte infolgedessen auch an die Möglichkeit denken, daß im Serum während der Schwangerschaft eine Aminopeptidase vermehrt vorkommt, welche in spezifischerer Weise Substrate von der Art des Oxytocins angreift. Da Oxytocin durch einen N-terminalen Halbcystinrest ausgezeichnet ist, war es naheliegend, chromogene Aminopeptidase-substrate zu synthetisieren, welche ebenso wie das Polypeptidhormon N-terminale Halbcystinreste enthalten. Das einfachste, L-Cystin-di- $\beta$ -naphthylamid, wurde (auf drei verschiedenen Wegen) dargestellt. Seine

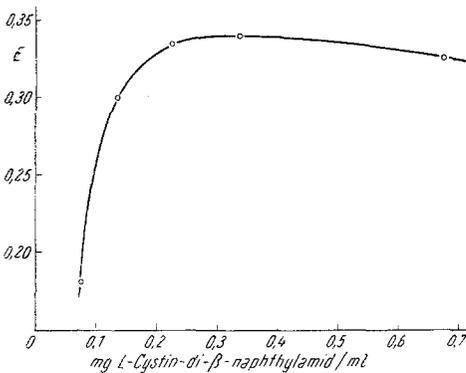


Abb. 4. Einfluß der Konzentration des Substrats (L-Cystin-di- $\beta$ -naphthylamid) auf die Geschwindigkeit seiner Spaltung durch Schwangerenserum. 4 Stdn. Inkubation, 37°, pH 7,8

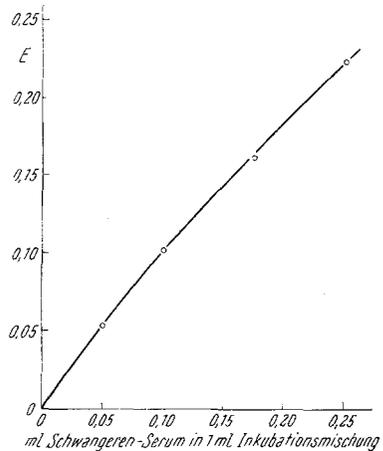


Abb. 5. Einfluß der Enzymkonzentration (Serummenge) auf die Geschwindigkeit der Spaltung des Substrats (L-Cystin-di- $\beta$ -naphthylamid). 4 Stdn. Inkubation bei pH 8,2 und 37°

Spaltung durch Schwangerenserum erfolgt, wie Tabelle 1 zeigt, bedeutend (durchschnittlich 13,1mal) schneller als durch Normalserum. Es ist bemerkenswert, daß hingegen die  $\beta$ -Naphthylamide der anderen zwei natürlich vorkommenden schwefelhaltigen Aminosäuren, des Cysteins und des Methionins, durch das Serum von Schwangeren kaum stärker als durch das von Nichtschwangeren gespalten werden. Auf Grund dieser Ergebnisse wurde die enzymatische Hydrolyse des Cystin-di- $\beta$ -naphthylamids näher untersucht.

Die Enzymreaktion geht optimal zwischen pH 7,2 und 7,7 vor sich (Abb. 2). Interessant und wichtig ist jedoch, daß mit steigendem pH die Geschwindigkeit der Spaltung des Cystin-di- $\beta$ -naphthylamids durch Schwangerenserum langsamer absinkt als die der Spaltung durch Nichtschwangerenserum; so kommt es, daß der Quotient der Aktivitäten von Schwangeren- und Normalserum, der bei pH 7,4 als 13,1 bestimmt worden ist (Tabelle 1), bei pH 7,8 etwa 23 beträgt. Die Hydrolysegeschwindigkeit nimmt bei längerdauernder Inkubation etwas ab (Abb. 3).

Die Substratkonzentration hat auf die enzymatische Reaktion keinen nennenswerten Einfluß, sofern sie 250  $\mu\text{g/ml}$  übersteigt (Abb. 4). Auch bei hoher Substratkonzentration (675  $\mu\text{g/ml}$ ) ist die Geschwindigkeit der Substratspaltung der Enzymkonzentration im Ansatz nicht streng proportional (Abb. 5); ein Grund für die Abweichung von der Proportionalität kann eine zu geringe Löslichkeit des Substrats im neutralen und alkalischen pH-Bereich sein, die dazu führen mag, daß die effektive Substratkonzentration in den Inkubationsansätzen die zur Sättigung des Enzyms erforderliche Höhe nicht erreicht.

Einige anorganische Ionen und organische Substanzen wurden auf ihre Fähigkeit geprüft, die Spaltung des Cystin-di- $\beta$ -naphthylamids durch Schwangerenserum zu beeinflussen (alle in einer Konzentration von 0,001 m).  $\text{Co}^{++}$  war ohne Einfluß,  $\text{Zn}^{++}$  und  $\text{Mn}^{++}$  hemmten 40% bzw. 30%.  $\text{Ca}^{++}$  erwies sich als wirkungslos. Komplexon rief eine 40%ige Hemmung hervor, während Oxalat ohne Einfluß blieb. Cyanid, Ascorbinsäure und Cystein hemmten je 30%. N-Äthylmaleinimid hatte keinen Effekt.

Es ist in diesem Zusammenhang erwähnenswert, daß die Oxytocinase den Angaben von *Werle* und *Semm*<sup>17</sup> zufolge, ebenso wie das von uns bearbeitete Enzym durch Metallchelatlöser wie Komplexon gehemmt wird. Andererseits berichten *Werle*, *Hevelke* und *Buthmann*<sup>3</sup>, daß die Oxytocinase weder durch Cyanid noch durch Mangan gehemmt werde, während diese Ionen die Hydrolyse des Cystin-di- $\beta$ -naphthylamids herabsetzen.

Gegen die Annahme, daß Oxytocin und Cystin-di- $\beta$ -naphthylamid Substrate des gleichen Enzyms sind, scheint jedoch vor allem auch zu sprechen, daß die Inaktivierung des Polypeptidhormons durch Kreißenderenserum 1000mal schneller als durch Nichtschwangerenserum<sup>5</sup>, die Spaltung des chromogenen Substrats hingegen nur 13mal (bei pH 7,4) oder 23mal schneller (bei pH 7,8) erfolgt. Diese Diskrepanz schließt jedoch eine Identität der beteiligten Enzyme nicht schlechthin aus. Sie könnte z. B. dadurch zustande kommen, daß Cystin-di- $\beta$ -naphthylamid außer von der Oxytocinase auch in geringem Maße von einer anderen Aminopeptidase angegriffen wird, welche in Nichtschwangerenserum vorhanden und deren Konzentration während der Gravidität nicht beträchtlich erhöht ist; unter dieser Voraussetzung würde das chromogene Substrat durch Normalserum schneller hydrolysiert, als auf Grund des äußerst niedrigen Oxytocinasegehaltes zu erwarten wäre, und das Verhältnis der enzymatischen Wirksamkeit von Schwangeren- und Nichtschwangerenserum wäre infolgedessen niedriger als erwartet. Es sind derzeit weitere Versuche im Gange, die zu einer Klärung dieser Fragen beitragen sollen.

<sup>17</sup> E. Werle und K. Semm, Arch. Gynäkol. 187, 449 (1956).

Der Befund, daß während der Schwangerschaft im Serum in beträchtlich vermehrter Menge ein Enzym anzutreffen ist, dessen Aktivität sich auf chemischem Wege ohne große Mühe quantitativ bestimmen läßt, hat medizinisches Interesse, — ob es sich nun bei dem Enzym um die Oxytocinase selbst handelt oder nicht. Das Auftreten und die Eigenschaften des Enzyms werden auch unter dem medizinischen Blickwinkel weiter bearbeitet.

## Experimenteller Teil

### I. Synthese der chromogenen Aminopeptidasubstrate

*Glycin- und DL-Alanin- $\beta$ -naphthylamid* wurden nach den Angaben von Gomori<sup>11</sup> aus Chloracetyl- bzw.  $\alpha$ -Brompropionyl- $\beta$ -naphthylamin<sup>18</sup> durch Umsetzung mit  $\text{NH}_3$  in wäßr. Methanol dargestellt.

#### L-Leucin- $\beta$ -naphthylamid

*Carbobenzoxy-L-leucin- $\beta$ -naphthylamid.* 2,75 g Carbobenzoxy-L-leucin (ölig)<sup>19</sup> wurden in 4 ml absol. Tetrahydrofuran (THF) mit 1,4 ml Triäthylamin versetzt und bei  $-5^\circ$  mit 1,12 g Chlorkohlensäureäthylester zur Reaktion gebracht. Nach 10 Min. Stehen wurden zur gallertig erstarrten Masse 1,55 g  $\beta$ -Naphthylamin, in 3 ml THF gelöst, zugesetzt. Die festwerdende Reaktionsmischung blieb über Nacht bei Zimmertemp. stehen, wurde hierauf in 50 ml Essigester aufgenommen und in dieser Lösung mit Wasser, 0,1 n HCl, Wasser und  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung gewaschen. Nach Trocknen wurde das Carbobenzoxy-L-leucin- $\beta$ -naphthylamid durch Abdampfen des Essigesters in Form seines von Green et al.<sup>13</sup> beschriebenen Hemihydrats erhalten: weiße Nadeln vom Schmp. 127 bis  $129^\circ$ ; Ausbeute 1,7 g (41% d. Th.).

*L-Leucin- $\beta$ -naphthylamid.* Die Abspaltung des Carbobenzoxyrestes erfolgte nach der Methode von Ben-Ishai und Berger<sup>20</sup>. 1,23 g Carbobenzoxyverbindung wurden mit 5 ml HBr-Eisessig (38%ig) versetzt. Nach 1stünd. Stehen bei Zimmertemp. wurde durch Zusatz von 100 ml absol. Äther das Hydrobromid des Leucin- $\beta$ -naphthylamids in ölicher Form ausgefällt und nach Abgießen des Äthers in Wasser gelöst. Bei Zusatz von verd. Ammoniak fiel das freie Leucin- $\beta$ -naphthylamid in krist. Form aus. Nach Lösen in verd. Essigsäure, Behandlung der warmen Lösung mit Tierkohle, Fällern mit  $\text{NH}_3$ , Waschen des Naphthylamids mit Wasser und Trocknen über  $\text{P}_2\text{O}_5$  betrug sein Schmp. 123 bis  $125^\circ$ . Ausbeute 0,72 g (90% d. Th.). Vor der Analyse wurde 3 Stdn. im Hochvak. bei  $70^\circ$  getrocknet.

$\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}$ . Ber. C 74,96, H 7,85. Gef. C 74,70, H 7,91.

Bei Sättigung seiner Lösung in Methanol-Äther (1:1) mit trock. HCl-Gas krist. das L-Leucin- $\beta$ -naphthylamid-Hydrochlorid in Nadeln vom Schmp. 239 bis  $241^\circ$  aus.

<sup>18</sup> A. Tigerstedt, Ber. dtsh. chem. Ges. **25**, 2919 (1892).

<sup>19</sup> M. Bergmann, L. Zervas und J. S. Fruton, J. Biol. Chem. **115**, 593 (1936).

<sup>20</sup> D. Ben-Ishai und A. Berger, J. Org. Chem. **17**, 1564 (1952).

L-Cystin-di- $\beta$ -naphthylamid

*Di-carbobenzoxy-L-cystin-di- $\beta$ -naphthylamid. Methode A<sup>21</sup>.* Zu einer Lösung von 1,60 g Di-carbobenzoxy-L-cystin<sup>22</sup> und 0,90 ml Triäthylamin in 3,5 ml absol. THF wurden tropfenweise bei  $-5^\circ$  unter Schütteln 0,63 g Chlorkohlensäureäthylester gefügt. Die entstandene Suspension blieb 10 Min. bei  $-5^\circ$  stehen und erhielt dann portionenweise einen Zusatz von 1,05 g  $\beta$ -Naphthylamin, gelöst in 3 ml absol. THF. Nach Stehen über Nacht bei Zimmertemp. wurde die gallertige Masse in 20 ml Essigester suspendiert, die Suspension mit Wasser, 0,1 n HCl, wieder mit Wasser und zuletzt mit 1%iger  $\text{NaHCO}_3$  gewaschen. Das durch Absaugen, Waschen und Trocknen erhaltene Rohprodukt (0,94 g) hatte einen Schmp. von 208 bis  $210^\circ$  (Zers.). Seine Reinigung erfolgte durch Lösen in heißem Pyridin und tropfenweisen Zusatz von Methanol. Das gallertig ausfallende Di-carbobenzoxy-cystin-di- $\beta$ -naphthylamid wurde mit Äther gründlich gewaschen. Ausbeute 0,91 g; Schmp. 225 bis  $227^\circ$ . Auch nachdem es 2 Stdn. bei  $80^\circ$  im Hochvak. getrocknet worden war, lag es anscheinend noch als Monohydrat vor.

$\text{C}_{42}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Ber. C 64,95, H 5,19. Gef. C 65,08, H 4,96.

Aus der rötlich gefärbten Essigesterlösung konnten durch Eindampfen des Lösungsmittels und Aufnehmen des Rückstandes in Methanol weitere 0,22 g derselben Substanz erhalten werden. Ausbeute insgesamt 47% d. Th.

In manchen Ansätzen wurde das Di-carbobenzoxy-L-cystin-di- $\beta$ -naphthylamid auch in seiner wasserfreien Form (Schmp. 255 bis  $257^\circ$ ) erhalten. (Analyse bei Methode B angegeben.)

*Methode B<sup>23</sup>.* 0,80 g Di-carbobenzoxy-L-cystin und 0,53 g  $\beta$ -Naphthylamin wurden in 3,5 ml THF gelöst und tropfenweise mit einer Lösung von 0,55 g Di-cyclohexyl-carbodiimid in 1 ml THF versetzt. Unter Selbsterwärmung schieden sich Dicyclohexyl-harnstoff und Dicarbobenzoxy-L-cystin-di- $\beta$ -naphthylamid ab. Nach Stehen über Nacht und Zugabe von Essigester wurden die auskristallisierten Reaktionsprodukte abgesaugt. Ihre Trennung gelang durch 3maliges Auskochen der Mischung mit siedendem Äthanol. Der Harnstoff ging dabei in Lösung; das Naphthylamid blieb zurück, wurde mit Äther gewaschen und getrocknet. Ausbeute 0,91 g (76% d. Th.); Schmp. 258 bis  $260^\circ$  (Zers.).

$\text{C}_{42}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}_2$ . Ber. C 66,46, H 5,04. Gef. C 66,51, H 5,26.

*Methode C<sup>24</sup>.* Zu einer Lösung von 2,0 g Di-carbobenzoxy-L-cystin in 5 ml absol. THF wurden 0,80 g Triäthylamin gefügt und dann bei  $-5^\circ$  unter Rühren 0,95 g Isovalerylchlorid zugetropft. Nach 3stünd. Stehen bei  $0^\circ$  folgte die Zugabe von 1,13 g  $\beta$ -Naphthylamin in 3 ml absol. THF. Die Reaktionsmischung stand über Nacht bei Zimmertemp., wurde dann mit Essigester aufgenommen und in der bei Methode A beschriebenen Weise auf Di-carbobenzoxy-cystin-di- $\beta$ -naphthylamid aufgearbeitet. Ausbeute 1,76 g (67% d. Th.); Schmp. 248 bis  $250^\circ$  (Zers.).

*L-Cystin-di- $\beta$ -naphthylamid.* Zur Abspaltung der Carbobenzoxyreste wurden 2,33 g der nach einer der drei Methoden dargestellten und feingepulverten Carbobenzoxyverbindung in 15 ml HBr-Eisessig suspendiert.

<sup>21</sup> R. A. Boissonas, Helv. Chim. Acta **34**, 874 (1951).

<sup>22</sup> M. Bergmann und L. Zervas, Ber. dtsch. chem. Ges. **65**, 1192 (1932).

<sup>23</sup> J. C. Sheehan und G. P. Hess, J. Amer. Chem. Soc. **77**, 1067 (1955).

<sup>24</sup> J. R. Vaughan und R. L. Osato, J. Amer. Chem. Soc. **73**, 5553 (1951).

Die sogleich einsetzende Gasentwicklung war nach  $1\frac{1}{2}$  Stdn. beendet und klare Lösung eingetreten. Zugabe von 100 ml Äther bewirkte Fällung des L-Cystin-di- $\beta$ -naphthylamid-hydrobromids in krist. Form. Es wurde mit Äther gewaschen und in 30 ml 50%igem wäbr. Äthanol gelöst. Bei tropfenweisem Zusatz verd. Ammoniak bis zu pH 4 fiel ein Teil des freien Naphthylamids aus, ging jedoch bei Erhitzen wieder in Lösung, mit Ausnahme einer harzigen Verunreinigung, von der die Lösung abgossen wurde. Nunmehr fortgesetzte Zugabe von Ammoniak (bis pH 8) fällte das Dinaphthylamid vollständig aus. Es wurde zur weiteren Reinigung in verd. Essigsäure gelöst, mit Tierkohle behandelt und nach deren Abfiltrieren wieder mit  $\text{NH}_3$  ausgefällt. Abgesaugt, mit verd. Methanol gewaschen und bei  $100^\circ$  im Vak. über  $\text{P}_2\text{O}_5$  getrocknet, schmolz das weiße Pulver bei  $167$  bis  $169^\circ$ . Ausbeute 1,18 g (78% d. Th.). Es ist in Wasser und Methanol kaum löslich, wohl aber in THF.

$\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}_2$ . Ber. C 63,64, H 5,34, S 13,07.

Gef. C 63,05, H 5,35, S 13,00.

#### L-Cystein- $\beta$ -naphthylamid

0,30 g Cystin-di- $\beta$ -naphthylamid wurden in 75 ml 2,5%iger Schwefelsäure 3 Stdn. lang mit 0,8 g Zinkstaub (p. a.) geschüttelt<sup>25</sup>. Nach Abfiltrieren des überschüssigen Zinkstaubes und Nachwaschen mit wenig Wasser wurde aus dem Filtrat durch Zugabe frisch bereiteten Kupferoxyduls ein violett-blau gefärbter Kupferkomplex des Cystein-naphthylamids ausgefällt. Die Suspension blieb über Nacht im Eiskasten. Nach Zusatz von 1 ml Eisessig wurde der Niederschlag abzentrifugiert und in der Zentrifuge 4mal mit je 50 ml Wasser gewaschen. Die Zersetzung der Kupferverbindung erfolgte in wäbr. Suspension (80 ccm) in der Siedehitze durch Einleiten von  $\text{H}_2\text{S}$ . Das  $\text{Cu}_2\text{S}$  wurde abfiltriert und mit  $\text{H}_2\text{S}$ -haltigem Wasser gründlich gewaschen. Aus dem warmem Filtrat ( $40^\circ$ ) wurde der gelöste  $\text{H}_2\text{S}$  durch Einleiten von Stickstoff vertrieben und das Cystein-naphthylamid durch Zusatz von 0,1 n  $\text{NH}_3$  ausgefällt. Ausbeute 0,25 g (83% d. Th.). Schmp. (in einer mit  $\text{N}_2$  gefüllten Kapillare bestimmt)  $130$  bis  $132^\circ$ . Vor der Analyse wurde 2 Stdn. bei  $70^\circ$  im Hochvak. getrocknet.

$\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{OS}$ . Ber. C 63,38, H 5,73. Gef. C 63,43, H 5,43.

Die Umwandlung in sein *Hydrochlorid* erfolgte durch Lösen von 0,1 g Cystein- $\beta$ -naphthylamid in 2 ml absol. Methanol, Zusatz von 4 ml absol. Äther und Einleiten trock. HCl-Gases. Die Lösung wurde im Vak. bei Zimmertemp. eingedampft, der krist. Rückstand über NaOH im Vak. von überschüssigem HCl befreit und aus absol. Methanol-Äther umkristallisiert. Schmp.  $223$  bis  $225^\circ$  (Zers.).

$\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{OS} \cdot \text{HCl}$ . Ber. C 55,21, H 5,35. Gef. C 55,36, H 5,39.

#### D,L-Methionin- $\beta$ -naphthylamid

*Carbobenzoxy-D,L-methionin- $\beta$ -naphthylamid*. Die Darstellung erfolgte analog der des entsprechenden L-Leucin-Derivats. Aus Chloroform-Essigester (1 : 3) umgelöst, Nadeln vom Schmp.  $160$  bis  $162^\circ$ . Ausbeute 55% d. Th.

$\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ . Ber. C 67,67, H 5,92. Gef. C 67,67, H 6,10.

*D,L-Methionin- $\beta$ -naphthylamid*. 1,15 g Carbobenzoxy-Verbindung wurden durch 1stünd. Einwirkung von HBr-Eisessig (5 ml) bei Zimmertemp. de-

<sup>25</sup> N. W. Pirie, Biochemic. J. 25, 614 (1931).

carboboxyliert. Zusatz von 40 ml absol. Äther fällte das Hydrobromid des Methionin-naphthylamids zunächst als Öl aus. Anreiben mit einigen Tropfen Wasser brachte es zur Kristallisation. Aus seinem Hydrobromid wurde das freie Naphthylamid mit verd.  $\text{NH}_3$  in Freiheit gesetzt. Anreiben mit alkohol. HCl verwandelte das ölige Produkt in ein gut krist. *Hydrochlorid*, welches nach wiederholtem Umlösen aus absol. Methanoläther (1:1) und 2stünd. Trocknen bei  $100^\circ$  im Hochvak. einen Schmp. von  $172$  bis  $173^\circ$  zeigte. Ausbeute  $0,45$  g (52% d. Th.).

$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_8 \cdot \text{HCl}$ . Ber. C 57,95, H 6,16. Gef. C 58,31, H 6,25.

Alle Schmelzpunkte wurden im *Kofler*-Mikroschmelzpunktsapparat bestimmt und sind korrigiert.

## II. Die kolorimetrische Amino-peptidasebestimmung im Serum

*Die Serumproben.* Bei der Blutabnahme und Abtrennung der Erythrocyten muß darauf geachtet werden, daß es zu keiner Hämolyse kommt. Hämolytische Seren geben, mit Cystin-di- $\beta$ -naphthylamid als Substrat, zu hohe Amino-peptidasewerte, da in den Erythrocyten ein Enzym vorkommt, durch welches das Substrat ebenfalls gespalten wird. (Analoges gilt für den fermentativen Abbau des Oxytocins: das Hormon wird ebenfalls nicht nur durch die Oxytocinase des Schwangerenserums, sondern auch durch ein Erythrocytenferment abgebaut<sup>5, 7</sup>; hämolytische Seren täuschen infolgedessen zu hohe Serumoxytocinaseaktivität vor.) Seren können bei  $0$  bis  $5^\circ$  mindestens 48 Stdn. ohne nennenswerten Verlust an enzymatischer Wirksamkeit aufbewahrt werden.

*Herstellung der Substratlösungen.* Glycin- $\beta$ -naphthylamid (0,01 m), 2,20 mg je ml 0,012 n HCl; DL-Alanin- $\beta$ -naphthylamid (0,01 m), 2,36 mg unter Erwärmen in 1 ml 0,012 n HCl gelöst; L-Leucin- $\beta$ -naphthylamid (0,01 m), 3,22 mg des Hydrochlorids je 1 ml 0,001 n HCl; L-Cystin-di- $\beta$ -naphthylamid (0,0055 m), 2,70 mg je ml 0,012 n HCl, unter schwachem Erwärmen in Lösung gebracht; L-Cystein- $\beta$ -naphthylamid (0,01 m), 3,11 mg des Hydrochlorids je ml 0,001 n HCl; DL-Methionin- $\beta$ -naphthylamid (0,01 m), 3,14 mg des Hydrochlorids je ml 0,001 n HCl. — Da bei allen Bestimmungen (siehe unten) 0,25 ml Substratlösung mit 0,75 ml verd. Serums gemischt wurden, betrug die Substratkonzentration während der Enzymreaktion nur  $\frac{1}{4}$  der oben angegebenen Konzentration der Substratlösungen. Eine Abänderung der hier angeführten Substratmengen erfolgte bei dem durch die Abb. 4 dargestellten Versuch, dessen Ziel es war, die Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Spaltung des Cystin-di- $\beta$ -naphthylamids von dessen Konzentration zu ermitteln.

*Puffer.* Zur Einstellung der gewünschten pH-Werte während der enzymatischen Reaktion wurde stets 0,067 m Veronalpuffer (2 Teile *Michaelis*-Puffer<sup>26</sup> + 1 Teil Wasser) verwendet. Bei den in Tabelle 1 zusammengestellten Versuchen betrug das pH des Puffers 7,4; zur Verfolgung der Konzentrationsveränderungen, die das Cystin-di- $\beta$ -naphthylamid spaltende Enzym während der Schwangerschaft erfährt, hat sich jedoch ein pH des angewendeten Puffers von 7,9 als günstiger erwiesen. Da die Enzymsubstrate in verd. HCl gelöst eingesetzt wurden, war der pH-Wert der Mischungen von Serum, Puffer und Substrat während der Inkubation selbstver-

<sup>26</sup> L. Michaelis, J. Biol. Chem. 87; 33 (1930).

ständig etwas niedriger als der des verwendeten Puffers. In der Abb. 2, welche die pH-Abhängigkeit der Spaltung des Cystin-di-naphthylamids durch Schwangerenserum illustriert, wurden die mit der Glaselektrode bestimmten pH-Werte der Inkubationsmischungen und nicht die der verwendeten Puffer eingezeichnet.

*Die Bestimmung der Enzymaktivität.* Standardverfahren: 0,40 ml Serum werden mit 0,60 ml Wasser und 2,00 ml Veronalpuffer verdünnt. Von dieser Mischung werden in 2 Röhrchen je 0,75 ml pipettiert und mit je 0,25 ml Substratlösung (siehe oben) versetzt. In das erste Röhrchen, welches zur Bestimmung des Blindwertes dient, wird unmittelbar nach der Substratzugabe zur Verhinderung der Enzymreaktion 1,00 ml einer 10%igen Trichloressigsäurelösung pipettiert; das zweite Röhrchen wird 2 Stdn. bei 37° inkubiert und erst dann mit 1,00 ml Trichloressigsäure versetzt. Von nun an wird der Inhalt der beiden Röhrchen wieder auf gleiche Weise behandelt. Der ausgeflockte Eiweißniederschlag wird abzentrifugiert. Zu 1,00 ml der klaren überstehenden Lösung fügt man zunächst 9,0 ml einer Mischung von 2 Volumteilen 0,36 n HCl und 1 Volumteil Aceton (p. a., Merck). Die folgenden Zugaben müssen unter Ausschluß von Tageslicht (am besten in einer Dunkelkammer unter Rotlichtbeleuchtung) erfolgen und nach jedem Zusatz muß gründlich gemischt werden: 1,0 ml 0,1%ige NaNO<sub>2</sub> (zur Diazotierung des  $\beta$ -Naphthylamins), ungefähr 3 Min. später 1,0 ml 0,5%ige Ammonsulfamatlösung (zur Zerstörung überschüssigen Nitrits) und wieder ungefähr 3 Min. später 1,0 ml einer 0,1%igen wäbr. Lösung von N-(1-Naphthyl)-äthylen-diamin-di-hydrochlorid (Eastman Kodak). Nun läßt man bei 37° und ebenfalls im Dunkeln die Entwicklung des blauvioletten Farbstoffes vor sich gehen. Die maximale Farbe ist nach 3 Stdn. erreicht und bleibt dann viele Stdn. lang konstant. Die kolorimetrische Bestimmung wurde in unserem Laboratorium mit einem *Beckman*-Spektrophotometer in Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm und bei einer Wellenlänge von 565  $\mu$  vorgenommen. Aus den abgelesenen Extinktionen (Versuchswert minus Blindwert) läßt sich mit Hilfe einer Eichkurve (Abb. 1) die Menge des durch die enzymatische Reaktion freigesetzten Naphthylamins ermitteln. Bei Einhaltung der oben angegebenen Serumverdünnung und Inkubationsdauer sind die in Abb. 1 in  $\mu$ g  $\beta$ -Naphthylamin angeführten Abszissenwerte gleich der Zahl der Milligramme  $\beta$ -Naphthylamin, die von 100 ml des Serums in 1 Std. in Freiheit gesetzt werden<sup>13</sup>.

Wird die Aminopeptidaseaktivität des Serums mit Glycin- $\beta$ -naphthylamid als Substrat bestimmt, so kann man dem eben beschriebenen Standardverfahren ohne weiteres folgen. Verwendet man hingegen die schneller gespaltenen Naphthylamide des Alanins oder Leucins als Substrate, so ist es angezeigt, entweder die Inkubationszeit von 2 Stdn. auf eine kürzere Zeit oder die Serummenge im Inkubationsansatz auf  $\frac{1}{2}$  oder  $\frac{1}{4}$  herabzusetzen. Bedient man sich andererseits der langsamer hydrolysierten  $\beta$ -Naphthylamide des Cystins, Cysteins und Methionins, so empfiehlt sich eine Verlängerung der Inkubationsdauer auf 4 Stdn. (vgl. Abb. 3), eventuell auch eine Vermehrung der Serummenge in der mit Substrat versehenen Mischung (vgl. Abb. 5) und allenfalls bei der Photometrie die Verwendung von Küvetten mit einer Schichtdicke von 10 cm. Solche Abänderungen des Standardverfahrens müssen bei der Benützung der Eichkurve selbstverständlich berücksichtigt werden.

Zur Aufstellung der *Eichkurve* (Abb. 1) werden  $\beta$ -Naphthylaminlösungen bekannten Gehalts mit dem gleichen Volumen einer 10%igen Trichloressig-

säure verdünnt. Von diesen Mischungen werden jeweils 1,00 ccm entnommen (die Zahl der  $\mu\text{g}$   $\beta$ -Naphthylamin in 1 ccm Mischung ist der Abszissenwert der Eichkurve) und ebenso behandelt, wie es im Standardverfahren für 1 ccm der nach Zusatz von Trichloressigsäure zur Serum-Substrat-Mischung und Zentrifugieren erhaltenen überstehenden Flüssigkeit beschrieben worden ist.

Herrn Prof. Dr. *A. Lindner* sind wir für Anregungen zu der vorliegenden Arbeit und für wertvolle Hilfe, Herrn Dr. *O. Hornykiewicz* für Oxytocinbestimmungen zu großem Dank verpflichtet.

Die Elementaranalysen wurden von Herrn Doz. Dr. *G. Kainz* im Mikroanalytischen Laboratorium des II. Chemischen Instituts ausgeführt.

Für freundliche und großzügige Unterstützung danken wir der Firma Sanabo, Wien.