

# Reinigung und Eigenschaften der Serum-Oxytocinase

Von

H. Tuppy und E. Wintersberger

Aus dem Institut für Biochemie der Universität Wien

Mit 3 Abbildungen

(Eingegangen am 6. September 1960)

Das oxytocin-inaktivierende Ferment des Schwangerenserums ist durch fraktionierte Fällungen mit Ammonsulfat und Rivanol und anschließende Chromatographie auf Hydroxylapatit in einfacher Weise hoch gereinigt worden. Es werden Eigenschaften des gereinigten Enzyms, sowie Faktoren, welche die Bestimmung seiner Aktivität mit Hilfe des synthetischen Aminopeptidasesubstrates L-Cystin-di- $\beta$ -naphthylamid beeinflussen, beschrieben.

Nach Eintritt einer Schwangerschaft erscheint im Blutserum ein Ferment, welches befähigt ist, das wehenerregende Hormon des Hypophysenhinterlappens, Oxytocin, zu inaktivieren<sup>1-4</sup>. Die Konzentration des Enzyms — es wurde auf Grund seiner Wirkung als Oxytocinase bezeichnet — steigt während der Gravidität ständig an und erreicht am Geburtstermin ihren Maximalwert, um dann rasch abzusinken<sup>5, 6</sup>. Zur Ermittlung des Oxytocinase-Spiegels im Serum wurde üblicherweise der Aktivitätsverlust gemessen, den Oxytocin bei Inkubation mit Schwangerenserum erleidet; das nicht abgebaute Oxytocin wurde auf biologischem Wege mit Hilfe des isolierten Meerschweinchen- oder Rattenuterushorns<sup>3, 5</sup> oder mit Hilfe der Milchdrüse des lactierenden Kaninchens<sup>7</sup> bestimmt.

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

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

<sup>3</sup> E. Werle, A. Hevelke und K. Buttmann, 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); Science [New York] **105**, 292 (1947).

<sup>6</sup> K. Semm, Klin. Wschr. **33**, 817 (1955).

<sup>7</sup> C. J. Mendez-Bauer und M. A. Carballo, Segundo Congreso Uruguayo de Ginecología, **2**, 291 (1957).

Eigene Untersuchungen über die Wirkungsweise der Oxytoeinase ergaben gute Hinweise, daß das Enzym die Peptidbindung spaltet, die den aminoterminalen Halbcystinrest des Oxytocin-Moleküls mit dem benachbarten Tyrosinrest verknüpft, die Oxytoeinase demnach als proteolytisches Ferment mit der Spezifität einer Aminopeptidase zu bezeichnen ist<sup>8</sup>. Für diese Annahme sprach vor allem die Beobachtung, daß das synthetisch erhaltene Aminopeptidasesubstrat L-Cystin-di-β-naphthylamid, welches wie Oxytocin einen N-terminalen Halbcystinrest aufweist, durch Seren schwangerer Frauen rascher hydrolysiert wird als durch Normalseren. Im Verlaufe der Schwangerschaft nimmt die Fähigkeit des Serums, L-Cystin-di-β-naphthylamid zu spalten, parallel mit seiner Oxytocin spaltenden Aktivität zu. Diese Tatsache, sowie auch die Ähnlichkeit vieler Eigenschaften der Oxytoeinase mit denen der Cystin-di-β-naphthylamid spaltenden Aminopeptidase machten eine Identität der beiden Enzyme sehr wahrscheinlich, so daß die chemische Methode zur Ermittlung der Aminopeptidaseaktivität im Schwangerenserum — wenn sie mit L-Cystin-di-β-naphthylamid durchgeführt wird — als Oxytoeinasebestimmung angesprochen werden konnte<sup>9</sup>.

Zur weiteren Klärung der Frage nach der Identität der beiden Fermente wurde in der vorliegenden Arbeit eine Reinigung der für das Serum schwangerer Frauen typischen, L-Cystin-di-β-naphthylamid spaltenden Aminopeptidase vorgenommen und das gereinigte Ferment auf einige seiner Eigenschaften untersucht.

Zur Verfolgung der Enzymaktivität während der Reinigung wurde stets L-Cystin-di-β-naphthylamid als Substrat verwendet. Die Bestimmung des bei der Inkubation der Aminopeptidase mit dem Substrat freiwerdenden β-Naphthylamins erfolgte nach Green, Tsou, Bressler und Seligman<sup>10</sup> unter Berücksichtigung der Modifikation von Tuppy und Nesvadba<sup>8</sup>. Abweichend von dieser Methode wurde Triäthanolamin-puffer (TRA) von pH 7,4 an Stelle von Veronalpuffer verwendet; außerdem setzten wir, um das Substrat in Ansätzen mit niedriger Proteinkonzentration besser in Lösung zu halten, Gummi arabicum zu, welches die Schutzkolloidwirkung der Serumproteine weitgehend ersetzte.

Auch durch die Anwendung organischer Lösungsmittel wurde versucht zu verhindern, daß das in Wasser schwer lösliche Cystin-di-β-naphthylamid während der Aktivitätsbestimmung zum Teil ausfällt. Am günstigsten erwies sich Methylcellosolve, in dem sich Cystin-di-β-naphthylamid gut löst. Die enzymatische Aktivität der Oxytoeinase steigt um 15 bis 20%, wenn das Inkubationsgemisch 12,5% Methylcellosolve enthält. Höhere Konzentrationen des organischen Lösungsmittels bewirkten allerdings ein langsames Absinken

<sup>8</sup> H. Tuppy und H. Nesvadba, Mh. Chem. **88**, 977 (1957).

<sup>9</sup> W. Müller-Hartburg, H. Nesvadba und H. Tuppy, Arch. Gynäkol. **191**, 442 (1959).

<sup>10</sup> M. N. Green, K. C. Tsou, R. Bressler und A. M. Seligman, Arch. Biochem. Biophys. **57**, 458 (1955).

der Aktivität. Der Wirksamkeitsanstieg der Oxytocinase in Gegenwart geringer Mengen Methylcellosolve kann jedoch nicht allein auf der besseren Löslichkeit von Cystin-di- $\beta$ -naphthylamid beruhen, da auch die Aktivität gegenüber L-Leucin- $\beta$ -naphthylamid — dieses Substrat ist in Wasser relativ gut löslich und wird von der Oxytocinase rasch hydrolysiert<sup>11</sup> — um den gleichen Prozentsatz ansteigt. Außerdem wurde beobachtet, daß die kürzlich beschriebene kompetitive Hemmung der Oxytocinaseaktivität durch L-Cystinyl-di-L-tyrosinamid<sup>12</sup> in Anwesenheit von Methylecellosolve verringert war.

Als weiterer bei der Bestimmung der Oxytocinaseaktivität zu berücksichtigender Faktor erwies sich der Einfluß von höheren Konzentrationen an Kohlensäure. Als wir versuchten, die Oxytocinaseaktivität in nur wenig verdünntem (90proz.) Schwangerenserum zu bestimmen, fanden wir überraschenderweise, daß aus Cystin-di- $\beta$ -naphthylamid wie aus Leucin- $\beta$ -naphthylamid nur sehr geringe Mengen  $\beta$ -Naphthylamin freigesetzt wurden. Dieses Ergebnis ließ darauf schließen, daß im Serum ein Stoff vorhanden ist, der in höheren Konzentrationen den Abbau der Aminopeptidasesubstrate hemmt. Dieser Stoff ist sowohl im Schwangeren- als auch im Nichtschwangerenserum vorhanden und hemmt nicht nur die Wirkung der Oxytocinase, sondern auch die der im Nichtschwangerenserum vorkommenden Aminopeptidase; daraus war zu entnehmen, daß der Hemmkörper nicht am Enzym, sondern eher am Substrat angreift. Weiters konnte gezeigt werden, daß der Hemmstoff dialysabel und glühbeständig und daher ein anorganischer Bestandteil des Serums ist. Bei systematischer Untersuchung der im Serum vorkommenden anorganischen Stoffe zeigten nur Bicarbonat und Carbonat eine hemmende Wirkung auf die Aminopeptidaseaktivität. Durch Zugabe zusätzlichen Bicarbonats zum Serum (unter strenger Kontrolle des pH) konnte die Spaltung der  $\beta$ -Naphthylamide vollständig verhindert werden, während umgekehrt durch Entfernung der Kohlensäure aus dem Serum durch Evakuieren die Aktivität in hohem Maße wiedergewonnen wurde (Abb. 1).

Als Mechanismus dieser Hemmung ist eine Umsetzung der Aminogruppen der Substrate mit  $\text{CO}_2$  zu Carbaminsäurederivaten anzusehen. Diese Annahme hat zur Voraussetzung, daß ein beträchtlicher Teil der Aminogruppen beim pH des Serums (7,4) ungeladen vorliegt. Unseren Messungen zufolge liegt der pK-Wert der Aminogruppe des Leucin- $\beta$ -naphthylamids bei etwa 7,5. Die pK-Werte der Aminogruppen des Cystin-di- $\beta$ -naphthylamids konnten wegen der geringen Wasserlöslichkeit dieser Substanz nicht ermittelt werden, doch sind sie vermutlich noch niedriger als der pK-Wert von Leucin- $\beta$ -naphthylamid. Die Annahme der Carbaminsäurebildung konnte durch papier-

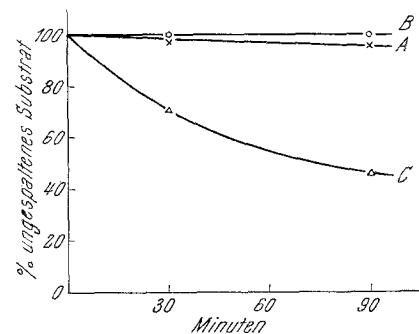


Abb. 1. Einfluß der  $\text{HCO}_3^-$ -Konzentration auf die enzymatische Spaltung des L-Cystin-di- $\beta$ -naphthylamids

- A. Spaltung in 90proz. Schwangerenserum
- B. Spaltung in 90proz. Schwangerenserum nach Zusatz von 4,5 mg  $\text{NaHCO}_3$ /ml Serum
- C. Spaltung in 90proz. Schwangerenserum nach teilweiser Entfernung der Kohlensäure

<sup>11</sup> E. Wintersberger und H. Tuppy, Mh. Chem. **91**, 406 (1960).

<sup>12</sup> E. Wintersberger, H. Tuppy und E. Stoklasa, Mh. Chem. **91**, 577 (1960).

elektrophoretische Befunde erhärtet werden: bei pH 7,4 wandert Leucin- $\beta$ -naphthylamid in  $\text{CO}_2$ -freiem 0,03 m Phosphatpuffer langsam zur Kathode, während sich die gleiche Substanz unter denselben Bedingungen in Gegenwart 0,03 m Bicarbonat deutlich zur Anode hin bewegt.

Zur Herstellung der gereinigten Oxytocinaselösung diente Retroplacentarserum als Ausgangsmaterial. Dieses wurde mit Ammonsulfat fraktioniert; die zwischen 40 und 60% Sättigung ausfallende Proteinfraktion enthielt das Enzym und wurde durch eine stufenweise Fällung mit Rivanol weiter angereichert. Der die Aktivität enthaltende Rivanolniederschlag wurde in Puffer gelöst und — nach Entfernung des überschüssigen Rivanols, sowie eines Teiles inaktiver Proteine durch Adsorption an Bentonit — auf einer Hydroxylapatitsäule chromatographiert. Eine Konzentrierung der gereinigten Oxytocinaselösung ließ sich durch Druckfiltration erreichen.

Die reinsten nach dieser Methode erhaltene Enzymlösung war gegenüber Retroplacentarserum 4500fach angereichert (Tab. 1). Versuche, das Enzym durch Chromatographie auf DEAE-Cellulose noch weiter zu reinigen blieben erfolglos.

Tabelle 1. Reinigung der Serum-Oxytocinase

Reinigungsstufe	Volumen (ml)	mg Protein/ ml Lösung	Aktivität (mg freigesetztes $\beta$ -Naphthylamin/g Protein/Stde)	Anreicherung	Aktivitäts- ausbeute (%)
Retroplacentar- serum	1000	73	0,8	1	100
Ammonsulfat- fällung	1000	20	1,8	2,3	63
Rivanolfällung und Behand- lung mit Bentonit	68	22	13	16,2	34
Chromato- graphie auf Hydroxyl- apatit	24	0,025	3640	4500	3,8

Der Beweis, daß es sich bei der so gereinigten Aminopeptidase um die Oxytocinase des Schwangerenserums handelt, daß also auch das hochgereinigte Enzympräparat — wie Schwangerenserum — imstande ist, Oxytoein zu inaktivieren, wurde in einer früheren Arbeit erbracht<sup>13</sup>.

<sup>13</sup> E. Stoklaska und E. Wintersberger, Arch. exper. Path. Pharmakol. **236**, 358 (1959).

Das gereinigte Ferment kann in 0,01 m TRA (pH 7,4) im Kühlschrank mehrere Wochen ohne nennenswerte Aktivitätseinbuße aufbewahrt werden. Ein 20 Min. langes Erhitzen auf 50° zerstört weniger als 10% der Aktivität, dagegen tritt bei pH-Werten unter 6 rasche Denaturierung ein. Durch Gefriertrocknung wird das Ferment vollständig inaktiviert.

Eine Bestimmung der Reinheit des Enzympräparates durch freie Elektrophorese oder mittels der Ultrazentrifuge konnte wegen der geringen Menge erhaltenen Ferments nicht durchgeführt werden, doch war es möglich, dieses auf Freiheit von Verunreinigung durch andere Aminopeptidasen zu prüfen. Wie an anderer Stelle beschrieben wurde<sup>11</sup>, können im nichtfraktionierten Schwangerenserum nach einer Zonenelektrophorese in Stärkegel mittels L-Leucin-β-naphthylamid und Fast Garnet Salt GBC zwei Aminopeptidasen angefärbt werden, von denen eine die Oxytocinase ist. Die elektrophoretische Untersuchung der reinsten Enzymlösung zeigte nur mehr eine einzige Aminopeptidasebande, während diese in weniger hoch gereinigten, etwa 3000fach angereicherten Enzymlösungen öfters von einer schwachen, rascher wandern den Bande begleitet war.

Neuerdings ist es gelungen, die Oxytocinasebande nach der Stärkegel-Elektrophorese selektiv mit Cystin-di-β-naphthylamid und Fast Garnet Salt GBC in 50proz. Methylcellosolvelösung anzufärben. Bei Anwendung dieser Methode zeigten auch jene unreineren Enzymlösungen, die nach der Elektrophorese mit Leucin-β-naphthylamid zwei gefärbte Banden ergeben hatten, nur eine einzige, und zwar die langsamere und mit Leucin-β-naphthylamid äußerst intensiv angefärbte Aminopeptidasebande. Dieses Ergebnis spricht dafür, daß die als Verunreinigung vorhandene zweite Aminopeptidase im Gegensatz zur Oxytocinase nur L-Leucin-β-naphthylamid, nicht jedoch L-Cystin-di-β-naphthylamid zu spalten vermag, daß also die Aktivität der Enzymlösung gegenüber Substraten mit N-terminalem Halb cysteinrest allein auf die Oxytocinase zurückgeht.

Unsere besten Oxytocinasepräparate spalten Leucin-β-naphthylamid etwa 11mal rascher als Cystin-di-β-naphthylamid, unreine Präparate jedoch noch rascher. Das Verhältnis der Enzymaktivität gegenüber den beiden Substraten ist stets dann erhöht, wenn die Oxytocinase von anderen, Leucin-β-naphthylamid spaltenden Aminopeptidasen begleitet ist, und kann daher als Maß für die Reinheit von Oxytocinasepräparaten dienen.

Für die Einheitlichkeit der hochgereinigten Oxytocinase spricht auch ein immunologisches Ergebnis: Ein Kaninchen-Antiserum gegen menschliches Schwangerenserum zeigte im Diffusionstest in Agar<sup>14</sup> mit reinster Enzymlösung eine einzige Präzipitinbande.

Es ist bekannt, daß die Oxytocinase in ihrer Wirkung gegenüber Oxytocin durch Komplexon gehemmt wird<sup>15</sup>. Auch der Abbau von Cystin-di-β-naphthylamid wie der von Leucin-β-naphthylamid ist in Gegenwart von Komplexon stark verlangsamt. Die Hemmung durch den Komplexbildner ist eine Zeitreaktion; die gleichmäßige Abnahme der Aktivität gegenüber L-Cystin-di-β-naphthylamid und L-Leucin-β-naphthylamid nach verschieden langer Vorinkubation mit Komplexon kann als weiterer

<sup>14</sup> S. P. Halbert, L. Swick und C. Sonn, J. Exper. Med. **101**, 557 (1955).

<sup>15</sup> E. Werle und K. Semm, Arch. Gynäkol. **187**, 449 (1956).

Hinweis auf die Reinheit der Enzymlösung dienen (Abb. 2). Die Hemmung erwies sich als reversibel; entfernte man den Komplexbildner durch Dialyse, so fand eine etwa 60proz. Reaktivierung der Oxytocinase statt. (Reversible Enzym-inaktivierungen durch Komplexon stehen in der Literatur nicht ohne Beispiel da<sup>16</sup>).

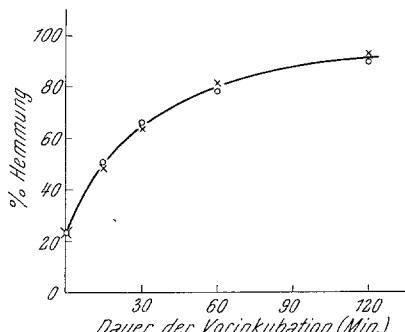


Abb. 2

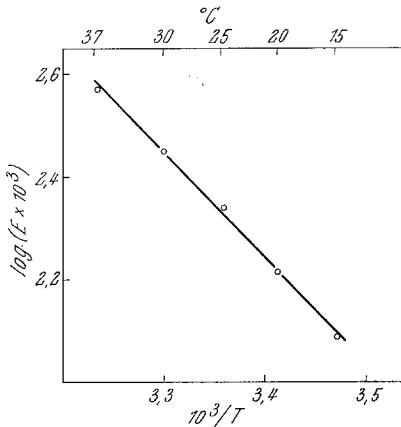


Abb. 3

Abb. 2. Hemmung der Spaltung des L-Cystin-di-β-naphthylamids (O—O) und L-Leucin-β-naphthylamids (X—X) durch gereinigte Oxytocinase nach Vorinkubation mit Komplexon bei 37°

Abb. 3. Temperaturabhängigkeit der Spaltung des L-Cystin-di-β-naphthylamids durch Oxytocinase  $E =$  die nach Inkubation des Enzyms mit Substratüberschuss gemessene Extinktion bei 565 m  $\mu$ . Sie ist der maximalen Geschwindigkeit der Enzymreaktion proportional

Ein Metall, dessen Entfernung durch Komplexon die Inaktivierung des Enzyms zur Folge haben könnte, wurde nicht gefunden. Alle von uns untersuchten zweiwertigen Metalle hemmten die Oxytocinase, nur  $Mg^{++}$  und  $Ca^{++}$  verhielten sich indifferent (Tab. 2). Fügte man

Tabelle 2. Hemmung der gereinigten Oxytocinase durch Metallionen in  $10^{-3}$  m Konzentration

Metall	% Hemmung	Metall	% Hemmung	Metall	% Hemmung
$Cu^{++}$	100	$Ni^{++}$	83	$Mn^{++}$	15
$Zn^{++}$	100	$Co^{++}$	25	$Mg^{++}$	0
$Pb^{++}$	100	$Fe^{++}$	17	$Ca^{++}$	0

die Metalle zu einer nach Komplexoninaktivierung durch Dialyse wieder zum Teil reaktivierten Oxytocinaselösung; so zeigte sich derselbe Effekt: alle Metalle mit Ausnahme von  $Mg^{++}$  und  $Ca^{++}$  hemmten, letztere bewirkten keine weitere Erhöhung der Aktivität. Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen von Werle und Semm<sup>15</sup>, welche durch

<sup>16</sup> S. Granick und D. Mauzerall, J. biol. Chem. **232**, 1119 (1958).

$\text{Co}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$  oder  $\text{Zn}^{++}$  eine Reaktivierung der Oxytocinase nach Inaktivierung durch Komplexon erreichten, nicht überein. Andere Komplexbildner wie Citrat, Oxalat oder Pyrophosphat haben keinen Einfluß auf die Enzymaktivität; diese Tatsache spricht im Verein mit unseren Ergebnissen gegen das Vorhandensein eines für die enzymatische Aktivität essentiellen Metalles in der Oxytocinase.

Jodacetamid und Diisopropylfluorophosphat zeigten in  $10^{-3}$  m Konzentration keine Wirkung auf die Oxytocinaseaktivität.

Die Abhängigkeit der Spaltung des L-Cystin-di- $\beta$ -naphthylamids vom pH, von der Zeit, von der Enzym- und von der Substratkonzentration wurde bereits früher untersucht<sup>8</sup>. Abb. 3 zeigt ergänzend die Abhängigkeit der Substratpaltung von der Temperatur. Aus der Neigung der Geraden ergibt sich ein Wert der Aktivierungsenergie der enzymatischen Reaktion von 9300 cal/Mol.

## Experimenteller Teil

### Bestimmung der Oxytocinaseaktivität

Zur Bestimmung der Aminopeptidaseaktivität der Oxytocinase gegenüber L-Cystin-di- $\beta$ -naphthylamid wurde eine Mischung von 2,0 ml 0,1 m Triäthanolamin-puffer (TRA) (pH 7,4), 0,5 ml einer 12proz. wäßr. Lösung von Gummi arabicum und 0,5 ml der Enzymlösung (bei höherer Anreicherung 0,1 ml Enzylösung und 0,4 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ) hergestellt und 0,75 ml davon mit 0,25 ml der Substratlösung (13,5 mg L-Cystin-di- $\beta$ -naphthylamid/10 ml 0,005 n HCl) 2 Stdn. bei 37° inkubiert. Für die Ermittlung der Aminopeptidaseaktivität gegenüber L-Leucin- $\beta$ -naphthylamid war eine 5- bis 10mal stärkere Verdünnung der Enzylösung erforderlich als oben angegeben wurde. Die Substratlösung enthielt 13,0 mg L-Leucin- $\beta$ -naphthylamid/10 ml 0,005 n HCl. Die kolorimetrische Bestimmung des freigesetzten  $\beta$ -Naphthylamins erfolgte nach dem früher beschriebenen Verfahren<sup>8</sup>.

Zur Ermittlung der Oxytocinaseaktivität in 12,5% Methylcellosolve enthaltender Lösung wurden die oben angegebenen Mengen der Substrate in 5 ml Methylcellosolve gelöst und mit 5 ml Wasser verdünnt. Zur Erreichung höherer Konzentrationen Methylcellosolve wurde das Substrat in 100% des organischen Lösungsmittels gelöst und der Mischung aus Puffer, Gummi arabicum und Enzym an Stelle von Wasser Methylcellosolve zugesetzt.

Bei der Untersuchung des Einflusses von Methylcellosolve auf die Hemmung der Oxytocinase durch L-Cystinyl-di-L-tyrosinamid wurde als Substrat eine Lösung von L-Cystin-di- $\beta$ -naphthylamid in 50proz. Methylcellosolve eingesetzt. Von einer Mischung aus 2,0 ml 0,1 m TRA (pH 7,4), 0,5 ml 12proz. Gummi arabicum, 0,1 ml gereinigter Oxytocinaselösung, 0,15 ml Wasser und 0,25 ml einer wäßrigen Lösung des Hemmstoffes (8 mg Cystinyl-di-tyrosinamid · 2 HBr/ml  $\text{H}_2\text{O}$ ) wurden 0,75 ml mit 0,25 ml der Substratlösung in üblicher Weise inkubiert. Betrug die Hemmung in wäßriger Lösung 70%, so sank sie in 12,5proz. Methylcellosolve auf 40% ab.

Die Proteinkonzentration in den Enzylösungen (mg Protein/ml) wurde durch Ausmessung der Absorption bei 280 m $\mu$  und durch Multiplikation der Extinktionswerte (Beckman-Spektrophotometer, 1 cm Schichtdicke) mit dem Faktor 1,3 ermittelt (Umrechnungsfaktoren für verschiedene Pro-

teine liegen zwischen 0,5 und 1,8<sup>17</sup>). Vor der Ausmessung bei 280 m $\mu$  mußten die Enzymlösungen in der Regel mit Wasser verdünnt werden. Bei der Verdünnung von Serum (1:60) trat oft ein schwache Trübung auf, welche durch Zugabe eines Tropfens 0,1 m NaOH behoben werden konnte.

### Reinigung der Oxytocinase

Als Ausgangsmaterial diente Retroplacentarserum, welches durch Zentrifugieren von Blutkörperchen befreit worden war. Zu 1000 ml Serum wurden 242 g festes Ammonsulfat (puriss.) unter gutem Rühren portionenweise zugegeben (40% Sättigung). Nach 10 Min. Rühren wurde der Niederschlag 1 Stde. bei 1000  $\times$  g und 0° abzentrifugiert und verworfen, die Lösung (1020 ml) mit 124 g Ammonsulfat auf 60% Sättigung gebracht und nach 10 Min. mit 30 g Hyflo-Supercel versetzt. Weitere 30 g Supercel wurden mit 150 ml einer 60% gesättigten Ammonsulfatlösung zu einem Brei angerührt, auf eine Glassinternutsche G 1 gebracht und schwach abgesaugt. Mit Hilfe dieser Filterschicht konnte der Proteinniederschlag unter schwachem Vakuum gut filtriert werden. Das klare Filtrat wurde verworfen, der Filterkuchen in 300 ml Wasser aufgeschlämmt, vom Hyflo-Supercel durch Zentrifugieren befreit und die Kieselgur zweimal in der Zentrifuge mit je 100 ml Wasser gewaschen. Die vereinigten überstehenden Lösungen wurden über Nacht gegen fließendes Leitungswasser und einen Tag lang gegen destill. Wasser dialysiert.

Nach der Dialyse wurde die Lösung mit 200 ml 0,1 m TRA (pH 7,4) versetzt und mit destill. Wasser auf 1000 ml verdünnt. Unter gutem Rühren erfolgte dann ein Zusatz von 200 ml einer 0,5proz. wäßrigen Lösung von Rivanol (2-Äthoxy-6,9-diamino-acridinlactat, Farbwerke Hoechst). Der entstandene Niederschlag wurde 10 Min. bei 1000  $\times$  g abzentrifugiert und verworfen, die Lösung mit weiteren 200 ml Rivanollösung gefällt. Nach kurzem Stehen hatte sich ein öliger Niederschlag abgesetzt, der sich nach Abgießen des Überstandes in 50 ml 0,2 m Phosphatpuffer (pH 6,0) löste. Die Lösung wurde mit 50 ml Wasser verdünnt und zur Entfernung des Rivanols sowie eines Teiles inaktiver Proteine mit 10 g Bentonit USP behandelt. Das Adsorbens wurde bei 2500  $\times$  g abzentrifugiert und die überstehende Lösung ein zweites Mal mit 10 g Bentonit gut gerührt. Zur Entfernung des Bentonits mußte diesmal 20 Min. bei 2500  $\times$  g zentrifugiert werden. Die Lösung (68 ml) wurde mit 0,1 m NaOH auf pH 7,4 gebracht und gegen 0,01 m TRA (pH 7,4) dialysiert.

Für die folgende Chromatographie wurde Hydroxylapatit nach *Tiselius*, *Hjerten* und *Levin*<sup>18</sup> hergestellt, wobei an Stelle des Phosphatpuffers von pH 6,8 ein solcher von pH 7,4 Verwendung fand. Auf eine mit 0,01 m TRA (pH 7,4) gründlich gewaschene Hydroxylapatitsäule 4  $\times$  45 cm konnten 68 ml der Enzymlösung nach der Bentonitbehandlung ohne Überladung der Säule aufgetragen werden. Zum Entwickeln diente ebenfalls 0,01 m TRA (pH 7,4). Die Durchflußgeschwindigkeit wurde auf 20 ml/Stde. gedrosselt und Fraktionen zu 8 ml mittels eines Fraktionssammlers aufgefangen. Die einzelnen Fraktionen wurden durch direkte Ausmessung der Extinktion bei 280 m $\mu$  auf ihren Proteingehalt untersucht. Die ersten drei proteinhaltigen

<sup>17</sup> J. B. Neilands und P. K. Stumpf: „Outlines of Enzym Chemistry“, John Wiley and Sons, Inc. N. Y.

<sup>18</sup> A. Tiselius, S. Hjerten und Ö. Levin, Arch. Biochem. Biophys. 65, 132 (1956).

Fraktionen (24 ml) enthielten 11% der chromatographierten Oxytocinase in reinster Form, 4500fach angereichert (die Extinktion bei 280 m $\mu$  betrug in diesen Fraktionen nur 0,020); es folgten vier bis fünf weitere Fraktionen (36 ml, mit 32% der eingesetzten Aktivität), in welchen das Enzym etwa 3000fach angereichert vorlag. Bei Wiederholung der Chromatographie mit weniger hochgereinigten Fraktionen konnte in manchen Fällen eine weitere Reinigung erzielt werden.

Die bei der Chromatographie erhaltenen Enzymlösungen wurden durch Druckfiltration (Ultrafilter Lsg. 60 der Membranfilter-Gesellschaft Göttingen) unter Stickstoffdruck auf  $\frac{1}{3}$  bis  $\frac{1}{5}$  des ursprünglichen Volumens konzentriert und mit 0,1 m TRA auf pH 7,4 eingestellt.

#### Inaktivierung der Oxytocinase durch Komplexon

43,8 mg Komplexon II (Äthylendiamintetraessigsäure) wurden in 10 ml 0,1 m TRA (pH 7,4) aufgeschlämmt, durch Zusatz von n NaOH bis zu einem pH von 7,4 gelöst und mit Puffer auf 15 ml verdünnt. Zu je 2 ml dieser Lösung wurden 0,5 ml 12proz. Gummi arabicum und bei Verwendung von Cystin-di- $\beta$ -naphthylamid als Substrat 0,05 ml Oxytocinaselösung und 0,45 ml H<sub>2</sub>O, bei Verwendung von Leucin- $\beta$ -naphthylamid als Substrat 0,01 ml Oxytocinaselösung und 0,49 ml H<sub>2</sub>O gefügt. Je 0,75 ml dieser Mischungen wurden bei 37° inkubiert. Nach 0, 15, 30, 60 und 120 Min. wurde die Vorinkubation durch Zugabe von 0,25 ml Substratlösung beendet. Dann wurde 2 Stdn. bei 37° mit dem Substrat inkubiert; die weitere Behandlung entsprach der üblichen Aktivitätsbestimmung. Die Konzentration an Komplexon war während der Vorinkubation  $6,7 \cdot 10^{-3}$  m, während der Inkubation mit dem Substrat  $5 \cdot 10^{-3}$  m. In Abb. 2 ist die Abnahme der Aktivität in Abhängigkeit von der Dauer der Vorinkubation aufgetragen. Ohne Vorinkubation betrug die Aktivität sowohl gegenüber Cystin-di- $\beta$ -naphthylamid als auch gegenüber Leucin- $\beta$ -naphthylamid in Gegenwart von  $5 \cdot 10^{-3}$  m Komplexon 76% der in Abwesenheit des Komplexbildners gemessenen. Für Versuche, die durch Komplexon inaktivierte Oxytocinase durch Dialyse zu reaktivieren, wurden 29,3 mg Komplexon II in wenig n NaOH gelöst, mit 0,1 m TRA auf 9,5 ml verdünnt und auf pH 7,4 eingestellt. Nach Zusatz von 0,5 ml Oxytocinaselösung wurde 2 Stdn. bei 37° inkubiert. Etwa 5 ml der Mischung wurden dann gegen einen mit bidestill. Wasser hergestellten 0,1 m TRA-Puffer (pH 7,4) dialysiert. Für die Aktivitätsbestimmung wurden 2 ml der dialysierten Lösungen mit 0,5 ml 12proz. Gummi arabicum und 0,5 ml H<sub>2</sub>O versetzt, und 0,75 ml davon mit 0,25 ml Cystin-di- $\beta$ -naphthylamidlösung wie üblich inkubiert.

#### Immunisierung eines Kaninchens mit Schwangerenserum und mit gereinigter Oxytocinaselösung

Je 0,5 ml steriles Schwangerenserum wurde 6mal in Abständen von 2 Tagen in die Ohrvene eines Kaninchens injiziert. Nach 10 Tagen wurde diese Prozedur ein zweitesmal, nach abermals 10 Tagen ein drittesmal wiederholt. 6 Tage nach der letzten Injektion erfolgte die Blutabnahme. Das Serum zeigte mit gereinigter Oxytocinaselösung im *Ouchterlony*-Diffusionstest in Agar keine Präcipitinbande. Dasselbe Kaninchen wurde daher mit gereinigter Oxytocinaselösung in folgender Weise nachimmunisiert: 2,0 ml gereinigte Oxytocinaselösung wurden mit der gleichen Menge inkomplettem *Freundschen* Adjuvans emulgiert und 2 ml der Emulsion sub-

cutan, 2 ml intraperitoneal im Abstand von 8 Tagen injiziert. Die Blutabnahme erfolgte 1 Monat nach der ersten Injektion. Dieses Antiserum er gab mit hochgereinigter Oxytocinaselösung eine einzige Präcipitinbande.

Abhängigkeit der Spaltung von L-Cystin-di- $\beta$ -naphthylamid durch Oxytocinase von der  $\text{HCO}_3^-$ -Konzentration

I. Bestimmung der Oxytocinaseaktivität in 90proz. Serum

Hochschwangerenserum wurde auf genau pH 7,4 eingestellt und 3,0 ml mit 0,33 ml einer Cystin-di- $\beta$ -naphthylamidlösung (252  $\gamma$ /ml) bei 37° inkubiert. (Die Konzentration der Substrate wurde so gewählt, daß nach 100proz. Spaltung derselben bei der kolorimetrischen Bestimmung des freigesetzten  $\beta$ -Naphthylamins eine Extinktion von 0,100 gemessen würde.) Nach 0, 30 und 90 Min. wurden je 1,0 ml entnommen, mit 1,0 ml Trichloressigsäure versetzt und zentrifugiert. 1,0 ml der überstehenden Lösung diente zur kolorimetrischen Bestimmung des  $\beta$ -Naphthylamins.

Versuche mit Leucin- $\beta$ -naphthylamid wurden in gleicher Weise durchgeführt; die Konzentration der Substratlösung betrug 131  $\gamma$ /ml. Von diesem Substrat wurden in 90 Min. nur 2% der erwarteten Menge  $\beta$ -Naphthylamin abgespalten.

II. Einfluß zusätzlichen Bicarbonats auf die Aktivitätsbestimmung in 90proz. Serum

6,0 ml Hochschwangerenserum wurden mit 27 mg  $\text{NaHCO}_3$  versetzt und auf pH 7,4 gebracht. 3,0 ml wurden sodann mit 0,33 ml Cystin-di- $\beta$ -naphthylamidlösung bei 37° inkubiert. Nach 0, 30 und 90 Min. wurde je 1,0 ml entnommen und auf oben angegebene Weise weiterbehandelt.

III. Bestimmung der Oxytocinaseaktivität in 90proz. Serum nach teilweiser Entfernung der Kohlensäure durch Evakuieren

Hochschwangerenserum wurde auf pH 6,0 gebracht, durch längeres Anlegen eines Vakuums entgast und wieder auf pH 7,4 eingestellt. 3,0 ml wurden sodann mit 0,33 ml Cystin-di- $\beta$ -naphthylamidlösung bei 37° inkubiert. Nach 0, 30 und 90 Min. wurde je 1,0 ml entnommen und in oben angegebener Weise weiterbehandelt. Das Ergebnis der Versuche I, II und III ist aus Abb. 1 zu ersehen.

Der Rockefeller-Foundation danken wir für Unterstützung, die dieser Arbeit zugute gekommen ist.

Herren Dr. W. Müller-Hartburg, II. Universitäts-Frauenklinik Wien, sind wir für Schwangeren- und Retroplacentarseren, Herrn Dr. O. Förster, Institut für Allgemeine und Experimentelle Pathologie der Universität Wien, für die Herstellung eines Antiserums, Frau Astrid Menz für wertvolle Hilfe zu Dank verpflichtet.