

Über ein kompetitives Substrat der Oxytocinase

(Kurze Mitteilung)

Von

E. Wintersberger, H. Tuppy und E. Stoklaska

Aus dem Institut für Biochemie und dem Institut für allgemeine und experimentelle Pathologie der Universität Wien

(Eingegangen am 4. Mai 1960)

L-Cystinyl-di-L-tyrosinamid, ein strukturell dem Oxytocin verwandtes, synthetisch erhaltenes Peptid, ist imstande, die oxytocin-inaktivierende Wirkung der im Blutserum schwangerer Frauen vorkommenden Oxytocinase zu hemmen. Da das Cystinyl-di-tyrosinamid selbst durch die Oxytocinase gespalten wird, ist seine Wirkung die eines kompetitiven Substrats.

Ergebnissen früherer Arbeiten¹⁻³ zufolge ist die im Blutserum schwangerer Frauen vorkommende Oxytocinase als ein proteolytisches Ferment mit der Spezifität einer Aminopeptidase anzusprechen. Dieses Enzym, das neuerdings weitgehend gereinigt worden ist⁴, baut die Hypophysenhinterlappenhormone Oxytocin und Vasopressin sowie das synthetisch hergestellte Substrat L-Cystin-di- β -naphthylamid ab, hydrolysiert also — im Gegensatz zu anderen Aminopeptidasen — Cystinylpeptide.

Im folgenden wird über ein weiteres Substrat der Oxytocinase, L-Cystinyl-di-L-tyrosinamid, berichtet. Dieses ist dem Oxytocin insofern strukturell ähnlich, als es dessen N-terminale Dipeptidgruppierung enthält. Ein solches Peptid sollte imstande sein, sowohl den Abbau des Oxytocins als auch die Spaltung von L-Cystin-di- β -naphthylamid durch

¹ H. Tuppy und H. Nesvadba, Mh. Chem. **88**, 977 (1957).

² W. Müller-Hartburg, H. Nesvadba und H. Tuppy, Arch. Gynäkol. **191**, 442 (1959).

³ E. Stoklaska und E. Wintersberger, Arch. exper. Path. Pharmacol. **236**, 358 (1959).

⁴ H. Tuppy und E. Wintersberger, Mh. Chem. **91**, in Vorber. (1960).

Oxytocinase kompetitiv zu hemmen. Dies wäre ein zusätzliches Argument für die Identität des Oxytocin inaktivierenden Enzyms mit der L-Cystin-di- β -naphthylamid spaltenden Aminopeptidase des Schwangerenserums. Darüber hinaus könnte einer Substanz, die es ermöglicht, den Oxytocinabbau zu hemmen, klinische Bedeutung zukommen.

Methodik

1. Synthese des L-Cystinyl-di-L-tyrosinamids

Die Peptidsynthese erfolgte aus Di-Carbobenzoxyl-L-cystin und L-Tyrosinamid mittels N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid⁵. Die Decarbobenzoxylie- rung wurde nach Ben-Ishai und Berger⁶ mit HBr/Eisessig durchgeführt.

a) Dicarbobenzoxyl-L-cystinyl-di-L-tyrosinamid

1,0 g Di-carbobenzoxyl-L-cystin und 0,72 g L-Tyrosinamid wurden in 8 ml absol. Tetrahydrofuran (THF) gelöst und eine Lösung von 0,9 g N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid in 2 ml THF unter gutem Umschütteln zugetropft. Unter Selbsterwärmung schied sich ein gallertiger Niederschlag ab. Nach Stehen über Nacht und Zusatz von 20 ml Essigsäureäthylester wurde das Reaktionsprodukt abgesaugt. Die Trennung des Di-carbobenzoxyl-L-cystinyl-di-L-tyrosinamids vom Dicyclohexylharnstoff erfolgte durch Umkristallisieren aus siedendem Äthanol. Beim Abkühlen schied sich das Peptid ab, während der Harnstoff in Lösung blieb. Das abgesaugte Produkt wurde getrocknet. Ausb.: 1,0 g (60% d. Th.), Schmp. 226—228°.

$C_{40}H_{44}N_6O_{10}S_2$. Ber. C 57,68, H 5,32. Gef. C 57,58, H 5,60.

b) L-Cystinyl-di-L-tyrosinamid

1,0 g der fein gepulverten Carbobenzoxylverbindung wurde mit 10 ml HBr/Eisessig (38%) 1 Stde. bei Zimmertemp. stehen gelassen. Während dieser Zeit trat klare Lösung ein. Das Hydrobromid wurde dann mit 75 ml absol. Äther ausgefällt, abgesaugt, mit Äther gewaschen und getrocknet. Anfänglich löste sich dieses Produkt gut in kaltem absol. Methanol und konnte aus dieser Lösung mit Äther in äußerst hygroskopischer Form wieder ausgefällt werden. Bei längerem Stehen in absol. methanol. Lösung fiel ein Großteil des Amids aus und konnte dann auch bei Siedehitze nicht mehr gelöst werden. Eine Reinigung gelang in diesem Fall durch Auskochen mit Methanol. Ausb.: 0,75 g (86% d. Th.), Schmp. 259 bis 261° (Zers.). Für die Analyse wurde 5 Stdn. bei 100° getrocknet.

$C_{24}H_{34}O_6Br_2N_6S_2$. Ber. N 11,13, Br 22,00. Gef. N 11,26, Br 21,68.

2. Nachweis des Abbaues von L-Cystinyl-di-L-tyrosinamid durch Oxytocinase

0,5 mg Peptidamid wurden in 15 μ l 0,1 m Triäthanolamin-puffer (pH 7,4) gelöst und 3 Stdn. mit 50 μ l einer gereinigten Oxytocinaselösung⁴ bei 37° inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 2 μ l Essigsäure beendet, die Lösung auf einem Polythlenstreifen zur Trockene gebracht, die Spaltprodukte in Wasser gelöst und auf Schleicher & Schüll-Papier Nr. 2043 a mit Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) chromatographiert.

⁵ J. C. Sheehan und G. P. Hess, J. Amer. Chem. Soc. **77**, 1067 (1955).

⁶ D. Ben-Ishai und A. Berger, J. Org. Chem. **17**, 1564 (1952).

3. Hemmung der Spaltung von L-Cystin-di- β -naphthylamid durch L-Cystinyl-di-L-tyrosinamid

Die proteolytische Aktivität eines Schwangerenserums gegenüber L-Cystin-di- β -naphthylamid wurde in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von L-Cystinyl-di-tyrosinamid durch kolorimetrische Bestimmung des bei der Spaltung freigesetzten β -Naphthylamins ermittelt¹. Die Konzentration des L-Cystin-di- β -naphthylamids im Inkubationsgemisch war stets $0,46 \cdot 10^{-3}$ m.

4. Hemmung der Oxytocin-inaktivierung durch L-Cystinyl-di-L-tyrosinamid

Je 0,5 ml Schwangerenserum wurden mit einer Mischung von 2,0 ml 0,9proz. NaCl, 0,5 ml Phosphatpuffer (m/5, pH 7,4), 1,0 ml Oxytocinlösung (0,5 I. E.)* und 1,0 ml verschiedenen konzentrierter Lösungen von L-Cystinyl-di-L-tyrosinamid in 0,9proz. NaCl 50 Min. bei 37° inkubiert (1,0 ml des Inkubationsgemisches enthielt demnach zu Beginn der Enzymreaktion 0,1 I. E. Oxytocin). Die Beendigung der Enzymreaktion erfolgte durch Zusatz von 0,05 ml 2 n Essigsäure und 5 Min. langes Erhitzen im kochenden Wasserbad. Nach dem Neutralisieren und Abzentrifugieren des Proteinniederschlages wurden die verbliebenen Oxytocin-aktivitäten biologisch nach der Methode von *Holton*⁷ an Uteri von Ratten im Proöstrus und Östrus (*Schneider* und *Stumpf*⁸) bestimmt.

5. Ferner wurde in Vorversuchen geprüft, ob

a) dem L-Cystinyl-di-L-tyrosinamid selbst eine oxytocische Wirkung zukommt,

b) L-Cystinyl-di-L-tyrosinamid die durch Oxytocin ausgelösten Kontraktionen des Uterus in irgendeiner Weise beeinflusst.

Diese Versuche wurden in der von *Magnus* für die Untersuchung isolierter Organe angegebenen Apparatur in der üblichen Weise vorgenommen.

Ergebnisse

1. Wie die papierchromatographischen Befunde zeigen, wird L-Cystinyl-di-L-tyrosinamid durch die Oxytocinase des Schwangerenserums in Cystin und Tyrosin bzw. Tyrosinamid gespalten und stellt demnach ein Substrat für dieses Enzym dar.

2. L-Cystinyl-di-L-tyrosinamid bewirkte auch in einer Konzentration von 0,003 mg/ml Badeflüssigkeit keine Kontraktionen eines Rattenuterus. Der gleiche Uterus zeigte bei einer Oxytocinkonzentration von 0,0002 I. E./ml deutliche Kontraktionen. Diese wurden weder durch eine vorherige noch eine gleichzeitige Zugabe von Cystinyl-di-tyrosinamid in die Badeflüssigkeit in ihrer Intensität beeinflusst. Cystinyl-di-tyrosinamid besitzt demnach weder eine oxytocische Wirksamkeit, noch

* „Orasthin“ (10 I. E./ml) wurde mit 0,9proz. NaCl auf das 20fache verdünnt.

⁷ *P. Holton*, Brit. J. Pharmacol. **3**, 328 (1948).

⁸ *W. Schneider* und *C. Stumpf*, Arch. internat. Pharmacodyn. **94**, 406 (1953).

kommt ihm eine Hemmwirkung auf die durch Oxytocin ausgelösten Uteruskontraktionen zu.

3. L-Cystinyl-di-L-tyrosinamid setzt die Wirksamkeit der Oxytocinase sowohl gegenüber L-Cystin-di- β -naphthylamid als auch gegenüber Oxytocin herab. Tab. 1 zeigt die Verminderung der Oxytocinaseaktivität gegenüber dem Naphthylamid und Tab. 2 gegenüber Oxytocin bei Zusatz steigender Mengen von L-Cystinyl-di-L-tyrosinamid.

Tabelle 1. Kompetitive Hemmung der enzymatischen Spaltung von L-Cystin-di- β -naphthylamid

Verhältnis der molaren Konzentrationen von L-Cystinyl-di-L-tyrosinamid und L-Cystin-di- β -naphthylamid im Reaktionsansatz	Freigesetztes β -Naphthylamin (in mg/100 ml Schwangerenserum/Stde.)	% Aktivität (bezogen auf die in Abwesenheit von L-Cystinyl-di-L-tyrosinamid ermittelte Aktivität)
0	1,69	100
0,25	1,48	88
1	0,90	53
2,5	0,32	19

Tabelle 2. Kompetitive Hemmung der enzymatischen Inaktivierung des Oxytocins

Verhältnis der molaren Konzentrationen von L-Cystinyl-di-L-tyrosinamid und Oxytocin im Reaktionsansatz	Nicht inaktiviertes Oxytocin (in I. E./ml)*	Abgebautes Oxytocin (in %)
0	0,01	90
1	0,02	80
10	0,03	70
100	0,08	20
1000	0,10	0

* Die Oxytocin-Aktivität des Inkubationsansatzes betrug zu Beginn der Inkubation 0,1 I. E./ml.

Die mit L-Cystin-di- β -naphthylamid als Substrat ermittelte Oxytocinaseaktivität des verwendeten Schwangerenserums (angegeben in mg freigesetztem β -Naphthylamins/100 ml Serum/Stde.) betrug ohne Zusatz von Cystinyl-di-tyrosinamid 1,69. Nach Zugabe von Cystinyl-di-tyrosinamid war die Freisetzung von β -Naphthylamin stark reduziert: so betrug sie in Anwesenheit äquimolarer Mengen von Cystin-di- β -naphthylamid und Cystinyl-di-tyrosinamid nur mehr 0,9, d. i. 53% (Tab. 1).

Ähnlich liegen die Verhältnisse bezüglich der Inaktivierung des Oxytocins. Auch diese wird durch Zusatz von Cystinyl-di-tyrosinamid zum Inkubationsgemisch gehemmt, doch muß man einen größeren Überschuß von Cystinyl-di-tyrosinamid anwenden, um die Oxytocinaseeinwirkung auf Oxytocin in dem gleichen Ausmaß wie gegenüber L-Cystin-

di- β -naphthylamid zu hemmen. In Abwesenheit von Cystin-di-tyrosinamid wurden unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen 90% des eingesetzten Oxytocins abgebaut, in Anwesenheit äquimolarer Mengen von Oxytocin und kompetitivem Substrat noch 80%. Erst ein 100fach molarer Überschuß von Cystinyl-di-tyrosinamid reduzierte den Oxytocinabbau auf 20% und ein 1000facher Überschuß brachte ihn praktisch zum Stillstand (Tab. 2).

Diskussion

Der Befund, daß L-Cystinyl-di-L-tyrosinamid, ein dem aminoterminalen Teil der Aminosäuresequenz des Oxytocins nachgebildetes Peptid, von der Oxytocinase gespalten wird und als kompetitives Substrat die Einwirkung dieses Enzyms sowohl auf L-Cystin-di- β -naphthylamid als auch auf Oxytocin zu hemmen imstande ist, ist als weiteres Argument für unsere Ansicht zu werten, daß die im Blutserum schwangerer Frauen vorkommende Oxytocinase die Spezifität einer Aminopeptidase hat. In einer vor kurzem erschienenen Arbeit berichten *Beránková*, *Rychlík* und *Šorm*⁹, daß auch einige peptidische Fragmente des Oxytocins, vor allem Cystinylbis-(prolyl-leucyl-glycinamid), den Abbau des Oxytocins durch Schwangerserum hemmen. Diese Ergebnisse lassen sich ebenso wie die unseren durch einen kompetitiven Einfluß der Peptide auf die Oxytocin inaktivierende Aminopeptidase des Serums deuten.

Das Ergebnis, daß die Oxytocin-inaktivierung im Schwangerserum mit Hilfe einer relativ einfachen, leicht herstellbaren und gut wasserlöslichen Verbindung gehemmt werden kann, ist auch von medizinischem Interesse. Welche Bedeutung der Oxytocinasehemmung für die Geburtshilfe zukommt, ist Gegenstand klinischer Untersuchungen¹⁰.

Der Rockefeller Foundation wird für die uns gewährte Unterstützung, die dieser Arbeit zugute gekommen ist, aufrichtig gedankt.

⁹ *Z. Beránková, I. Rychlík und F. Šorm*, Exper. [Basel] **15**, 298 (1959).

¹⁰ *W. Müller-Hartburg*, persönliche Mitt.

Erratum

In der Arbeit von *Prey*, *Kerres* und *Berbalk* wird (Mh. Chem. **91**, 325) beim Übergang von VI in VII Amin abgespalten, nicht, wie man nach der gewählten Formulierung meinen könnte, Amin hinzugefügt.