

Reinigung und Eigenschaften einer Aminopeptidase der menschlichen Erythrocyten

Von

E. Wintersberger und K. P. Chatterjee

Aus dem Institut für Biochemie der Universität Wien

Mit 2 Abbildungen

(Eingegangen am 27. August 1962)

Eine Aminopeptidase, die das synthetische Substrat L-Cystin-di- β -naphthylamid spaltet, wurde aus Lysaten menschlicher Erythrocyten durch Adsorption an Aluminiumhydroxyd C γ und anschließende Chromatographie des Eluats auf DEAE-Cellulose etwa 250fach angereichert. Das Enzym ist — im Gegensatz zur L-Cystin-di- β -naphthylamid spaltenden Aminopeptidase des Schwangerenserums — nicht imstande, Oxytocin zu inaktivieren. Eigenschaften und Spezifität der Aminopeptidase werden beschrieben.

Im Jahre 1946 fand *Page*¹, daß Lysate menschlicher Erythrocyten — ebenso wie Seren schwangerer Frauen — imstande sind, das wehen-erregende Hormon des Hypophysenhinterlappens, Oxytocin, zu inaktivieren. Im Gegensatz zum oxytocin-spaltenden Prinzip des Serums tritt das der Erythrocyten jedoch nicht nur während einer Schwangerschaft auf, sondern findet sich in gleichem Maße in Erythrocyten von schwangeren und nichtschwangeren Frauen, wie auch in solchen von Männern. Der durch Schwangerenserum hervorgerufene Oxytocinabbau wird durch Komplexon gehemmt, auf die Inaktivierung des Hormons durch Erythrocytenlysate hingegen hat der Komplexbildner keinen Einfluß^{2,3}. Die oxytocin-spaltende Fähigkeit des Schwangerenserums geht — Arbeiten

¹ *E. W. Page*, Amer. J. Obstet. Gynecol. **52**, 1014 (1946); Science [N. Y.] **105**, 292 (1947).

² *E. Werle, K. Semm und R. Enzenbach*, Arch. Gynäkol. **177**, 211 (1950).

³ *E. Werle und K. Semm*, Arch. Gynäkol. **187**, 449 (1956).

von *Tuppy* und Mitarbeitern⁴⁻⁶ zufolge — auf eine Aminopeptidase zurück, die imstande ist, Substrate mit N-terminalem Halbcystinrest, wie Oxytocin, Vasopressin oder L-Cystin-di- β -naphthylamid, an der dem Halbcystinrest folgenden Peptidbindung zu hydrolysieren.

Peptidasen aus Erythrocyten wurden von *Smith* und Mitarbeitern näher untersucht⁷. Genannte Autoren reinigten Prolidase und Tripeptidase aus Pferdeerythrocyten⁸. Eine Tripeptidase aus menschlichen Erythrocyten wurde von *Tsuboi* und Mitarbeitern angereichert⁹. Eigene Untersuchungen zeigten, daß Lysate menschlicher Erythrocyten eine beträchtliche Aminopeptidaseaktivität aufweisen und daß sie — so wie Seren schwangerer Frauen — imstande sind, das Aminopeptidasesubstrat L-Cystin-di- β -naphthylamid zu hydrolysieren^{5,10}. Es erschien daher von Interesse zu untersuchen, ob die Cystin-di- β -naphthylamid spaltende Aminopeptidase der Erythrocyten für deren oxytocin-spaltende Fähigkeit verantwortlich ist. Dies würde nämlich bedeuten, daß der Mechanismus der Oxytocinaktivierung durch Schwangerenserum und durch Erythrocytenlysate der gleiche ist.

Experimenteller Teil

Material

Als Ausgangsmaterial zur Gewinnung der Erythrocyten dienten abgelaufene Blutkonserven der Blutersatzstelle des Wiener Allgemeinen Krankenhauses. Die Erythrocyten wurden durch Zentrifugieren bei $1200 \times g$ vom Plasma getrennt und 4mal mit isotonischer Kochsalzlösung gewaschen.

Aluminiumhydroxyd Cy wurde nach *Willstätter* und *Kraut*¹¹ hergestellt. Die Suspension wurde bei $1200 \times g$ zentrifugiert und der gelartige Niederschlag als Adsorbens eingesetzt.

Methoden

Bestimmung der Aminopeptidaseaktivität: Während der Reinigung wurde die Anreicherung des Enzyms auf früher beschriebene Weise mit dem Aminopeptidasesubstrat L-Cystin-di- β -naphthylamid verfolgt^{4,6}. Zu 2,0 ml 0,1 m-

⁴ *H. Tuppy* und *H. Nesvadba*, Mh. Chem. **88**, 977 (1957); *E. Stoklaska* und *E. Wintersberger*, Arch. exper. Pathol. Pharmacol. **236**, 358 (1959).

⁵ *W. Müller-Hartburg*, *H. Nesvadba* und *H. Tuppy*, Arch. Gynäkol. **191**, 442 (1959).

⁶ *H. Tuppy* und *E. Wintersberger*, Mh. Chem. **91**, 1001 (1960).

⁷ *E. Adams*, *M. McFadden* und *E. L. Smith*, J. Biol. Chem. **198**, 663 (1952).

⁸ *E. Adams* und *E. L. Smith*, J. Biol. Chem. **198**, 671; **199**, 845 (1952).

⁹ *K. K. Tsuboi*, *L. J. Penefsky* und *P. B. Hudson*, Arch. Biochem. Biophysics **68**, 54 (1957).

¹⁰ *E. Wintersberger* und *H. Tuppy*, Mh. Chem. **91**, 406 (1960).

¹¹ *R. Willstätter* und *H. Kraut*, Ber. dtsh. chem. Ges. **56**, 1117 (1923); *M. Dixon* und *E. C. Webb*, „Enzymes“, Longmans, Green & Co. Ltd., 1958, S. 51.

Triäthanolamin-Puffer (*TRA*) pH 7,6 wurden 0,5 ml einer 12proz. wäßrigen Lösung von Gummi arabicum* und 0,5 ml Enzymlösung (von höher angereicherten Enzymlösungen 0,2 ml und 0,3 ml H₂O) gefügt. 0,75 ml dieser Mischung wurden dann mit 0,25 ml einer Lösung von L-Cystin-di- β -naphthylamid ($2,8 \cdot 10^{-3}$ m in $5 \cdot 10^{-3}$ m HCl) versetzt und 2 Std. bei 37° inkubiert. Die weitere Behandlung entsprach dem von *Tuppy* und *Nesvadba*⁴ beschriebenen Verfahren; das durch das Ferment freigesetzte β -Naphthylamin wurde auf kolorimetrischem Wege quantitativ bestimmt und seine Konzentration an einer Eichkurve abgelesen.

Die Proteinkonzentration der Enzymlösungen (mg Protein/ml) wurde durch Ausmessen der Absorption bei 280 m μ (Beckman Spektrophotometer, 1 cm Schichtdicke) ermittelt. Vor der Messung mußte im allgemeinen 30- bis 60fach verdünnt werden. Zur Umrechnung der Extinktion auf mg Protein/ml wurden die Meßwerte mit dem Faktor 0,54 multipliziert. Dieser Faktor läßt sich aus dem molaren Extinktionskoeffizienten von menschlichem Hämoglobin¹² berechnen. Da selbst die angereicherte Enzymlösung noch mit etwas Hämoglobin verunreinigt war, wurde der Faktor auch für diese Lösung verwendet.

Reinigung der Amino-peptidase: Gewaschene Erythrocyten wurden mit dem gleichen Volumen dest. H₂O hämolysiert und gegen 0,01 m *TRA* pH 7,6 dialysiert. 500 ml dialysiertes Lysat wurden mit 75 g Aluminiumhydroxyd Cy 15 Min. lang gut gerührt und sodann bei 1200 \times g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde mit 0,01 m *TRA* pH 7,6 so lange gewaschen, bis die überstehende Lösung nur mehr schwach gelb gefärbt war. Das am Aluminiumhydroxyd adsorbierte Enzym wurde 2mal mit je 75 ml 0,1 m Phosphatpuffer pH 7,4 eluiert und die vereinigten Eluate gegen 0,01 m *TRA* pH 7,6 dialysiert.

Für die folgende Chromatographie wurde eine Säule 2 \times 40 cm aus Diäthylaminoäthyl-(DEAE-)Cellulose hergestellt. Das Chromatographierohr war von einem Kühlmantel umgeben, durch den während der Chromatographie Leitungswasser (10°) durchgeschickt wurde. Der Ionenaustauscher wurde mit 0,01 m *TRA* pH 7,9 ins Gleichgewicht gebracht, dann konnten 20 ml der dialysierten und mit n NaOH auf pH 7,9 gebrachten Enzymlösung aufgetragen werden. Es wurde mit 50 ml 0,01 m *TRA* pH 7,9 nachgewaschen und sodann mit demselben Puffer, der zusätzlich NaCl enthielt, eluiert. Die NaCl-Konzentration war zunächst 0,05 m und wurde, nachdem etwa 750 ml Elutionspuffer die Säule passiert hatten, auf 0,2 m erhöht. Mit Hilfe eines Fraktionssammlers wurden Fraktionen zu 10 ml bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 1 ml/Min. aufgefangen. Die Proteinkonzentration der Fraktionen wurde durch direkte Ausmessung der optischen Dichte bei 280 m μ ermittelt. Die amino-peptidase-hältigen Fraktionen wurden mittels eines Schnelltestes auf folgende Weise gefunden: Zu Mischungen von je 5 Tropfen 0,1 m *TRA* pH 7,6 und 2 Tropfen 12proz. Gummi arabicum wurden 2 Tropfen der einzelnen Fraktionen und 2 Tropfen der L-Cystin-di- β -naphthylamid-Lösung gefügt und 1 Stde. bei 37° inkubiert. Sodann wurden 2 bis 3 Tropfen einer etwa 0,5proz. wäßrigen Lösung des Diazoniumsalzes Fast Garnet Salt GBC zugesetzt. Fraktionen mit Amino-peptidaseaktivität färbten sich bei diesem Test intensiv rot. Solche Fraktionen wurden vereinigt und gegen 0,01 m *TRA*

* Gummi arabicum[™] wurde zugesetzt, um das Substrat in Ansätzen mit niedriger Proteinkonzentration besser in Lösung zu halten (6).

¹² A. E. Sidwell, R. H. Munch, E. S. G. Brown und T. R. Hogness, J. Biol. Chem. **123**, 335 (1938).

pH 7,6 dialysiert. Zur Konzentrierung wurde die Lösung zuletzt im Dialysier-schlauch einem Luftstrom ausgesetzt und auf diese Weise auf etwa ein Fünftel ihres ursprünglichen Volumens eingengt. Das pH der Amino-peptidaselösung wurde von Zeit zu Zeit kontrolliert und auf 7,6 nachgestellt.

Elektrophorese in Stärkegel: Stärkegelelektrophoresen wurden in 0,025 m Boratpuffer pH 8,7 bei einem Spannungsgefälle von 3 V/cm ausgeführt. Die Dauer der Elektrophoresen betrug 14 bis 16 Stdn. Die Lokalisierung der Amino-peptidasen auf dem Gelstreifen erfolgte im wesentlichen auf beschriebene Weise¹⁰ mit den β -Naphthylamiden des L-Leucins, L-Norleucins oder L-Alanins und dem Diazoniumsalz Fast Garnet Salt GBC. Im Gegensatz zur früher verwendeten Methode wurde der Gelstreifen jedoch in der gepufferten Substratlösung ohne Diazoniumsalz bei 37° inkubiert. Erst nach 60 Min. wurde Fast Garnet zugesetzt und weitere 20 Min. bei 37° belassen. Diese Abänderung war notwendig, da die Amino-peptidasen der Erythrocyten bei Inkubation in Gegenwart des Diazoniumsalzes rasch inaktiviert werden.

Spezifität der Amino-peptidase: Die Spezifität der Amino-peptidase gegenüber Aminosäure- β -naphthylamiden wurde, wie oben für L-Cystin-di- β -naphthylamid beschrieben, ermittelt. Die Substratlösungen waren $5 \cdot 10^{-3}$ m in $5 \cdot 10^{-3}$ m HCl.

Die Aktivität der Amino-peptidase gegenüber den p-Nitroaniliden des L-Leucins, L-Alanins und L-Cystins wurde — wie an anderer Stelle genau beschrieben¹³ — direkt im Beckman DU Spektrophotometer bei 40° bestimmt. 0,1 ml Substratlösung ($5 \cdot 10^{-3}$ m in $5 \cdot 10^{-3}$ m HCl) wurde zu 2,8 ml 0,1 m TRA pH 7,6 pipettiert und in der Küvette vorgewärmt. Sodann wurde 0,1 ml Enzymlösung zugefügt und die Zunahme der Extinktion bei 400 m μ während 60 Min. in 10 Min. Abständen gemessen. Zur Korrektur wurde die bei diesem pH äußerst geringe nicht enzymatische Hydrolyse der Substrate in Ansätzen ohne Enzym ermittelt. Aus einer Eichkurve konnte die Menge des in einer Stunde freigesetzten p-Nitroanilins abgelesen werden.

Die Spaltung von Dipeptiden wurde auf folgende Weise papierchromatographisch untersucht: 1 mg des Peptids wurde in 0,3 ml 0,05 m TRA pH 7,6 gelöst und 15 μ l dieser Lösung mit 50 μ l Amino-peptidaselösung 4 Stdn. bei 37° inkubiert. Die Mischung wurde nach der Inkubation im Exsiccator zur Trockene gebracht, in etwa 3 μ l Wasser gelöst und auf Schleicher & Schüll 2043a Chromatographiepapier im Butanol—Eisessig—Wasser (4:1:5)-System absteigend chromatographiert. Zur Kontrolle wurden weitere 15 μ l der Peptidlösungen ohne Enzym der gleichen Behandlung unterworfen.

Zur Prüfung der oxytocin-spaltenden Fähigkeit von Enzymlösungen verschiedenen Reinheitsgrades wurden 0,1 bis 0,5 ml der jeweiligen Fraktionen (die Menge wurde nach dem Grad der Anreicherung so gewählt, daß sie 0,5 ml Erythrocytenlysate oder 2 mE Amino-peptidase entsprach) mit 2,0 ml 0,2 m Phosphatpuffer pH 7,4 und 1,0 ml Oxytocin (0,5 IE Syntocinon) versetzt, mit Wasser auf 5 ml verdünnt und 60 Min. bei 37° inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch 5 Min. langes Erhitzen im kochenden Wasserbad unterbrochen und die restliche Oxytocinaktivität der Inkubationsmischungen auf biologischem Wege am isolierten Rattenuterus gemessen¹⁴.

¹³ H. Tuppy, U. Wiesbauer und E. Wintersberger, Z. Physiol. Chem., im Druck.

¹⁴ P. Holton, Brit. J. Pharmacol. 3, 328 (1948).

Ergebnisse und Diskussion

Durch Adsorption an Aluminiumhydroxyd $C\gamma$, gefolgt von einer Chromatographie des Eluats auf DEAE-Cellulose, konnte die Cystin-di- β -naphthylamid-spaltende Aminopeptidase der Erythrocyten etwa 250fach angereichert werden. In Tab. 1 sind die Reinigungsschritte mit Angabe

Tabelle 1. Reinigung der Erythrocyten-Aminopeptidase

Reinigungsstufe	Volumen (ml)	mg Protein/ml	Spezifische Aktivität (mE/mg*)	Anreicherung	Ausb. %
Lysat menschlicher Erythrocyten (dialysiert)	500	122	0,041	(1)	(100)
Nach Adsorption an Aluminiumhydroxyd $C\gamma$ und Elution mit Phosphatpuffer	155	7,2	2,26	55	100
Nach Chromatographie auf DEAE-Cellulose..	54	1,9	10,5	256	43

* Als eine Aminopeptidaseeinheit (E) wird in dieser Arbeit jene Enzymmenge bezeichnet, die bei pH 7,4 und 37° pro Min. die Abspaltung von 1 μ Mol β -Naphthylamin aus im Überschuß vorliegendem L-Cystin-di- β -naphthylamid katalysiert.

der Anreicherung und der Ausbeute zusammengefaßt. Das Eluat vom Aluminiumhydroxyd kann ohne Verlust an Enzymaktivität eingeforen werden und ist bei -20° mehrere Monate stabil. Nach der Chromatographie (Abb. 1) tritt schon während weniger Wochen eine bemerkens-

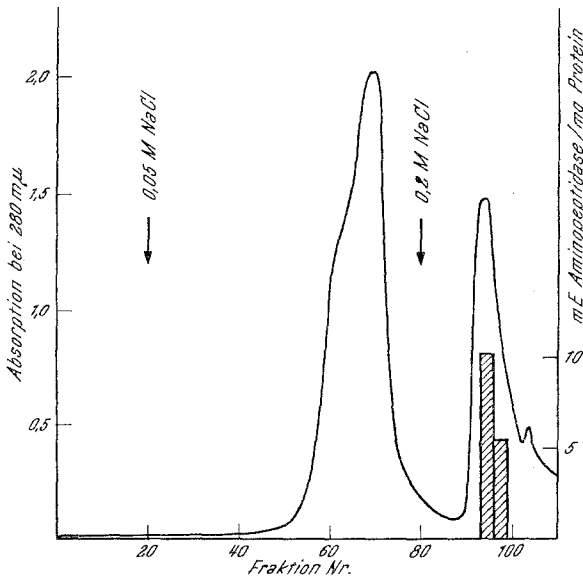


Abb. 1. Chromatographie einer aus Erythrocytenlysat durch Adsorption an Aluminiumhydroxyd $C\gamma$ und Elution mit Phosphatpuffer gewonnenen Enzymlösung auf DEAE-Cellulose in 0,01 M TRIS pH 7,9. Elution mit NaCl-hältigem Puffer

werte Abnahme der enzymatischen Aktivität ein. Das Ferment zeigt seine größte Stabilität im neutralen pH-Bereich. Unter pH 5 und über pH 9 wird es rasch denaturiert. Diisopropylfluorphosphat und Jodacetamid haben keinen Einfluß auf die Enzymaktivität.

Das pH-Optimum der Enzymreaktion liegt — für L-Cystin-di- β -naphthylamid als Substrat — bei 7,6.

Wird das Eluat vom Aluminiumhydroxyd durch Stärkegelelektrophorese bei pH 8,7 aufgetrennt, so können mit L-Leucin- β -naphthylamid und dem Diazoniumsalz Fast Garnet Salt GBC zwei Amino-peptidase-banden am Gelstreifen angefärbt werden. Beide Banden sind ihrer Lage nach von den zwei Banden des Schwangerenserums verschieden (Abb. 2). Lage und Intensität der Banden erfahren während einer Schwangerschaft keine Änderung. Nach der Chromatographie auf DEAE-Cellulose wurde nur mehr eine, und zwar die langsamere, der beiden Banden gefunden. Diese Bande ließ sich auch mit L-Alanin- oder L-Norleucin- β -naphthylamid gut anfärben. Mittels dieser Methode konnte demnach in der chroma-

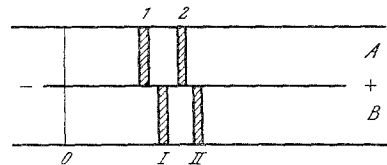


Abb. 2. Vergleichende Stärkegelelektrophorese von Schwangerenserum (A) und einer aus dem Lysat von Erythrocyten durch Adsorption an Aluminiumhydroxyd C und Elution mit Phosphatpuffer gewonnenen Enzymlösung (B). Bande I stellt die Serumoxycocinase dar (10), Bande II die -Cystin-di- β -naphthylamid spaltende Amino-peptidase der Erythrocyten. Bande II ist nach der Chromatographie auf DEAE-Cellulose nicht mehr vorhanden

tographierten Enzymlösung nur mehr eine einzige Amino-peptidase nachgewiesen werden. Eine Anfärbung des Enzyms mit L-Cystin-di- β -naphthylamid gelang nicht, da das Substrat im wäßrigen Inkubationsgemisch zu wenig löslich ist und andererseits das Enzym in Medien, die einen höheren Prozentsatz an Methylcellosolve besitzen und das Substrat zu lösen imstande wären, denaturiert wird.

Nach einer Elektrophorese von unfraktioniertem Erythrocytenlysat gelang es nicht, die Amino-peptidasen auf dem Gelstreifen anzufärben. Zur Erklärung dieser Tatsache könnte angenommen werden, daß die Enzyme durch die breite, intensiv rot gefärbte Bande des Hämoglobins überdeckt werden. Hämoglobin wandert bei pH 8,7 jedoch bedeutend langsamer als die beiden Amino-peptidasen. Wir nehmen daher an, daß die Amino-peptidasen im Lysat — ähnlich wie die Haptoglobine des Serums — an das in hoher Konzentration vorliegende Hämoglobin gebunden sind. Diese Vermutung wird durch einen weiteren Befund erhärtet: Bei isoelektrischer Fällung eines Großteils des Hämoglobins bei pH 6,8 tritt gleichzeitig ein bedeutender Enzymverlust auf. Da die Fermente bei diesem pH-Wert stabil sind, ist eine Denaturierung auszuschließen. Andererseits weisen Unterschiede im elektrophoretischen Verhalten des Hämoglobins und der Amino-peptidasen auf Verschiedenheiten im isoelektrischen Punkt hin, so daß eine gleichzeitig mit der Fällung des Hämoglobins eintretende isoelektrische Fällung der Amino-peptidasen sehr unwahrscheinlich ist. Durch die Annahme einer Bindung der Fermente an das Häm-

globin könnte diese Erscheinung jedoch zwanglos erklärt werden: Durch isoelektrische Fällung des Hämoglobins werden die an den Blutfarbstoff gebundenen Amino-peptidasen mitgefällt. Erst durch die Behandlung mit Aluminiumhydroxyd $C\gamma$ tritt — bedingt durch die starke Bindung der Amino-peptidasen an dieses Adsorbens — eine Trennung vom Hämoglobin ein, welches zum Großteil in Lösung bleibt. Die vom Hämoglobin getrennten Amino-peptidasen werden bei pH 6,8 nicht mehr gefällt und sind nach einer Elektrophorese in Stärkegel als diskrete Banden nachweisbar.

Tabelle 2. Spaltung von Aminosäure- β -naphthylamiden durch angereicherte Erythrocyten-Amino-peptidase*

Substrat: β -Naphthylamid von	Substrat: β -Naphthylamid von
L-Norleucin 160	L-Valin 13,5
L-Alanin 100	Glycin 7
L-Cystin 69	D,L-Asparaginsäure 6,5
L-Tyrosin 52	L-Serin 6,5
L-Leucin 33	L-Tryptophan 6,5
L-Prolin 33	L-Isoleucin 2,5
L-Cystein 30	N-Benzoyl-D,L-Arginin 1,5
L-Phenylalanin 21	L-Histidin 1,5
L-Lysin 15,5	L-Asparagin 0
L-Glutamin 15	D-Leucin 0

* Angegeben sind die relativen Geschwindigkeiten der Spaltung bezogen auf die für 100 bewertete Spaltungsgeschwindigkeit des L-Alanin- β -naphthylamids.

*Nesvadba*¹⁵ berichtete vor kurzem über die Synthese der β -Naphthylamide nahezu aller natürlich vorkommender Aminosäuren. Die Spezifität der hier untersuchten Amino-peptidase gegenüber diesen Substraten ist aus Tab. 2 zu ersehen. Besonders hervorgehoben sei, daß das Ferment L-Alanin- und L-Cystin- β -naphthylamid besonders rasch, L-Leucin- β -naphthylamid hingegen bedeutend langsamer hydrolysiert. Dies ist insofern bemerkenswert, als L-Leucin- β -naphthylamid ein Substrat darstellt, welches von vielen Amino-peptidasen — wie zum Beispiel von der Leucinamino-peptidase aus Schweinenieren oder von der Serumoxycocinase — optimal gespalten wird¹⁶.

Tuppy und Mitarbeiter¹³ beschrieben kürzlich eine Methode zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität proteolytischer Fermente mit Hilfe von Aminosäure-p-nitroaniliden als Substrate. Das im Verlaufe der Enzymreaktion freigesetzte p-Nitroanilin wird dabei direkt durch Ausmessung der Absorption bei 400 m μ quantitativ bestimmt. Wir untersuchten die Spaltbarkeit einiger Aminosäure-p-nitroanilide durch die

¹⁵ H. Nesvadba, Mh. Chem. **93**, 386 (1962).

¹⁶ H. Tuppy, U. Wiesbauer und E. Wintersberger, Mh. Chem., in Vorbereitung.

Aminopeptidase aus Erythrocyten und fanden, daß das Ferment die Spaltung dieser Substrate nur sehr schwach katalysiert. Die relative Hydrolysegeschwindigkeit, bezogen auf 100 für L-Alanin- β -naphthylamid, betrug 1,4 für L-Cystin-di-p-nitroanilid, 1,5 für L-Alanin-p-nitroanilid und 1,3 für L-Leucin-p-nitroanilid. In ihrer Aktivität gegenüber Aminosäure-p-nitroaniliden unterscheidet sich die untersuchte Aminopeptidase demnach beträchtlich von der Serumoxycocinase, welche diese Substrate rasch hydrolysiert¹³.

Tabelle 3. Spaltung von Dipeptiden durch angereicherte Erythrocyten-Aminopeptidase*

L-Leucyl-L-leucin	++++	L-Cystinyl-di-L-alanin	++
L-Leucyl-glycin	+++	L-Cystinyl-di-L-tyrosinamid	++
D,L-Alanyl-glycin	++	D-Leucyl-glycin	+
Glycyl-L-leucin	++	Glycyl-D-leucin	0

* Das Ausmaß der Spaltung wurde papierchromatographisch bestimmt und ist in halbquantitativer Weise wiedergegeben.

Tab. 3 zeigt die Spezifität des Enzyms gegenüber einigen Dipeptiden. Im Gegensatz zum L-Leucin- β -naphthylamid werden Dipeptide mit N-terminalem Leucinrest besonders rasch hydrolysiert. Dies bestätigt eine schon früher diskutierte Eigenschaft von Peptidasen¹⁷, derzufolge diese Fermente Aminosäuren aus Peptiden mit anderer relativer Geschwindigkeit abspalten als aus Amiden oder β -Naphthylamiden. Während D-Leucin- β -naphthylamid nicht hydrolysiert wird, konnte bei D-Leucyl-glycin eine langsame Hydrolyse festgestellt werden, Glycyl-D-leucin hingegen wird nicht gespalten. Auch in dieser Hinsicht unterscheidet sich das untersuchte Enzym von der Leucinaminopeptidase aus Schweinenieren, welche Glycyl-D-leucin langsam hydrolysiert, D-Leucylglycin jedoch nicht anzugreifen vermag¹⁸.

Zwei Arten von Hemmkörpern wurden untersucht: 1. Metallkomplexbildner (Komplexon, 1,10-Phenanthrolin und 8-Hydroxychinolin) und 2. einige dem L-Cystin-di- β -naphthylamid strukturell ähnliche kompetitive Substrate.

Von den untersuchten Metallkomplexbildnern hat Komplexon keinen Einfluß auf die Enzymaktivität, während 1,10-Phenanthrolin und 8-Hydroxychinolin in $5 \cdot 10^{-3}$ m Konzentration vollständig hemmen. Es sei erwähnt, daß andere in den Erythrocyten vorkommende und das Substrat L-Leucin- β -naphthylamid spaltende Aminopeptidasen durch Komplexon gehemmt werden. Im Verlaufe der Reinigung des beschriebenen Enzyms verschwindet mit der Abtrennung solcher Fermente die Hemmbarkeit der

¹⁷ H. Zuber, *Chimia* **14**, 405 (1960).

¹⁸ E. L. Smith und D. H. Spackman, *J. Biol. Chem.* **212**, 271 (1955).

Hydrolyse von L-Leucin- β -naphthylamid durch den Komplexbildner. Die Spaltung von L-Cystin-di- β -naphthylamid ist dagegen schon im unfraktionierten Erythrocytenlysate durch Komplexon nicht beeinflusst. Dies weist darauf hin, daß nur die hier beschriebene Aminopeptidase L-Cystin-di- β -naphthylamid zu hydrolysieren vermag. Da dieses Ferment jedoch durch 1,10-Phenanthrolin oder 8-Hydroxychinolin gehemmt wird, dürfte es ein Metallenzym sein, dessen Aktivität vom Vorhandensein eines Schwermetalles abhängt.

Es ist bekannt, daß dem L-Cystin-di- β -naphthylamid strukturell ähnliche Cystinylpeptide die enzymatische Hydrolyse dieses Substrats, ebenso wie die des Oxytocins, durch die Serumoxytocinase hemmen¹⁹. Auch die Wirksamkeit der untersuchten Aminopeptidase aus Erythrocyten gegenüber L-Cystin-di- β -naphthylamid ist in Gegenwart solcher Verbindungen verringert. Da die Peptide selbst durch das Ferment gespalten werden, wirken sie als kompetitive Substrate. Ist das molare Verhältnis von kompetitivem Substrat zu L-Cystin-di- β -naphthylamid gleich 1, so beträgt die Hemmung durch L-Cystin-di-benzylamid 19%, durch L-Cystin-di-phenoxyäthylamid 50%, durch L-Cystin-di-p-hydroxyanilid 48% und durch L-Cystinyl-di-L-tyrosinamid 58%.

Zweck dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob die oxytocinabbauende Fähigkeit der Erythrocyten — so wie die des Schwangerenserums — auf der Wirkung einer Cystinylpeptide spaltenden Aminopeptidase beruht. Es zeigte sich, daß dies nicht der Fall ist. Die untersuchte, L-Cystin-di- β -naphthylamid spaltende Aminopeptidase der Erythrocyten spaltet Oxytocin nicht, vielmehr wurde der Großteil des oxytocin-inaktivierenden Prinzips schon durch die Behandlung mit Aluminiumhydroxyd Cy von der Aminopeptidase getrennt. Tab. 4 zeigt den Abbau von Oxytocin durch Fermentlösungen verschiedenen Reinheitsgrades während 60 Min. langer Inkubation bei 37°. Der Mechanismus der Inaktivierung von Oxytocin durch Erythrocyten und durch Schwangerenserum ist demnach verschieden.

Dieses Ergebnis zeigt, daß es L-Cystin-di- β -naphthylamid spaltende Aminopeptidasen gibt, die nicht imstande sind, Oxytocin zu inaktivieren. Ein durch Co^{++} aktivierbares Enzym ähnlicher Eigenschaften konnte auch aus Schweinenieren angereichert werden²⁰. Umgekehrt wäre es wohl denkbar, daß eine gegenüber Cystin-di- β -naphthylamid wirkungslose Aminopeptidase der Erythrocyten oxytocin-spaltende Fähigkeiten besäße und somit für die Zerstörung des Hormons durch Erythrocytenlysate verantwortlich wäre. Nun ist jedoch von *Werle*³ gefunden worden, daß das

¹⁹ E. Wintersberger, H. Tuppy und E. Stoklaska, Mh. Chem. **91**, 577 (1960); E. Stoklaska und E. Wintersberger, in Vorbereitung.

²⁰ H. Tuppy und E. Wintersberger, unveröffentlichte Ergebnisse.

oxytocin-spaltende Prinzip der Erythrocyten durch Komplexon nicht gehemmt wird. Da andererseits die in Erythrocyten vorkommenden Amino-peptidasen — mit Ausnahme des hier beschriebenen Enzyms — durch den

Tabelle 4. Inaktivierung von Oxytocin

Fraktion	% abgebautes Oxytocin*
Lysat menschlicher Erythrocyten	70
Überstand nach Behandlung des Lysats mit Aluminiumhydroxyd $C\gamma$	65
Durch Elution vom Aluminiumhydroxyd mit Phosphatpuffer gewonnene Enzymlösung	7
Amino-peptidaselösung nach Chromatographie auf DEAE-Cellulose	0

* Die Inkubationsmischung enthielt zu Beginn der Enzymreaktion jeweils 0,5 IE Oxytocin, sowie von den einzelnen Fraktionen eine 0,5 ml Erythrocytenlysat (oder 2 mE Amino-peptidase) entsprechende Menge. Es wurde 60 Min. lang bei 37° inkubiert.

Komplexbildner gehemmt werden, ist diese Möglichkeit mit großer Sicherheit auszuschließen. Als andere Mechanismen für die Inaktivierung von Oxytocin kommen einerseits eine Hydrolyse durch proteolytische Fermente mit chymotrypsin-ähnlicher Spezifität, andererseits eine Trennung der Schwefelbrücke des Oxytocinmoleküls in Frage. Nach letztgenanntem Mechanismus wird Oxytocin unter anaeroben Bedingungen durch Uterus-extrakte inaktiviert²¹; auch die Spaltung des Insulins durch die aus Leber isolierte Insulinase geschieht auf ähnliche Weise²².

Über die physiologische Bedeutung des oxytocin-spaltenden Prinzips der Erythrocyten ist nichts bekannt. Da Oxytocin die Zellwand der Erythrocyten nicht durchdringen kann, wäre eine Wirkung im Sinne einer Kontrolle des Oxytocin-Spiegels des Blutes nur dann anzunehmen, wenn das oxytocin-spaltende Ferment durch Zerstörung der roten Blutzellen aus diesen in das Plasma eindringen könnte. Diese Möglichkeit wurde von *Smith*²³ für das Auftreten verschiedener Peptidasen im Blutserum diskutiert. Für die von uns untersuchten Amino-peptidasen des Serums und der Erythrocyten trifft dieser Mechanismus sicher nicht zu, da die Enzyme in vielen ihrer Eigenschaften verschieden sind.

Herrn Prof. Dr. *H. Tuppy* danken wir für sein Interesse und für viele wertvolle Diskussionen. Herrn Dr. *H. Nesvadba* (Fa. Sanabo, Wien) sind wir für die Überlassung von Aminosäure- β -naphthylamiden, Herr Dr. *E.*

²¹ *L. Audrain* und *H. Clauser*, *Biochim. Biophys. Acta* [Amsterdam] **30**, 191 (1958).

²² *H. H. Tomizawa*, *J. Biol. Chem.* **237**, 428 (1962).

²³ *E. L. Smith*, *E. G. Cartwright*, *F. H. Tyler* und *M. M. Wintrobe*, *J. Biol. Chem.* **185**, 59 (1950).

Stoklaska (Institut für Allgemeine und Experimentelle Pathologie der Universität Wien) für die Durchführung der der Oxytocinbestimmungen zu Dank verpflichtet.

Der Rockefeller-Stiftung wird für die dem Institut für Biochemie der Universität Wien gewährte Unterstützung, die dieser Arbeit zugute gekommen ist, gedankt.

Dem Österreichischen Institut für Hämoderivate und der Blutersatzstelle des Wiener Allgemeinen Krankenhauses danken wir für die Bereitstellung von Blutkonserven.