

Über die Einwirkung von Neuraminidase auf die Serumoxytocinase

Von

Hans Tuppy*, Ulrike Wiesbauer und Erhard Wintersberger

Aus dem Institut für Biochemie der Universität Wien

Mit 3 Abbildungen

Eingegangen am 23. Januar 1963

Die Oxytocinase des Schwangerenserums enthält *N*-Acetylneuraminsäure, die durch Neuraminidase abgespalten werden kann. Unbehandelte und neuraminsäure-freie Oxytocinase unterscheiden sich durch verschiedene Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld, besitzen jedoch die gleiche oxytocin-inaktivierende Wirkung und die gleiche Spezifität gegenüber Aminosäure- β -naphthylamiden.

Eine Vielzahl von Plasmaproteinen enthält gebundenes Kohlenhydrat, dessen vorherrschende Komponenten Hexosen, Hexosamine und Neuraminsäure sind. Neuraminsäure, die im menschlichen Plasma stets in Form ihrer *N*-Acetyl-Verbindung glykosidisch an andere Zuckerreste gebunden vorliegt und in den Glykoproteinen in der Regel eine endständige Position einnimmt¹, ist zum Teil für den relativ sauren Charakter vieler Glykoproteine verantwortlich. Endständige Neuraminsäurereste werden durch eine spezifische Glykosidase, die Neuraminidase², abgespalten; diese Abspaltung führt bei Glykoproteinen zu einer Änderung der elektrophoretischen Mobilität und in einigen Fällen auch der biologischen Aktivität. Es sind aber auch Beispiele bekannt, in denen der an das Glykoprotein gebundene Neuraminsäure keine Bedeutung für die biologische Wirksamkeit zukommt. Abspaltung von Neuraminsäure aus Prothrombin beeinflusst we-

* Herrn Dr. Karl Stosius zum 80. Geburtstag.

¹ R. J. Winzler in F. W. Putnam, „The Plasma Proteins“, Bd. 1, S. 309, Academic Press, 1960.

² A. Gottschalk, Biochim. Biophys. Acta [Amsterdam] **20**, 560 (1956).

der die Aktivierbarkeit dieses Zymogens noch die Aktivität des durch Aktivierung aus ihm gebildeten proteolytischen Ferments Thrombin³.

Im Verlaufe unserer Untersuchungen über die Spezifität der Serum-oxytocinase, einer Aminopeptidase, die in Seren schwangerer Frauen vorkommt und befähigt ist, die Peptidhormone Oxytocin und Vasopressin zu spalten⁴⁻⁶, erhob sich die Frage, ob die Serum-oxytocinase Neuraminsäure enthält, diese durch Neuraminidase abgespalten wird und ob die Behandlung mit Neuraminidase die Spezifität der Aminopeptidase beeinflusst.

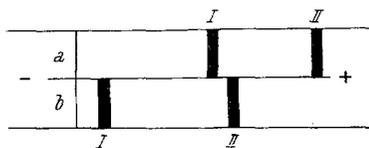


Abb. 1

Abb. 1. Störkegelektrophorese von Schwangerenserum vor und nach der Behandlung mit Neuraminidase. Darstellung der Aminopeptidasen mit Leucin- β -naphthylamid und Fast Garnet GBC. a) 0,3 ml Schwangerenserum + 0,1 ml 0,1 mol Triäthanolamin-Puffer pH 7,4 + 0,1 ml H₂O; b) 0,3 ml Schwangerenserum + 0,1 ml 0,1 mol Triäthanolamin-Puffer pH 7,4 + 0,1 ml Neuraminidase-Lösung (10 Einheiten). Beide Mischungen wurden vor der Elektrophorese 60 Min. bei 37° inkubiert



Abb. 2

Abb. 2. Störkegelektrophorese von Serumocytozinase vor und nach Behandlung mit Neuraminidase. Anfärbung mit Leucin- β -naphthylamid und Fast Garnet GBC. a) 0,5 ml Oxytocinase-Lösung (0,05 Einheiten) + 0,1 ml H₂O; b) 0,5 ml Oxytocinase-Lösung (0,05 Einheiten) + 0,1 ml Neuraminidase-Lösung (10 Einheiten). Beide Mischungen wurden vor der Elektrophorese 2 Stdn. bei 25° inkubiert

Zunächst wurde die Einwirkung von Neuraminidase auf die Serum-oxytocinase mittels Störkegel-elektrophorese untersucht, da die Abspaltung von Neuraminsäure sich durch eine Änderung der Wanderungsgeschwindigkeit der Aminopeptidase im elektrischen Feld zu erkennen geben sollte, die durch eine zur Verfügung stehende, spezifische Methode zur Anfärbung von Aminopeptidasen auf dem Gelstreifen⁷ einfach und rasch ermittelt werden kann. Es wurde daher mit Neuraminidase inkubiertes Schwangerenserum und parallel dazu unbehandeltes Schwangerenserum durch Störkegel-elektrophorese aufgetrennt. Die nach Anfärbung der Aminopeptidasen mit Leucin- β -naphthylamid und dem Diazoniumsalz Fast Garnet Salt GBC erhaltenen Banden sind in Abb. 1 zu sehen. Band I stellt die Serum-oxytocinase dar, Bande II eine zweite, auch in Seren von Nichtschwangeren und Männern vorkommende Aminopeptidase⁷. Die elektrophoretische Mobilität beider Fermente wurde durch Behandlung mit Neuraminidase stark verlangsamt, ein Befund, der in Übereinstimmung mit der Abtrennung saurer Gruppen aus den Proteinen steht. Wie Abb. 2 zeigt, wurde das gleiche Ergebnis auch mit gereinigter Oxytocinase erhalten.

³ D. F. Waugh und D. J. Baughman in P. D. Boyer, H. Lardy und K. Myrbäck, „The Enzymes“, 2. Aufl., Bd. 4, S. 215, Academic Press, 1960.

⁴ H. Tuppy und H. Nesvadba, Mh. Chem. 88, 977 (1957).

⁵ H. Tuppy und E. Wintersberger, Mh. Chem. 91, 1001 (1960).

⁶ E. Stoklaska und E. Wintersberger. Arch. exper. Path. Pharmacol. 236, 358 (1959).

⁷ E. Wintersberger und H. Tuppy, Mh. Chem. 91, 406 (1960).

Die Beobachtung, daß beide im Schwangerenserum vorhandenen Aminopeptidasen durch Neuraminidase verändert werden, legte die Frage nahe, ob dies eine für Aminopeptidasen typische Eigenschaft sei, unabhängig von der Herkunft der Enzyme. Es wurde darum gereinigte Leucinaminopeptidase⁸ aus Schweinenieren ebenfalls einer Behandlung mit Neuraminidase unterworfen und elektrophoretisch untersucht. Im Gegensatz zur Oxytocinase weist Leucinaminopeptidase vor und nach Einwirkung von Neuraminidase dieselbe Wanderungsgeschwindigkeit auf. Leucinaminopeptidase aus Schweinenieren besitzt demnach keine durch Neuraminidase abspaltbaren Neuraminsäurereste; dieser Befund steht mit den Ergebnissen von *Spackman, Smith* und *Brown*⁸ in Einklang, die in reinsten

Leucinaminopeptidase-Präparaten nur Protein fanden.

Wie die Abb. 1 und 2 zeigen, ist der Unterschied in der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit der ursprünglichen und der mit Neuraminidase behandelten Serum-oxytocinase sehr beträchtlich. Dies ließ auf eine bedeutende Verminderung

der negativen Ladungen des Proteins schließen und legte die Vermutung nahe, daß mehr als ein Neuraminsäurerest pro Molekül Aminopeptidase abgespalten wird. Um dies näher zu untersuchen, wurde Oxytocinase mit kleinen Konzentrationen Neuraminidase inkubiert

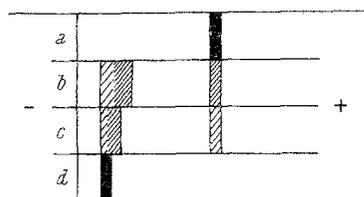


Abb. 3. Stärkegelelektrophorese von Serumoxytocinase a) vor Inkubation, b) nach 1 Min., c) nach 5 Min. und d) nach 60 Min. Inkubation mit Neuraminidase. (Nähere Angaben im Experimentellen Teil.)

Tabelle 1. Nachweis von Neuraminsäure in der Serumoxytocinase Oxytocinase (0,1 Einheit) wurde vor und nach Inkubation mit Neuraminidase (20 Einheiten) auf den Gehalt an freier und gebundener Neuraminsäure geprüft. Die mit Neuraminidase behandelte Lösung wurde sodann gegen 0,002 m Triäthanolamin-Puffer (pH 7,6) dialysiert und die Neuraminsäure im eingeengten Dialysat bestimmt.

	Im Serumoxytocinase-Präparat		Nach Dialyse des Inkubationsgemisches im Dialysat
	vor Inkubation mit Neuraminidase	nach Inkubation mit Neuraminidase	
Gebundene Neuraminsäure	15 µg	0	—
Freie Neuraminsäure	0	15 µg	12,5 µg

und die Reaktion nach verschiedenen Zeiten unterbrochen. Die Elektrophorese der einzelnen Proben ergab das in Abb. 3 gezeigte Resultat. Obwohl nach Abspaltung von Neuraminsäure in allen Fällen nur eine neue

⁸ D. H. Spackman, E. L. Smith und D. M. Brown, J. Biol. Chem. **212**, 255 (1955).

Bande entstanden war, dürfte doch die Tatsache, daß diese Bande nach kurzer Inkubationszeit sehr breit war und mit zunehmender Dauer der Neuraminidase-Einwirkung schmaler wurde, während der basische Charakter des modifizierten Enzyms stetig zunahm, dafür sprechen, daß mehrere Neuraminsäurereste nacheinander abgespalten wurden. Zwischen dem nativen (a) und dem vollkommen neuraminsäure-freien Enzym (d) scheinen daher Mischungen von nativer Oxytocinase und Fermenten vorzuliegen, von denen ein oder mehrere Neuraminsäurereste entfernt wurden, die im Elektropherogramm jedoch nicht als einzelne diskrete Banden erkennbar sind (b,c).

Die in einer gegebenen Menge unserer Oxytocinaselösung gemessene gebundene Neuraminsäure (Test nach *Svennerholm*⁹)* wurde nach Inkubation mit Neuraminidase zur Gänze als freie Neuraminsäure wiedergefunden (Test nach *Aminoff*¹⁰). Nach Dialyse der Inkubationsmischung fanden wir 83% der freien Neuraminsäure im Dialysat (Tab. 1). Die Elektrophorese der mit Neuraminidase behandelten Oxytocinase vor und nach Dialyse ergab dasselbe, mit Abb. 2 identische Bild.

Nachdem das Vorkommen von Neuraminsäure in der Serum-oxytocinase bewiesen war, wurde untersucht, ob diese Kohlenhydratkomponente Aktivität und Spezifität der Serum-oxytocinase beeinflußt. Die Tatsache, daß neuraminsäure-freie Oxytocinase nach Elektrophorese auf Gelstreifen mit Leucin- β -naphthylamid als Substrat angefärbt werden konnte, schloß eine vollkommene Inaktivierung der Aminopeptidase bereits aus. Quantitative Untersuchungen mit den Substraten L-Cystin- und L-Leucin- β -naphthylamid ergaben, daß das Ferment nach Behandlung mit Neuraminidase noch 94 bis 99% seiner ursprünglichen Aktivität besaß; die Wirksamkeit des Enzyms hatte also keine wesentliche Änderung erfahren. Es blieb nun noch zu prüfen, ob die Spezifität der Serum-oxytocinase gegenüber einer größeren Anzahl von Substraten durch die Abspaltung von Neuraminsäure verändert wird.

Zunächst wurde die Spezifität der nativen Oxytocinase gegenüber Aminosäure- β -naphthylamiden¹¹ bestimmt (Tab. 2, Kolonne I). Am raschesten wird L-Leucin- β -naphthylamid gespalten, gefolgt von L-Alanin- und L-Norleucin- β -naphthylamid sowie den β -Naphthylamiden der aromatischen Aminosäuren. Hervorgehoben sei die hohe Aktivität gegenüber den

* Eine absolute Bestimmung des prozentuellen Neuraminsäure-Gehalts der Serumoxytocinase war nicht möglich, da die in dieser Arbeit verwendete, etwa 4000fach angereicherte Enzymlösung zwar einheitlich in bezug auf die Aminopeptidaseaktivität, doch noch mit geringen Mengen unbekannter Proteine verunreinigt war.

⁹ L. *Svennerholm*, *Biochim. Biophys. Acta* [Amsterdam] **24**, 604 (1957).

¹⁰ D. *Aminoff*, *Biochem. J.* **81**, 384 (1961).

¹¹ H. *Nesvadba*, *Mh. Chem.* **93**, 386 (1962).

Tabelle 2. Spezifität der Serumoxycocinase gegenüber Aminosäure- β -naphthylamiden

Die angegebenen Werte sind relative Hydrolysegeschwindigkeiten, bezogen auf die mit 100 bewertete Spaltungsgeschwindigkeit des L-Leucin- β -naphthylamids. Die Substrat-Stammlösungen waren $5 \cdot 10^{-3}$ m (in $5 \cdot 10^{-3}$ m HCl): die Enzymaktivitäten wurden mit der für L-Cystin-di- β -naphthylamid beschriebenen Methode⁵ bestimmt.

β -Naphthylamid von	I	II
	Oxycocinase vor Behandlung mit Neuraminidase	Oxycocinase nach Behandlung mit Neuraminidase
L-Leucin	100	100
L-Phenylalanin	71	
L-Lysin	70	70
L-Norleucin	60	
L-Alanin	55	51
L-Ornithin	45	
L-Tyrosin	20	20,5
L-Tryptophan	16,5	
L-Glutamin	12,5	12,4
L-Asparagin	11	
L-Serin	8,8	
L-Histidin	5,5	5,5
L-Glycin	5,5	4,9
L-Cystin	5,2	5,4
L-Prolin	4,3	
DL-Asparaginsäure	4,2	
L-Cystein	2,8	
L-Valin	2,0	
L-Isoleucin	1,9	
L-Hydroxyprolin	1,8	
DL-Methionin	1,5	
O-Acetyl-L-hydroxyprolin	1,1	
O-Acetyl-L-serin	0,3	
Benzoyl-DL-arginin	0	
D-Leucin	0	

basischen Substraten L-Lysin- und L-Ornithin- β -naphthylamid. Die Naphthylamide von Aminosäuren mit kürzeren oder stärker verzweigten Seitenketten (Glycin, Isoleucin, Valin) hingegen werden bedeutend langsamer hydrolysiert. Die abzusplittenden Aminosäuren müssen die L-Konfiguration aufweisen. Vergleichende Versuche mit gereinigter Leucinaminopeptidase aus Schweinenieren zeigten, daß dieses Ferment bei der Spaltung von Aminosäure- β -naphthylamiden bestimmte Substrate wesentlich stärker bevorzugt. L-Leucin- und L-Norleucin- β -naphthylamid werden — so wie von der Serumoxycocinase — sehr rasch hydrolysiert, während die Aktivität gegenüber den β -Naphthylamiden des L-Alanins sowie der aromatischen und basischen Aminosäuren viel geringer ist. Auch L-Cystin-

di- β -naphthylamid wird im Verhältnis zu L-Leucin- β -naphthylamid von der Leucinaminopeptidase dreimal langsamer gespalten als von der Serumoxytocinase.

Kolonne II in Tab. 2 zeigt die mit neuraminsäure-freier Oxytocinase und einer Auswahl von Substraten erhaltenen Werte der Spaltungsgeschwindigkeit; sie stimmen innerhalb der Fehlergrenze mit den in Kolonne I für das native Enzym angegebenen Werten überein. Die für diese Versuche verwendete Oxytocinase war nach der Inkubation mit Neuraminidase dialysiert worden und enthielt keine freie oder gebundene Neuraminsäure.

Zuletzt wurde die Aktivität neuraminsäure-freier Oxytocinase gegenüber dem physiologischen Substrat der Amino-peptidase, dem Hypophysenhinterlappenhormon Oxytocin, untersucht. Native und neuraminsäure-freie Oxytocinaselösungen mit gleicher Aktivität gegenüber L-Cystin-di- β -naphthylamid bauen das Hormon in gleicher Weise ab: Bei Inkubation von Oxytocin mit der gleichen Menge des nativen und des neuraminsäure-freien Enzyms wurde unter den gewählten Bedingungen die Wirksamkeit des Hormons auf 3,3 bzw. 2,8% der ursprünglichen Aktivität herabgesetzt.

Die an die Serumoxytocinase gebundene Neuraminsäure ist demnach für die Aktivität der Amino-peptidase nicht essentiell und ohne Einfluß auf die Spezifität des Enzyms. Abspaltung mit Neuraminidase bewirkt eine Änderung der Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld. Inwieweit diese Behandlung die Stabilität der Oxytocinase beeinträchtigt, wurde noch nicht näher untersucht, doch scheint die neuraminsäure-freie Amino-peptidase labiler zu sein als das native Enzym.

Experimenteller Teil

Serumoxytocinase wurde aus Retroplacentarserum auf beschriebene Weise gewonnen⁵. Die verwendete Enzymlösung (in 0,01 m Triäthanolaminpuffer, pH 7,4) war etwa 4000fach angereichert und enthielt 0,1 Einheit Oxytocinase/ml. Sie wurde mittels Stärkegelelektrophorese durch Anfärbung des Gelstreifens mit Leucin- β -naphthylamid und Fast Garnet GBC auf Anwesenheit anderer Amino-peptidasen geprüft.

Die Aktivität der Enzymlösung wurde mit Hilfe von L-Cystin-di- β -naphthylamid als Substrat wie beschrieben bestimmt⁵. Als eine Einheit wird diejenige Menge Serumoxytocinase bezeichnet, die von L-Cystin-di- β -naphthylamid bei Substratüberschuß in 1 Min. bei 37° und pH 7,4 1 μ Mol β -Naphthylamin abspaltet¹².

Leucinaminopeptidase wurde nach Angaben von *Spackman*⁸ aus Schweinenieren gereinigt. Die Anreicherung wurde mit L-Leucin- β -naphthylamid als Substrat verfolgt. Im allgemeinen wurde das nach der Acetonfällung erhaltene Präparat verwendet, für Spezifitätsuntersuchungen wurde zur weiteren

¹² Rep. Commission on Enzymes, Internat. Union of Biochem., Pergamon Press, 1961.

Reinigung die von *Folk*¹³ vorgeschlagene Chromatographie auf DEAE-Cellulose durchgeführt. Es wurden nur solche Präparate verwendet, die in der Stärkegelelektrophorese eine einzige Amino-peptidasebande ergaben.

Neuraminidase aus *Vibrio Cholerae* wurde von den Behringwerken A. G., Marburg/Lahn, bezogen. Die Präparate enthielten nach Angabe der Hersteller 100 Einheiten/ml und waren in 0,05 m Acetatpuffer pH 5,5/0,9% NaCl/0,1% CaCl₂ gelöst. (1 Einheit entspricht jener Menge Neuraminidase, die von 4 mg Harnmucin, gelöst in 2 ml 0,1 m Acetatpuffer pH 5,5, in 15 Min. und bei 37° 1 µg Neuraminsäure abspaltet¹⁴).

Die käufliche Neuraminidaselösung wurde vor der Verwendung gegen 0,01 m Triäthanolamin-puffer pH 7/0,01 m CaCl₂ dialysiert, um den pH-Wert der Lösung dem der Oxytocinaselösung anzugleichen. Calcium wurde zugesetzt, da es eine Stabilisierung der Neuraminidase bewirkt¹⁵. Sowohl die käuflich erhaltene Neuraminidase als auch die dialysierte Lösung wurden nach Angaben von *Mohr* und *Schramm*¹⁵ auf ihre Aktivität geprüft, wobei als Substrat Kälber-Erythrocytenstroma diente. Wir fanden, daß die Dialyse keinen Einfluß auf die Aktivität hat und daß Neuraminidase bei pH 7 und 0° längere Zeit ohne nennenswerten Aktivitätsverlust aufbewahrt werden kann.

Stärkegelelektrophoresen wurden in 0,025 m Boratpuffer, pH 8, bei einem Spannungsgefälle von 4 bis 5 V/cm durchgeführt. Die Dauer der Elektrophoresen betrug 14 bis 16 Std. Durch Kühlung wurde die Temperatur des Gelblocks während der Elektrophorese auf etwa 0° gehalten. Die Anfärbung der Amino-peptidasen auf dem Gelstreifen erfolgte mit Leucin-β-naphthylamid und dem Diazoniumsalz Fast Garnet Salt GBC. Einzelheiten der Elektrophorese und der Anfärbemethode sind beschrieben⁷.

Der zeitliche Verlauf der Einwirkung von Neuraminidase auf die Serumoxycytocinase wurde auf folgende Weise verfolgt: 0,7 ml Oxytocinaselösung (0,07 Einheiten) in 0,02 m Triäthanolamin-puffer, pH 7, wurden mit 0,05 ml Neuraminidaselösung (5 Einheiten) bei 25° inkubiert. Nach 1, 5 und 60 Min. wurden je 0,2 ml der Inkubationsmischung in ein auf 0° vorgekühltes Röhrchen zu 0,02 ml 0,5 m Triäthanolamin-puffer, pH 8,5, gefügt. Durch die Erhöhung des pH sowie durch die Abkühlung auf 0° wurde die Neuraminidase-Aktivität stark vermindert. Die einzelnen Proben wurden mittels Stärkegelelektrophorese miteinander sowie mit unbehandelter Serumoxycytocinase (0,2 ml + 0,02 ml 0,5 m Triäthanolamin-puffer pH 8,5) verglichen (Abb. 3).

Zur Herstellung neuraminsäure-freier Oxytocinase wurden 2 ml der Amino-peptidaselösung (0,2 Einheiten) mit 0,4 ml Neuraminidaselösung (40 Einheiten) 2 Std. bei 25° inkubiert und sodann unter Rühren und bei 0° 2mal 8 bis 10 Std. gegen je 50 ml 0,002 m Triäthanolamin-puffer, pH 7,6, dialysiert. So behandelte Oxytocinase enthielt weder freie noch gebundene Neuraminsäure. Diese Lösung wurde für Spezifitätsuntersuchungen verwendet.

Zur Inaktivierung von Oxytocin wurden 0,5 ml 0,2 m Phosphatpuffer pH 7,4 mit 3,45 ml H₂O, 0,05 ml Oxytocinaselösung (5 Millieinheiten) vor bzw. nach Behandlung mit Neuraminidase und 1 ml Synthocinon (0,5 IE Oxytocin) gemischt und 1 Stde. bei 37° inkubiert. Die Reaktion wurde durch 5 Min. langes Erhitzen im kochenden Wasserbad unterbrochen und

¹³ J. E. Folk, J. A. Gladner und T. Viswanatha, Biochim. Biophys. Acta [Amsterdam] **36**, 256 (1959).

¹⁴ A. Gottschalk in P. D. Boyer, H. Lardy und K. Myrbäck, „The Enzymes“, 2. Aufl. Bd. 4, S. 461, Academic Press, 1960.

¹⁵ E. Mohr und G. Schramm, Z. Naturforsch. **15 b**, 568 (1960).

die restliche Oxytocinaktivität nach der Methode von *Holton*¹⁶ am isolierten Rattenuterus gemessen.

Der Rockefeller-Foundation danken wir für hilfreiche Unterstützung.

Herrn Dr. *H. Nesvadba* (Sanabo, Wien) sind wir dafür, daß er uns die meisten der in dieser Arbeit verwendeten Aminosäure- β -naphthylamide zur Verfügung stellte, Herrn Dr. *E. Stoklaska* (Institut für Allgemeine und Experimentelle Pathologie der Universität Wien) für Oxytocinbestimmungen zu großem Dank verpflichtet.

¹⁶ *P. Holton*, Brit. J. Pharmacol. **3**, 328 (1948).