

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
7. Jg., S. 253—258, Mai 1969

Untersuchungen über die pH-Abhängigkeit, die Hemmbarkeit und Reaktivierbarkeit von Angiotensin II und Angiotensin II-amid spaltenden Enzymen des menschlichen Plasmas¹⁾

VON M. ZWANZIG UND W. OELKERS

Aus der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik Berlin (Direktor: Prof. Dr. M. Schwab)

(Eingegangen am 17. Dezember 1968)

Die pH-Abhängigkeit der biologischen Inaktivierung von α -L-Aspartyl¹-Angiotensin II (A) und von α -L-Asparaginy¹-Angiotensin II (H) durch menschliches Plasma sowie die pH-Abhängigkeit der Hemmbarkeit von „Angiotensinasen“ durch EDTA und ihre Reaktivierung durch zweiwertige Metallionen wurden vergleichend untersucht. Beide Substrate werden durch mindestens drei in verschiedenen pH-Bereichen optimal wirksame Enzyme gespalten. In allen pH-Bereichen fanden sich unterschiedliche Eigenschaften der A- bzw. H-inaktivierenden Enzyme. Zusätzlich wurde die pH-Abhängigkeit der biologischen Inaktivierung von H und der Abspaltung von Asparagin aus H (Aminopeptidase) verglichen. Die Annahme, daß die bei pH 5,6 optimal wirksamen Enzyme Endopeptidasen und die im Neutralbereich und im Alkalischen optimal wirksamen Enzyme Aminopeptidasen sind, ist mit unseren Ergebnissen vereinbar.

Studies on the pH-dependence, inhibition and reactivation of angiotensin II and angiotensin II-amide splitting enzymes in human plasma

We compared the pH-dependence of the inactivation of α -L-aspartyl¹-angiotensin II (A) and of α -L-asparaginy¹-angiotensin II (H) by human plasma. In addition, the pH-dependence of EDTA-inhibition of „angiotensinasen“ and its reversal by divalent cations were investigated. Both substrates are split by at least three enzymes with different pH-optima. There are differences between the A- and H-splitting enzymes in the acid, neutral and alkaline range. We further investigated the pH-dependence of the hydrolysis of the N-terminal peptide bond in H. Our results are compatible with the assumption that the enzymes most active at pH 5.6 are endopeptidases, while the enzymes with pH-optima in the neutral and alkaline range are aminopeptidases.

REGOLI und Mitarbeiter (1) äußerten als erste die Vermutung, daß Asparaginy¹-Angiotensin II (H) und Aspartyl¹-Angiotensin II (A) im Blutplasma durch unterschiedliche Enzyme inaktiviert werden. NAGATSU und Mitarbeiter (2) konnten diese Annahme weitgehend bestätigen. Sie fanden, daß die Hydrolyse von α -L-Aspartyl¹- bzw. α -L-Glutamyl- β -Naphthylamid durch A, nicht aber durch H kompetitiv gehemmt wird. Die Hydrolyse von L-Leucyl- β -Naphthylamid wird andererseits nur durch H kompetitiv gehemmt. Während die Hydrolyse der N-terminalen Peptidbindung von A in unverdünntem Serum bei pH 7,0 durch 12 mM Ca⁺⁺ aktiviert und durch 2,4 mM Ni⁺⁺ vollständig gehemmt wird, hemmt Ca⁺⁺ die entsprechende Reaktion bei der Hydrolyse von H schwach und Ni⁺⁺ nur um 50%. Ähnliche Unterschiede ergaben sich bei der Untersuchung der Hydrolyse von α -L-Aspartyl- β -Naphthylamid bzw. L-Leucyl- β -Naphthylamid in Gegenwart von Ca⁺⁺ und Ni⁺⁺ (3). Die Autoren betonen die Ähnlichkeit der Hemmungs- und Aktivierungscharakteristik des enzymatischen Abbaues von A im Plasma mit der eines von GLENNER und McMILLAN (4) in Rattennieren gefundenen Enzyms (Aminopeptidase A), das spezifisch N-terminale α -L-Aspartyl- und α -L-Glutamyl-Peptidbindungen spaltet. Für die Hydrolyse von H dagegen werden mehrere weniger spezifische Peptidasen angenommen, die zum Teil auch N-terminale L-Leucyl-Peptidbindungen spalten.

¹⁾ Der Inhalt dieser Arbeit wurde auszugsweise auf der 74. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin in Wiesbaden (22.—25. 4. 1968) vorgetragen.

Die von KHAIRALLAH und Mitarbeitern (5) beschriebene „Angiotensinase A“ des menschlichen Plasmas soll spezifisch N-terminale α -L-Aspartyl- und α -L-Asparaginy¹-Peptidbindungen spalten. Angiotensin-Analoga wie β -Aspartyl¹-Angiotensin II und Arginy¹-Angiotensin II werden nicht angegriffen. KHAIRALLAH und Mitarbeiter (6) konnten aber später durch Ammoniumsulfat-Fraktionierung die α -L-Aspartyl-Peptidspaltende Enzymaktivität von der α -L-Asparaginy¹-Peptidspaltenden trennen. Die zum Teil widersprüchlichen Angaben in der Literatur über Substratspezifität, Hemmbarkeit und Reaktivierbarkeit Angiotensin-spaltender Enzyme im Plasma beginnen sich allmählich zu entwirren.

Wir haben in der vorstehenden Mitteilung (7) bereits darauf hingewiesen, daß die Bedeutung der Plasma-angiotensinasen (ATasen) für die Begrenzung der biologischen Wirksamkeit von Angiotensin wahrscheinlich gering ist. Wichtig ist die Kenntnis ihrer Eigenschaften aber bei in-vitro-Versuchen, zum Beispiel bei der Reninbestimmung. Die ATasen müssen inaktiviert werden, damit das bei der enzymatischen Reaktion zwischen Renin und Angiotensinogen (Reninsubstrat) gebildete Angiotensin nicht zerstört wird und quantitativ bestimmt werden kann. Da bei manchen Methoden der Reninbestimmung die Renin-Substratreaktion nicht im Neutralbereich stattfindet (8, 9, 10), ist auch die Kenntnis der im schwach Sauerem wirksamen Angiotensin-spaltenden Enzyme wichtig.

Wir berichten im Folgenden über vergleichende Untersuchungen der biologischen Inaktivierung von A und H

in Abhängigkeit von der Wasserstoffionen-Konzentration im menschlichen Plasma. Daneben wurde die Abhängigkeit der Inaktivierbarkeit von ATasen durch den Chelatbildner Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) und ihrer Reaktivierbarkeit durch zweiwertige Metallionen von der Wasserstoffionenkonzentration untersucht. Da uns der Vergleich der Substrate A und H wichtig erschien, konnten wir den von uns beschriebenen optischen Test (11) zur Bestimmung der Angiotensin-Amino-peptidase-Aktivität nicht verwenden. Die dafür erforderlichen großen Mengen Aspartyl¹-Angiotensin II standen nicht zur Verfügung. Wir bedienten uns deshalb eines bei vielen früheren Untersuchungen (1, 5, 6, 12) angewandten Verfahrens. Der Verlust der vasopressorischen Wirkung einer bekannten Menge Angiotensin nach Inkubation mit Plasma unter definierten Bedingungen wird an der narkotisierten Ratte gemessen. Mit dieser Methode können nur relative Enzymaktivitäten bestimmt werden, da keine Substratsättigung der Enzyme gegeben ist und da sich die Reaktionsgeschwindigkeit durch Abnahme der Substratkonzentration während der Inkubation ständig verringert. Die Methode genügt aber dem Anliegen dieser Untersuchung und ist hinreichend genau.

Methodik

Untersuchungsmaterial

Die Untersuchungen wurden mit Heparinplasma von gesunden Versuchspersonen (2.000 E Heparin/100 ml Vollblut) durchgeführt. Das Plasma wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20° gefroren aufbewahrt.

Inkubation von Plasma mit Angiotensin zur Bestimmung seiner biologischen Inaktivierung

Die Inkubationsansätze enthielten:

1,0 ml Substratlösung [500 ng α -L-Aspartyl¹-Angiotensin II bzw. 500 ng α -L-Asparaginyll¹-Angiotensin II (Hypertensin CIBA), gelöst in 1 ml 0,05M Tris-Maleatpuffer unterschiedlicher pH-Werte].

3,9 ml 0,05M Trismaleatpuffer des gleichen pH-Wertes. Der Trismaleatpuffer wurde nach den Angaben der Wissenschaftlichen Tabellen Documenta Geigy 1962, Seite 277 und 278, hergestellt. Für die Bestimmung der pH-Abhängigkeit der biologischen Inaktivierung von A und H wurden Abstände von 0,2–0,4 pH-Einheiten zwischen pH 5,2 und pH 8,6 gewählt. Für die Reaktivierungsversuche mit unterschiedlichen Metallionenkonzentrationen wurden jeweils drei pH-Werte gewählt, die den vorher ermittelten pH-Optima der biologischen Inaktivierung entsprachen.

0,5 ml 0,9proz. NaCl-Lösung für die Bestimmung der pH-Optimum-Kurven beider Substrate. Bei Inkubation mit EDTA oder Metallsalzen wurde das Zehnfache der gewünschten Endkonzentration von Na₂-Äthylendiamintetraessigsäure (Titrplex III der Firma Merck) oder der Metall-Dichloride oder beider zusammen in 0,5 ml 0,9proz. NaCl-Lösung hinzugefügt. Die Lösungen wurden vorher mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt.

0,1 ml einer 5proz. wäbr. Lösung von Neomycinsulfat (Bykomycin der Firma BYK-Gulden) zur Verhinderung von Bakterienwachstum.

0,5 ml Mischplasma, dessen pH auf 7,0 eingestellt wurde.

Die Ansätze wurden im Eisbad hergestellt. Unmittelbar nach der Zugabe des Plasmas und gründlichem Mischen wurden 2 ml als Leerwert (nichtinkubierter Ansatz) entnommen und in ver-

schlossenen Glasröhrchen 10 Min. im Wasserbad auf 100° erhitzt. Die koagulierten Proteine wurden mit 3000 U./Min. abzentrifugiert und der Überstand in Polystyrol-Röhrchen bei -20° bis zur Testung an der Ratte eingefroren. Der verbleibende Ansatz (3 ml) wurde, wenn H das Substrat war, 10 Min., wenn A das Substrat war, 120 Min. bei 37° inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Ansätze sofort auf 100° erhitzt und weiter wie die Leerwerte behandelt.

Nach Feststellung der pH-Optima der Angiotensin-Inaktivierung durch menschliches Plasma wurde die Hemmbarkeit der ATasen durch Dialyse gegen 0,9proz. NaCl-Lösung bzw. gegen Na₂-EDTA in 0,9proz. NaCl-Lösung geprüft.

Je 50 ml Plasma wurden a) sofort eingefroren, b) 9 Tage bei 3° gegen 0,9proz. NaCl-Lösung dialysiert, c) 5 Tage bei 3° gegen 10 mM bzw. 1,0 mM Na₂-EDTA in 0,9proz. NaCl-Lösung (auf pH 7,0 eingestellt), anschließend 4 Tage gegen 0,9proz. NaCl-Lösung dialysiert. Die Dialysierflüssigkeit wurde täglich gewechselt. Nach Beendigung der Dialyse wurden Volumendifferenzen der Plasmaproben durch Zugabe von 0,9proz. NaCl-Lösung ausgeglichen.

Dann wurde die biologische Inaktivierung von A und H durch unbehandeltes bzw. dialysiertes Plasma geprüft (Inkubationsansatz siehe oben). A wurde mit Plasma bei pH 5,6, 6,8 und 8,0, H bei pH 5,6, 7,2 und 8,6 inkubiert. Die Inkubationszeiten wurden so gewählt, daß bei jedem pH-Wert durch unbehandeltes Plasma etwa 50% der Substrate A oder H inaktiviert wurden (s. Tab. 1). Danach wurde die Reaktivierbarkeit der durch Dialyse gegen EDTA gehemmten ATasen geprüft. Die Ansätze enthielten verschiedene Konzentrationen CaCl₂, MgCl₂, ZnCl₂, MnCl₂ und CoCl₂.

Angiotensinbestimmung an der Ratte

Männliche Wistar-Ratten (200–300 g) wurden in Pentobarbitalnarkose nephrektomiert. 24 Stdn. später wurden sie in Urethanarkose (2 ml/20proz. Urethanlösung i. m.) tracheotomiert. In die rechte Vena jugularis und in die linke Arteria carotis wurden Polyäthylenkatheter eingeführt. Der Druck in der Arteria carotis wurde über ein Hg-Manometer mit Tintenschreiber am Kymographen registriert. In die Jugularvene wurden 0,2 ml der zu testenden Lösung bzw. 0,2 ml der Angiotensin-Standardlösung injiziert. Danach wurde 0,1 ml Ringer-Lösung injiziert. Die Angiotensin-Standardlösungen enthielten 50 ng bzw. 100 ng Hypertensin CIBA in 1 ml Ringer-Lösung. Jede unbekannte Probe, auch die Leerwerte, wurden zweimal mit dem unmittelbar vorher und nachher injizierten Hypertensin-Standard verglichen. Alle angegebenen Inaktivierungsraten sind Mittelwerte zweier Bestimmungen. Die biologische Inaktivierung wird als prozentualer Verlust der pressorischen Wirkung des inkubierten Ansatzes im Vergleich mit dem nicht inkubierten Ansatz angegeben. Eine Spontanhydrolyse von Angiotensin wurde in Ansätzen, die statt des Plasmas 0,9proz. NaCl-Lösung enthielten, bei keinem der geprüften pH-Werte zwischen 5,2 und 8,6 festgestellt.

Die Angiotensinbestimmung mit dem angegebenen Verfahren ist gut reproduzierbar. Die Differenzen der Inaktivierungsraten zweier Bestimmungen der gleichen Probe an zwei verschiedenen Ratten betragen bei 31 willkürlich ausgewählten Doppelbestimmungen im Mittel 3,9% der Mittelwerte beider Bestimmungen (0% bis 10%). Die Standardabweichung ist 3,1%. Inaktivierungsraten über 10% bzw. Differenzen zwischen verschiedenen Inaktivierungsraten über 10% sind daher als signifikant anzusehen.

Messung der Asparagin-Abspaltung aus α -L-Asparaginyll¹-Angiotensin II Amino-peptidase-Aktivität

Das Prinzip der von uns entwickelten Methode wurde in der vorstehenden Mitteilung (7) angegeben und ist bei (11) genauer beschrieben. Zum Vergleich der pH-Abhängigkeit der Amino-peptidase-Aktivität des Plasmas gegenüber H mit der pH-Abhängigkeit der biologischen Inaktivierung von H wurde in 0,05M Trismaleatpuffer, pH 5,2–pH 8,6 statt in 0,067M Natriumphosphatpuffer (11) 60 Min. inkubiert. Die Amino-peptidase-Aktivität (Abb. 2) ist hier nicht in IE//, sondern in Extinktions-Einheiten angegeben.

Ergebnisse

Vergleich der pH-Abhängigkeit der biologischen Inaktivierung von A und H durch menschliches Plasma (Abb. 1)

Für eine vergleichbare Inaktivierung muß A etwa 10 mal länger mit dem verdünnten Plasma inkubiert werden als H. Die Optima der Inaktivierung von A

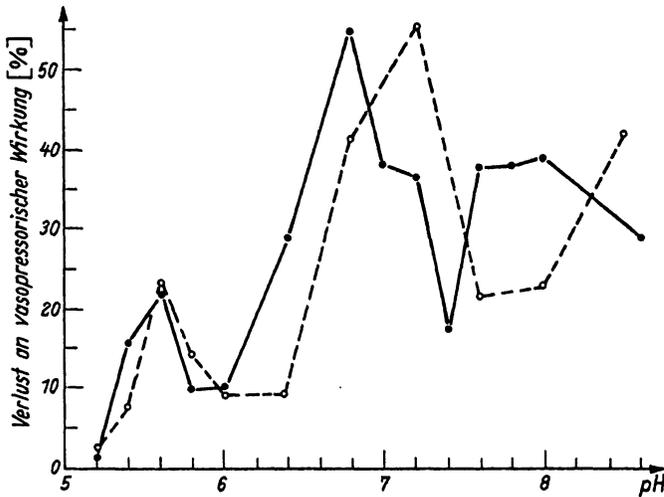


Abb. 1

Vergleich der biologischen Inaktivierung von A (—•—) und H (—○—) durch 1:10 verdünntes Plasma in Abhängigkeit vom pH des 0,04M Trismaleatpuffers. Inkubationsdauer mit Substrat H: 10 Min., mit Substrat A: 120 Min. Jeder Punkt entspricht einem Mittelwert von zwei Inkubationsserien

liegen bei pH 5,6, pH 6,8 und pH 7,6—8,0. Bei pH 6,8 ist die Inaktivierung absolut am größten. Die Optima der Inaktivierung von H liegen bei pH 5,6 und pH 7,2. Jenseits pH 8,0 wird eine weitere Zunahme der Inaktivierung von H beobachtet, deren Maximum in Trismaleatpuffer nicht ermittelt werden konnte. Die pH-Optima der Inaktivierung von A und H stimmen also im Sauren überein, während sich im Neutralbereich und im Alkalischen Unterschiede finden.

Vergleich der pH-Abhängigkeit der biologischen Inaktivierung von H mit der Spaltung von H durch Amino-peptidasen (Abb. 2)

In Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen der Bestimmung des pH-Optimum in Acetat- und Phosphat-

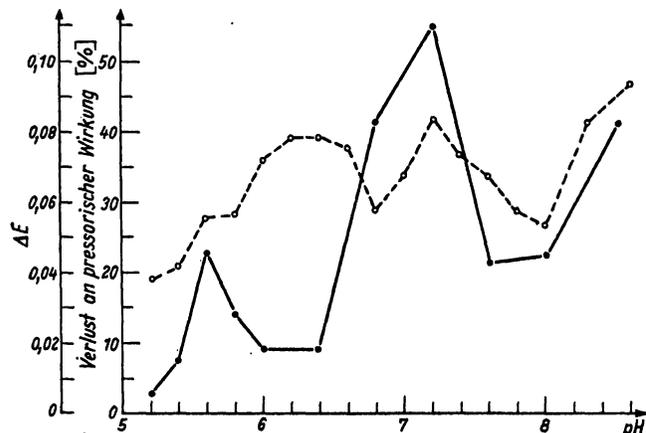


Abb. 2

Vergleich der biologischen Inaktivierung (% Verlust an pressorischer Wirkung) von H (—•—) mit der Geschwindigkeit der Asparagin-Abspaltung aus H (—○—) in Abhängigkeit vom pH des 0,04M Trismaleatpuffers. Die Amino-peptidase-Aktivität (Mittelwerte von zwei Inkubationsserien) ist in Extinktionseinheiten (366 nm) angegeben

puffer (11) fanden wir ein pH-Optimum der Amino-peptidase-Aktivität gegenüber H bei pH 6,2—6,4. Ein weiteres, nicht scharf gegen das vorige abgehobenes Optimum fanden wir in Übereinstimmung mit dem Optimum der biologischen Inaktivierung von H bei pH 7,4. Jenseits pH 8,0 nimmt die Amino-peptidase-Aktivität gegenüber H, ähnlich wie die biologische Inaktivierung, wieder zu.

Die Beeinflussung der biologischen Inaktivierung von A und H durch Ca⁺⁺ und Na₂ EDTA in Abhängigkeit vom pH (Abb. 3 und 4)

Na₂ EDTA (1 mM) hemmt die biologische Inaktivierung von A und H im Sauren (pH-Optimum 5,6) nahezu vollständig. Calcium, das in 1 mM Konzentration allein zugesetzt, den Abbau von A und H nicht signifikant verändert, hebt die EDTA-Hemmung bei Zugabe eines zweifachen Überschusses (3 mM Ca⁺⁺) nicht auf. Die geringfügige Inaktivierung von A und H um etwa 5% bei pH 5,6 in Gegenwart von Ca⁺⁺ und EDTA ist nicht signifikant. Im Neutralbereich hemmen 1 mM

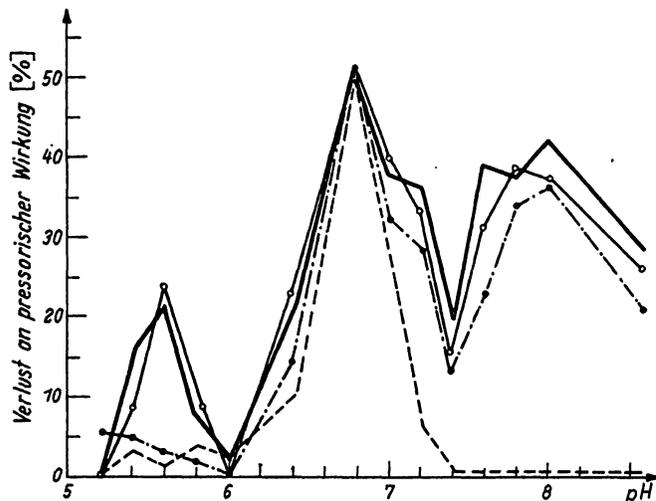


Abb. 3

Biologische Inaktivierung von A durch 1:10 verdünntes menschliches Plasma in Abhängigkeit vom pH des 0,04M Trismaleatpuffers ohne Zusatz von Affektoren (—), mit 1 mM Na₂ EDTA (---), mit 1 mM CaCl₂ (···) und mit 1 mM Na₂ EDTA + 3 mM CaCl₂ (-·-·-) Ergebnisse je einer Inkubationsserie. Inkubationszeit: 120 Min.

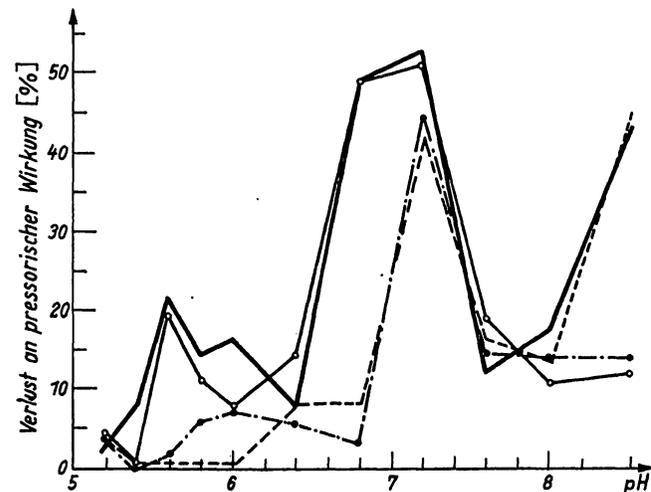


Abb. 4

Biologische Inaktivierung von H durch 1:10 verdünntes menschliches Plasma mit und ohne Affektoren. Zeichenerklärung siehe Abbildung 3. Inkubationszeit: 10 Min.

EDTA die biologische Inaktivierung von A und H nicht signifikant. Auch Ca^{++} allein und EDTA + Ca^{++} beeinflussen die Inaktivierung von A und H nicht bemerkenswert.

Deutliche Unterschiede zwischen A und H finden sich im Alkalischen. EDTA (1 mM) hemmt die Inaktivierung von A vollständig. Ca^{++} (bei 1 mM Konzentration allein wirkungslos) hebt die EDTA-Hemmung mit 3 mM Konzentration vollständig auf. Die biologische Inaktivierung von H wird erst ab pH 8,0 durch EDTA teilweise gehemmt. Ca^{++} hebt die EDTA-Hemmung nicht auf.

Hemmung der biologischen Inaktivierung von A und H durch Dialyse von Plasma gegen 0,9proz. Kochsalzlösung und EDTA-Lösung und Reaktivierung durch zweiwertige Metallionen (Tab. 1)

Dialyse von Plasma gegen 0,9proz. NaCl-Lösung hemmt die biologische Inaktivierung von A und H im Sauren vollständig. Im Neutralen und im Alkalischen wird die biologische Inaktivierung von A und H partiell gehemmt.

10 mM EDTA hemmt die biologische Inaktivierung von A in allen pH-Bereichen vollständig. Die Inaktivierung von H wird im Sauren total, im neutralen und im alkalischen Bereich subtotal gehemmt.

Ca^{++} (2,5 mM) hebt die Hemmung der biologischen Inaktivierung von A durch EDTA-Dialyse in allen pH-Bereichen auf. 0,25 mM Ca^{++} reaktiviert bei pH 6,8

und pH 8,0 total, bei pH 5,6 partiell. Dagegen hat Ca^{++} auf die Hemmung der biologischen Inaktivierung von A durch EDTA-Dialyse bei pH 5,6 keinen Einfluß, während 0,25 mM Ca^{++} bei pH 7,2 und pH 8,6 total reaktivieren.

Mg^{++} (0,1 mM) reaktiviert die biologische Inaktivierung von A nur bei pH 8,0, die von H nur bei pH 7,2. In allen anderen pH-Bereichen tritt keine Reaktivierung ein.

Zn^{++} reaktiviert die biologische Inaktivierung von A bei pH 5,6 und pH 8,0 schon in sehr kleinen Konzentrationen (5 bis 50 μM) während bei pH 6,8 keine Reaktivierung eintritt. Höhere Zn^{++} -Konzentrationen (0,5 mM) reaktivieren bei pH 5,6 und pH 8,0 nur partiell. Wahrscheinlich tritt hier bereits eine Hemmung der reaktivierten Enzyme ein, die wir auch bei Anwendung noch höherer Zn^{++} -Konzentrationen in Vorversuchen beobachten konnten.

Mn^{++} (10 bis 100 μM) reaktiviert nur die biologische Inaktivierung von H bei pH 7,2 total. Die Reaktivierung des Abbaues von A bei pH 8,0 (15% Inaktivierung) kann nicht als gesichert gelten, da der Fehler der Angiotensin-Bestimmung an der Ratte in Mn-haltigen Lösungen etwas größer war als bei der Testung anderer Metallionen-haltiger Lösungen, die keine Änderung der Genauigkeit des biologischen Tests bedingten.

Co^{++} reaktiviert bei Konzentrationen von 1 bis 100 μM die biologische Inaktivierung von A bei pH 6,8 und pH 8,0 und die von H bei pH 7,2 total. In anderen pH-Bereichen ist Co^{++} wirkungslos.

Dreitägige Dialyse von Plasma gegen 1 mM EDTA hemmt die biologische Inaktivierung von A und H bei pH 5,6 total. In den anderen pH-Bereichen tritt nur partielle Hemmung ein. Reaktivierungsversuche mit zweiwertigen Kationen hatten sinngemäß die gleichen Ergebnisse wie nach Dialyse des Plasmas gegen 10 mM EDTA-Lösung. Die Genauigkeit der Reaktivierungsversuche ist wegen der nur partiellen Hemmung der Angiotensinase im neutralen und alkalischen Bereich allerdings geringer. Die Ergebnisse werden deshalb nicht im einzelnen dargestellt.

Tab. 1

Biologische Inaktivierung von A und H bei verschiedenen pH-Werten nach Dialyse gegen 0,9proz. NaCl-Lösung bzw. gegen 10 mM Na_2EDTA -Lösung. Reaktivierbarkeit der Angiotensin-abbauenden Enzyme nach Dialyse gegen Na_2EDTA durch divalente Kationen in verschiedenen Konzentrationen (angegeben als Endkonzentration in 1:10 verd. Plasma). Zahlen: Prozent Verlust an pressorischer Wirkung. — partielle Hemmung. — totale Hemmung. + partielle Reaktivierung. ++ totale Reaktivierung. O keine Reaktivierung

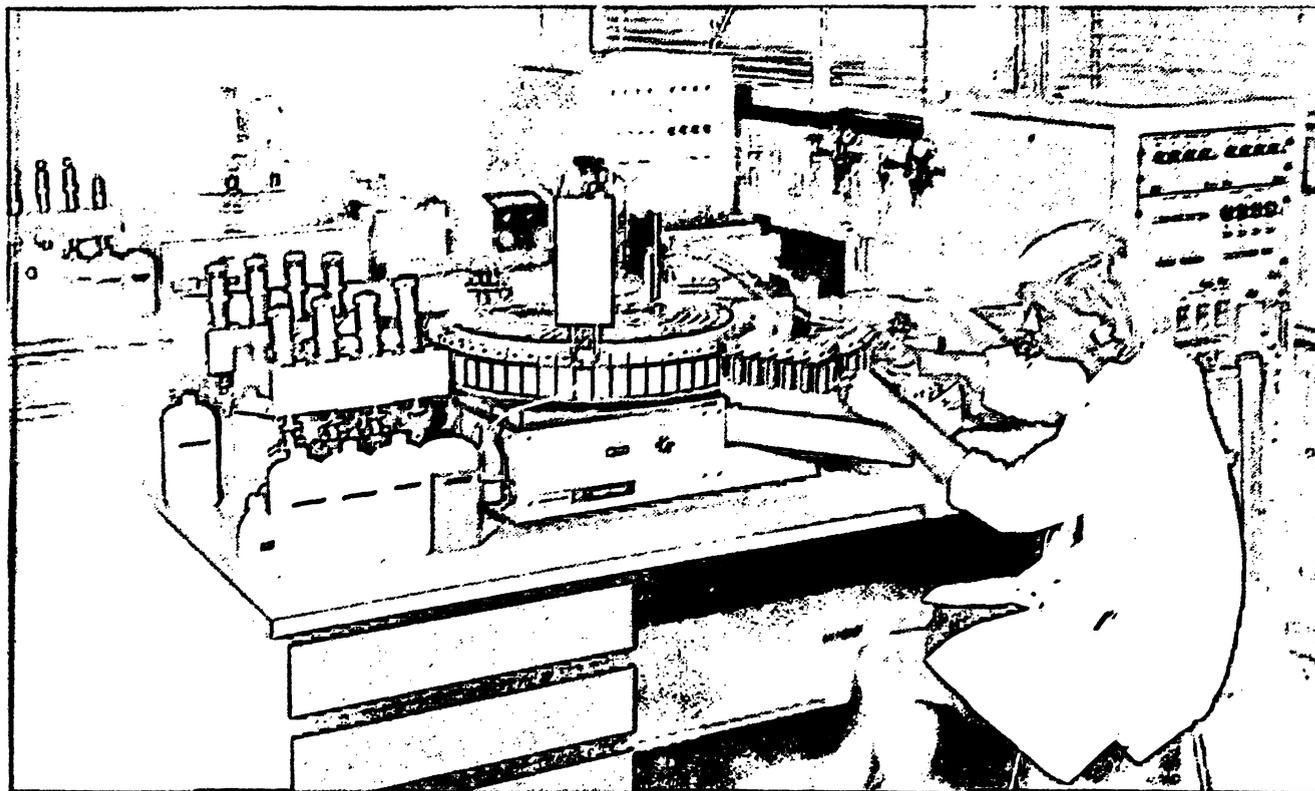
Substrat	α -L-Aspartyl ¹ - Angiotensin II (A)			α -L-Asparaginy ¹ - Angiotensin II (H)		
pH	5,6	6,8	8,0	5,6	7,2	8,6
Inkubationszeit (Min.)	720	180	180	60	15	15
Plasma 1:10 verdünnt	47	48	50	39	53	45
Nach Dialyse gegen 0,9proz. NaCl	0	21	25	0	25	23
Nach Dialyse gegen 0,01M Na_2EDTA	0	0	0	0	15	12
Nach anschließender Reaktivierung mit 0,25 mM Ca^{++}	22	44	50	0	58	50
2,5 mM Ca^{++}	+	++	++	O	++	++
0,1 mM Mg^{++}	47	45	50	0	56	50
1 mM Mg^{++}	++	++	++	O	++	++
5 μM Zn^{++}	1	0	44	0	53	0
50 μM Zn^{++}	O	O	++	O	++	O
500 μM Zn^{++}	0	5	45	0	50	5
10 μM Mn^{++}	0	0	++	O	++	O
100 μM Mn^{++}	35	5	36	/	40	24
1 μM Co^{++}	+	O	+		+	(+)
100 μM Co^{++}	45	6	45	33	41	45
	++	O	++	++	+	++
	38	5	33	38	25	0
	+	O	+	++	+	O
	0	7	9	0	41	0
	O	O	O	O	+	O
	5	7	15	0	50	0
	O	O	(O)	O	++	O
	7	30	33	0	46	0
	O	+	+	O	++	O
	11	47	50	4	46	5
	(O)	++	++	O	++	O

Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, daß sowohl A als auch H durch mindestens drei Enzyme des menschlichen Plasmas mit verschiedenen pH-Optima inaktiviert werden. Das jeweilige Wirkungsmaximum liegt im Neutralbereich, doch sind die pH-Optima der A- und H-spaltenden Enzyme um 0,4 pH-Einheiten voneinander verschieden. Die pH-Optima der biologischen Inaktivierung von A und H im Sauren sind identisch. Im schwach Alkalischen ergeben sich erneut Unterschiede. Das pH-Optimum der Inaktivierung von A liegt bei pH 7,6 bis 8,0, das von H weiter im Alkalischen. Die pH-Optima der Freisetzung von Asparagin aus H bei Substratsättigung liegen bei pH 6,2—6,4 und bei pH 7,2. Nur das Aktivitätsmaximum bei pH 7,2 und die erneute Zunahme der Asparagin-Abspaltung im Alkalischen

PERKIN-ELMER

GERÄTE FÜR DIE KLINISCHE CHEMIE



Der **PERKIN-ELMER ANALYSEAUTOMAT C4** ist ein Vierkanalgerät mit automatischem Ablauf aller Arbeitsgänge vom Dosieren der Probe über die Reagenz-Zuführung, das Durchführen der Reaktion, das Photometrieren bis zur Auswertung der Messung und dem digitalen Ausdrucken des Ergebnisses. Neben der Automation dieser Arbeitsgänge sind die systembedingte hohe Reproduzierbarkeit und eine direkte, positive Ergebnisidentifizierung hervorstechende Merkmale des Analysenautomaten C4.

Das Analyseergebnis wird in Konzentrationseinheiten ausgedruckt. Durch den Wegfall jeglicher Rechenarbeit bei der Auswertung ergibt sich eine Sicherheit, die bei den bisher üblichen Verfahren unbekannt war.

Beim Analysenautomaten C4 wird jede Probe in individuelle Reaktionsgefäße dosiert. Der Proben- und Reagenzienbedarf ist minimal.

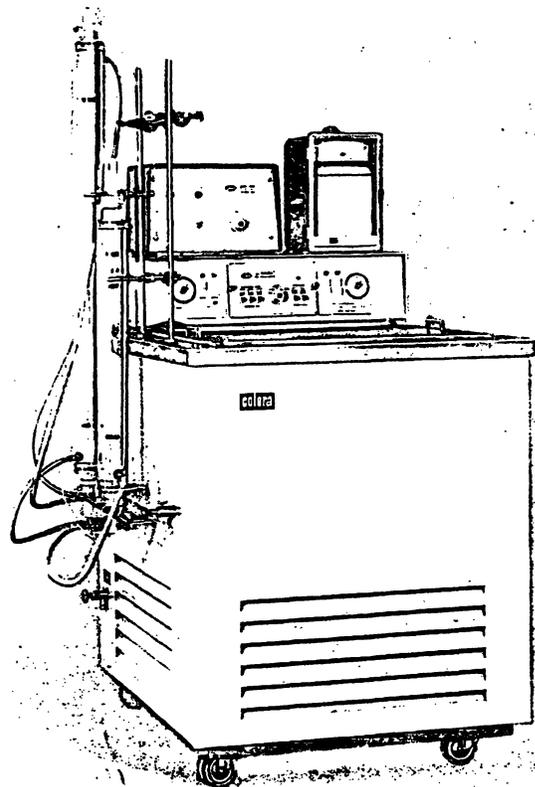
Die Messung wird unter optimalen Bedingungen mit einem Gitterspektrophotometer durchgeführt.

In kontinuierlichem Betrieb sind bis zu 120 Analysen je Stunde möglich. Durch die vier voneinander unabhängigen Kanäle können bis zu vier verschiedene Bestimmungen gleichzeitig aus einer Probe durchgeführt werden. Thermostatisierung in der Reaktionszeit, vollständiger Reaktionsablauf vor dem Photometrieren und direkte Messung gegen einen „Analysenleerwert“ für jede Probe gewährleisten eine hohe Genauigkeit und Reproduzierbarkeit. Das Umrüsten auf andere Analysenarten ist unproblematisch und kann rasch durchgeführt werden.

Weitere PERKIN-ELMER-Geräte für die klinische Chemie: Spektrophotometer für den UV-, Sichtbar- und IR-Bereich, Fluoreszenzspektrophotometer, Atom-Absorptions-Spektrophotometer, Gas-Chromatographen, Polarimeter und Massen-Spektrometer.

BODENSEEWERK PERKIN-ELMER & CO GMBH/ÜBERLINGEN

Abt. Klinische Chemie - Vertrieb - 6 Frankfurt/Main, Schöne Aussicht 16, Telefon (06 11) 28 34 87 und 29 18 85



Colora-Kühlgerät für die Chromatographie

Ermöglicht automatische Kühlung während der Trennung und Analyse. Große Kühltruhe zur Aufnahme von LKB-Fraktionensammler UltraRac, Durchflußanalysator Uvicord, Peristaltikpumpe nebst Zubehör. Separates Flüssigkeitsumlauf-Kühlsystem für die Trennsäulen. Temperaturkonstanz $\pm 1^\circ\text{C}$ in Kühlraum und Kühlsole.

Colora Messtechnik GmbH
7073 Lorch/Württ., Postfach 5
T (07172) 6041, FS 07-248 886

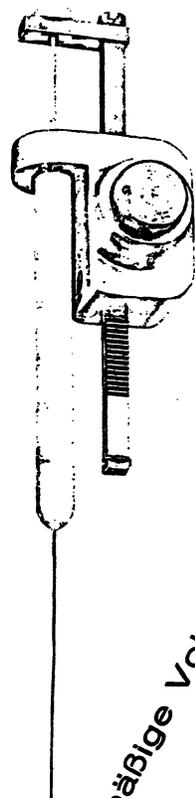
Technische Büros (Verkauf und Kundendienst):
 1000 Berlin 30, Kurfürstenstraße 84, T 13 52 00
 2000 Hamburg 19, Osterstraße 63, T 40 06 06
 3000 Hannover, An der Tiefenriede 45, T 88 45 00
 4000 Düsseldorf, Kronprinzenstr. 62, T 1 78 60, FS 08-587 253
 6000 Frankfurt a. M., Liebigstr. 24, T 72 96 13, FS 04-11 216
 8000 München 2, Dachauer Straße 175, T 516 98 58

colora

HAMILTON

für Präzision
 und Qualität

PB-600
 Dosiervorrichtung



Serienmäßige Volumendosierung



Aliquanten-Dosiergerät
 für Mikromengen

Generalagentur für Europa:

MICROMESURE N.V.

Postfach 205 DEN HAAG Holland

Autorisierter Händler für die BRD:
GÜNTHER SCHMIDT
 2 Hamburg 68 Postfach 680104

Bezirksvertretungen:

Aachen:	Fa. Ludwig Mohren OHG
Berlin:	Fa. K. Marggraf
Bonn:	Fa. C. Gerhardt
Bremen:	Fa. H. Jürgens & Co.
Frankfurt:	Fa. Willi Fischer & Co.
Freiburg:	Fa. Bender & Hobein
Göttingen:	Fa. Bodo Schmidt
Hannover:	Fa. H. Jürgens & Co.
Karlsruhe:	Fa. Bender & Hobein
Kiel:	Fa. Erich Eydam
München:	Fa. Bender & Hobein
Münster:	Fa. H. Jürgens & Co.

korrespondieren mit der pH-Abhängigkeit der biologischen Inaktivierung von H. Das Maximum der Asparagin-Abspaltung bei pH 6,2—6,4 könnte einem Enzym mit geringer Substrataffinität entsprechen, das bei wesentlich kleineren Substratkonzentrationen, wie sie für die Messung der biologischen Inaktivierung verwendet werden, nur wenig Substrat umsetzt. Das bei pH 5,6 beobachtete pH-Optimum der biologischen Inaktivierung fehlt dagegen in der pH-Optimum-Kurve der Aminopeptidase-Aktivität. Dieser Befund könnte die Vermutung von KHAIRALLAH und Mitarbeiter (6) stützen, daß die „saure Angiotensinase“, über die schon PICKENS und Mitarbeiter (10) berichteten, eine Endopeptidase ist. PICKENS und Mitarbeiter (10) und KHAIRALLAH und Mitarbeiter (6) fanden, daß die Angiotensinase-Aktivität in diesem Bereich mit Diisopropylfluorophosphat hemmbar ist. Sie schlossen daraus auf eine dem Chymotrypsin ähnliche Wirkungsweise. KHAIRALLAH und Mitarbeiter (6) konnten die „saure ATase“ kürzlich durch Ammoniumsulfatfraktionierung und Chromatographie über Sephadex G-75 von der Angiotensinase A trennen. Sie fanden ihr Wirkungsoptimum zwischen pH 5,8 und 6,0. Das Enzym spaltet sowohl A als auch H, letzteres doppelt so schnell wie A. Aber auch Angiotensin-Analoga wie β -Aspartyl¹-Angiotensin II und Succinyl¹-Angiotensin II, die von der Angiotensinase A nicht angegriffen werden, kann das Enzym inaktivieren. KHAIRALLAH und Mitarbeiter (6) fanden, daß das Enzym durch Dialyse gegen EDTA inaktiviert und durch Ca⁺⁺, Mn⁺⁺, Mg⁺⁺ und Co⁺⁺ nicht reaktiviert wird. Sie schlossen daraus, daß die Inaktivierung durch EDTA nicht durch Chelatbildung mit einem metallischen Cofaktor, sondern durch Denaturierung des Enzyms bedingt sei. Offenbar haben KHAIRALLAH und Mitarbeiter (6) ihre Reaktivierungsversuche nur mit dem Substrat H durchgeführt. Ihre Befunde stimmen dann mit unseren vollkommen überein (siehe Tab. 1). Das von KHAIRALLAH und Mitarbeiter als potentieller Reaktivator nicht getestete Zn⁺⁺ vermag jedoch die EDTA-Hemmung schon in sehr kleinen Konzentrationen vollständig aufzuheben (Tab. 1). Die Hemmung des Abbaues von A durch EDTA bei pH 5,6 wird dagegen sowohl durch Zn⁺⁺ als auch durch Ca⁺⁺ aufgehoben. Da die Stabilitätskonstante des EDTA-Calcium-Chelates bei pH 5,6 wesentlich kleiner ist als im Neutralbereich (13), und da die „saure ATase“ schon durch Dialyse gegen 0,9proz. NaCl-Lösung bzw. durch Zusatz kleiner EDTA-Konzentrationen zum Reaktionsgemisch (Abb. 3 und 4) gehemmt wird, ist es unwahrscheinlich, daß Ca⁺⁺ der natürliche Cofaktor der A-spaltenden „sauren ATase“ ist. Die Stabilität des EDTA-Zink-Chelates ist um etwa fünf Zehnerpotenzen größer als die des EDTA-Calcium-Chelates (13). Daher ist es wahrscheinlich, daß Zn⁺⁺ oder ein Metallion mit ähnlicher Affinität zu EDTA der natürliche Aktivator der „sauren ATase“ ist. Die Inaktivierbarkeit des Enzyms durch Dialyse gegen 0,9proz. NaCl-Lösung spricht außerdem gegen eine feste Bindung dieses Metallions an das Enzymprotein. Aus der

Aktivierbarkeit der A-spaltenden Enzymaktivität durch Ca⁺⁺ kann der Schluß gezogen werden, daß die „saure ATase“ aus zwei Enzymen besteht, die einerseits H (und A?), andererseits nur A inaktivieren.

Bei den „neutralen ATasen“ findet sich weitgehende Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen von KHAIRALLAH und Mitarbeiter (6) und den unseren. KHAIRALLAH und Mitarbeiter konnten die durch Ammoniumsulfatfraktionierung von der „sauren ATase“ (Angiotensinase B) getrennte Angiotensinase A (5; 6) durch weitere Fraktionierung in zwei Enzyme auftrennen, deren eines (Angiotensinase A 1) nur H inaktiviert, während die Angiotensinase A 2, die bei 2,35M (NH₄)₂SO₄-Konzentration präzipitiert, nur A inaktiviert. Beide werden durch Dialyse gegen EDTA (3 mM) vollständig gehemmt und durch Ca⁺⁺ reaktiviert. Das pH-Optimum der ATase A 1 liegt bei pH 7,4, das der ATase 2 bei pH 6,8. Die von uns gefundenen unterschiedlichen pH-Optima der Inaktivierung von A und H im neutralen Bereich sind also nicht, was man vermuten könnte, durch methodische Ungenauigkeit bedingt, sondern zeigen die Existenz zweier Enzyme an. Unterschiede finden sich auch in der Reaktivierbarkeit der nur durch höhere EDTA-Konzentrationen hemmbaren Enzyme (Abb. 3 und 4, Tab. 1) mit zweiwertigen Kationen. Während die durch EDTA gehemmte Spaltung von A bei pH 6,8 nur durch Ca⁺⁺ und Co⁺⁺ reaktiviert wird, wird die von H bei pH 7,2 durch Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺ und Co⁺⁺ reaktiviert. Hier ergeben sich andererseits Unterschiede gegenüber den Befunden von KHAIRALLAH und Mitarbeitern (6), die eine totale Reaktivierung des durch EDTA gehemmten Komplexes Angiotensinase A nur mit 1 mM Ca⁺⁺ und eine partielle mit 1 mM Mn⁺⁺ und Co⁺⁺ fanden. 1 mM Mg⁺⁺ war unwirksam. Die Autoren geben allerdings nicht an, mit welchem Substrat (A oder H) diese Untersuchungen durchgeführt wurden. Manche Unterschiede zwischen unseren Ergebnissen und denen von KHAIRALLAH und Mitarbeitern (6) könnten aber durch unterschiedliche Konzentrationen der Metallionen erklärt werden. Wir haben in Vorversuchen gefunden, daß bereits 0,5 mM Mn⁺⁺ oder Co⁺⁺ die neutralen ATasen partiell hemmen können, während kleinere Konzentrationen total reaktivierten. Diese partielle Hemmung kann, wenn nur eine Metallionkonzentration geprüft wird, auch als partielle Reaktivierung interpretiert werden.

Die im schwach alkalischen Bereich A und H inaktivierenden Enzyme sind hinsichtlich ihrer pH-Abhängigkeit und Reaktivierbarkeit durch Metallionen nach Dialyse gegen EDTA eindeutig unterschieden. Die H-inaktivierende Enzymaktivität oberhalb pH 8,0 ist erst mit höheren EDTA-Konzentrationen als das A-spaltende Enzym (pH-Optimum 7,6—8,0) hemmbar (Abb. 3 und 4, Tab. 1). Es wird durch Ca⁺⁺ und Zn⁺⁺ reaktiviert, während das A-spaltende Enzym durch Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Zn⁺⁺ und Co⁺⁺ total reaktiviert wird. Auch in diesem Bereich können unsere Untersuchungen eine Beteiligung mehrerer Enzyme an der Inaktivierung des jeweiligen Substrats nicht ausschließen. Der Vergleich

der pH-Abhängigkeit der biologischen Inaktivierung von H und der Asparagin-Abspaltung aus H (Abb. 2) läßt den Schluß zu, daß die „neutrale“ und die „alkalische“ H-spaltende ATase Aminopeptidasen sind.

Unsere Ergebnisse und die von KHAIRALLAH und Mitarbeitern (6) bestätigen einander in vieler Hinsicht. Widersprüche können zum Teil durch unterschiedliche Versuchsanordnungen erklärt werden. Die Heterogenität

der „Angiotensinasen“ ist bemerkenswert. Sie sollte bei zukünftigen Untersuchungen mehr berücksichtigt werden.

Wir danken Herrn Prof. Dr. F. GROSS von der CIBA-AG in Basel für die freundliche Überlassung von α -L-Angiotensin II und α -L-Angiotensin II-Amid.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

Literatur

1. REGOLI, D., B. RINIKER und H. BRUNNER, *Biochem. Pharmacol.* **12**, 637 (1963). — 2. NAGATSU, I., L. GILLESPIE, J. E. FOLK und G. G. GLENNER, *Biochem. Pharmacol.* **14**, 721 (1965). — 3. NAGATSU, I., L. GILLESPIE, J. M. GEORGE, J. E. FOLK und G. G. GLENNER, *Biochem. Pharmacol.* **14**, 853 (1965). — 4. GLENNER, G. G., P. J. McMILLAN und J. E. FOLK, *A Nature (London)* **194**, 867 (1962). — 5. KHAIRALLAH, P. A., F. M. BUMPUS, I. H. PAGE und R. R. SMEBY, *Science Washington* **140**, 672 (1963). — 6. KHAIRALLAH, P. A. und I. H. PAGE, *Biochemical Medicine* **1**, 1 (1967). — 7. v. GOLDACKER, I. U. und W. OELKERS, *diese Z.* **7**, 250 (1969) vorstehend. — 8. HELMER, O. M. und W. E. JUDSON, *Circulation* **27**, 1050 (1963). — 9. BROWN, J. J., D. L. DAVIES, A. F. LEVER, J. I. S. ROBERTSON und M. TREE, *Biochem. J.* **93**, 594 (1964). — 10. PICKENS, P. T., F. M. BUMPUS, A. M. LLOYD, R. R. SMEBY und I. H. PAGE, *Circul. Res.* **17**, 438 (1965). — 11. OELKERS, W. und I. U. v. GOLDACKER, *Klin. Wschr.* **45**, 649 (1967). — 12. HICKLER, R. B., D. P. LAULER und G. W. THORN, *J. Clin. Invest.* **42**, 635 (1963). — 13. CHABAREK, S. und A. E. MARTELL, *Organic Sequestering Agents*, P. 588. John Wiley & Sons, Inc. Publ., New York (1959).

cand. med. M. Zwanzig und Dr. med. W. Oelkers
II. Medizinische Klinik und Poliklinik
1 Berlin 45
Hindenburg-Damm 30