

A group of 6 infected guinea-pigs was given isoniazid solution (0.005%) in lieu of drinking water from the 8th to the 38th day postinfection. Tuberculous animals were decapitated between the 3rd and the 4th week post-infection, whereas isoniazid-treated animals were sacrificed after 30 days of drug therapy. The kidneys were promptly removed and homogenates were prepared as described earlier⁴. The tissue concentration was adjusted to 200 mg/ml of homogenate with the aid of biuret reaction⁹. The glucose-6-phosphatase activity was determined by the phosphate release method of SWANSON¹⁰ by adding 0.1 ml of kidney homogenates in the incubation mixture. Phosphorus was determined by the method of TAUSSKY and SHORR¹¹.

In the present studies, the assay of glucose-6-phosphatase was performed in the kidney homogenate since this organ did not show any gross tuberculous lesions. The results obtained on glucose-6-phosphatase activity are reported in the Table. A small but significant rise ($p < 0.025$) in the enzyme activity of kidney homogenates of tuberculous animals as compared to those of control animals was observed. Administration of isoniazid for 30 days did not significantly lower the elevated glucose-6-phosphatase activity. In the previous findings we have reported that infection with *M. tuberculosis* caused drastic effects on the metabolism of the host tissues¹⁻⁵. Some enzymes, particularly those dependent on NAD and NADP for their activities, are more easily deranged during the progressive infection^{3,4,12}. The increased

glucose-6-phosphatase activity in the kidney homogenate of tuberculous animals, as reported here, may be due to enzyme adaptation since several studies have shown that a decrease in liver glycogen causes a marked adaptive increase in glucose-6-phosphatase activity^{7,13,14}. Unlike its influence on various enzymes reported previously²⁻⁴, the isoniazid therapy on tuberculous animals for 30 days was ineffective in lowering the glucose-6-phosphatase activity indicating that the elevated activity was secondary to tuberculous infection. This supports the view of adaptive increase in enzyme level as a result of decreased glycogen content.

Zusammenfassung. Bei den tuberkulösen Meerschweinchen wurde in der Niere eine erhöhte Aktivität der Glukose-6-Phosphatase beobachtet. Isoniazid hat die erhöhte Aktivität des Enzyms nicht erniedrigt, wenn es tuberkulösen Tieren vom 8. bis zum 38. Tage nach der Infektion oral verabreicht wurde. Es wird angenommen, dass die erhöhte Aktivität Ausdruck der Adoptionsfähigkeit von Glukose-6-Phosphatase ist.

NANDKUMAR S. SHAH¹⁵, L. E. FOX,
and S. P. MARTIN

Departments of Medicine and Pharmacology, Colleges of Medicine and Pharmacy, University of Florida, Gainesville (Florida, USA), May 31, 1966.

	No. of animals	μM of phosphate liberated/100 mg of tissue in 15 min (mean \pm S.E.)	% increase
Control	10	6.08 \pm 0.15	—
Tuberculous	6	8.30 \pm 0.18	36.5
Tuberculous animals given isoniazid	6	7.66 \pm 0.12	26.0

⁹ Q. Z. HUSSAIN, N. S. SHAH, and S. N. CHAUDHURI, Clin. Chim. Acta 6, 447 (1961).

¹⁰ M. A. SWANSON, in: *Methods in Enzymology* (Eds., S. P. COLOWICK and N. O. KAPLAN; Academic Press Inc., New York 1955), vol. 2, p. 541.

¹¹ H. H. TAUSSKY and E. SHORR, J. biol. Chem. 202, 675 (1953).

¹² A. BEKIERKUNST and M. ARTMAN, Am. Rev. resp. Dis. 86, 832 (1962).

¹³ R. A. FREEDLAND and A. E. HARPER, J. biol. Chem. 228, 743 (1957).

¹⁴ R. A. FREEDLAND and A. E. HARPER, J. biol. Chem. 230, 833 (1958).

¹⁵ Galesburg State Research Hospital, Galesburg, Illinois, USA.

Strukturspezifischer Abbau von Polypeptid-Metall-Komplexen III¹. Abbau des Ni²⁺-Angiotensin II-Komplexes durch H₂O₂²

Der Abbau des Cu²⁺-Komplexes des cyclischen Dekapeptides Polymyxin B durch H₂O₂ wird, wie wir gezeigt haben¹, vom Metallion gesteuert (vgl. auch³), wobei diese Reaktionen – dasselbe gilt für den entsprechenden Ni²⁺-Komplex⁴ – über ternäre Komplexe verlaufen⁵.

Um zu prüfen, ob eine derartige Degradation nicht nur bei einem cyclischen Peptid – dessen Komplex strukturmäßig eine Sonderstellung einnimmt –, sondern auch bei linearen Peptiden auftritt, untersuchten wir den Abbau von Val⁵-Angiotensin II-Asp¹-β-amid⁶. Dieses lineare Oktapeptid besitzt folgende Aminosäuresequenz⁷ (vgl. auch⁸):



Wir untersuchten – ähnlich wie beim Polymyxin B^{5,9} – auch beim Angiotensin II zuerst die katalytische Aktivi-

¹ II. Mitteilung: H. ERLENMEYER, H. SIGEL, H. CH. CURTIUS und P. ANDERS, Helv. chim. Acta 49, 19 (1966).

² 10. Mitteilung über Metallionen und H₂O₂; 9. Mitteilung: S. PETRI, H. SIGEL und H. ERLENMEYER, Helv. chim. Acta 49, 1778 (1966).

³ H. SIGEL und H. ERLENMEYER, Helv. chim. Acta 49, 1266 (1966).

⁴ H. ERLENMEYER, H. CH. CURTIUS, P. ANDERS, R. ZELL und H. SIGEL, im Druck; vorläufige Mitteilung: H. ERLENMEYER, H. BRINTZINGER, H. SIGEL und H. CH. CURTIUS, Experientia 21, 371 (1965).

⁵ H. ERLENMEYER, U. MÜLLER und H. SIGEL, Helv. chim. Acta 49, 681 (1966).

⁶ Im folgenden kurz Angiotensin II genannt; alle acht Aminosäuren besitzen L-Konfiguration.

⁷ R. SCHWYZER, B. ISELIN, H. KAPPeler, B. RINKER, W. RITTEL und H. ZUBER, Helv. chim. Acta 41, 1287 (1958).

⁸ G. R. MARSHALL und R. B. MERRIFIELD, Biochemistry 4, 2394 (1965).

⁹ R. ZELL und H. SIGEL, Helv. chim. Acta 49, 870 (1966).

tät des Cu^{2+} - bzw. Ni^{2+} -1:1-Komplexes^{10,11}, indem wir die Anfangsgeschwindigkeitskonstante k des H_2O_2 -Zerfalls pseudo-erster Ordnung in bezug auf H_2O_2 bestimmten¹². Hierbei trat nun der interessante Fall auf, dass wohl der Ni^{2+} -Komplex, nicht aber der Cu^{2+} -Komplex eine katalytische Aktivität zeigte (Figur 1), obwohl in der Regel Cu^{2+} -Komplexe (vgl. zum Beispiel Polymyxin, Figur 1) eine sehr viel grössere Aktivität aufweisen als Ni^{2+} -Komplexe^{9,12}.

Die Voraussetzung für die Katalyse des H_2O_2 -Zerfalls durch einen Metallkomplex ist, wie wir bereits früher gezeigt haben^{12,13}, dass dieser freie Koordinationsstellen aufweist, die die Ausbildung eines ternären Peroxokomplexes gestatten. Der obige Befund ist damit wohl so zu

erklären, dass das vier Koordinationsstellen aufweisende Cu^{2+} im Angiotensin II-Komplex so besetzt ist, dass der «aktive» Zwischenkomplex¹² nicht gebildet werden kann, weshalb dieses System katalytisch inaktiv ist. Beim Komplex des Ni^{2+} mit der Koordinationszahl 6 (vgl. auch⁹) ist offenbar diese Bedingung erfüllt, wodurch die katalytische Aktivität dieses Komplexes verständlich wird.

Bei den Degradations-Versuchen fügten wir zu $3 \cdot 10^{-3}$ mM des Me^{2+} und $3 \cdot 10^{-3}$ mM des Angiotensin II – gelöst in 5 ml Wasser – $1,8 \cdot 10^{-2}$ mM H_2O_2 und unterbrachen die Reaktion nach zweistündigem Stehen mit $1,2 \cdot 10^{-2}$ mM EDTA¹⁴. Bei der dünnenschichtchromatographischen¹⁵ bzw. besonders deutlich bei der hochspannungselektrophoretischen Untersuchung (Figur 2) zeigte sich, dass unter diesen Bedingungen offenbar nur der Ni^{2+} -Angiotensin II-Komplex abgebaut wird¹⁶.

Interessant ist, dass nur derjenige Angiotensin II-Komplex abgebaut wird, der auch katalytisch aktiv ist. Dies weist auf eine enge Kopplung zwischen katalytischer Aktivität und «Zerstörung» des Liganden hin¹⁷. Diese Beobachtung stimmt überein mit den früheren Befunden, wonach im Falle des Polymyxin B, wo beide untersuchten Me^{2+} -Komplexe katalytisch aktiv sind (Figur 1), auch beide durch H_2O_2 abgebaut werden^{1,4}.

Die Untersuchung der Aminosäuresequenz der Spaltstücke des Ni^{2+} -Angiotensin II-Komplexes ist im Gang¹⁸.

Summary. The octapeptide Val⁵-Angiotensin II-Asp¹- β -amide⁷ is split into characteristic fragments by hydrogen peroxide, when complexed with Ni^{2+} ; this degradation does not occur with the Cu^{2+} complex, presumably because an 'active' ternary peroxy complex cannot be formed^{3,5,12}.

H. SIGEL und H. CH. CURTIUS

Institut für Anorganische Chemie der Universität Basel und
Chemisches Laboratorium der Universitäts-Kinderklinik,
Zürich (Schweiz), 15. Juli 1966.

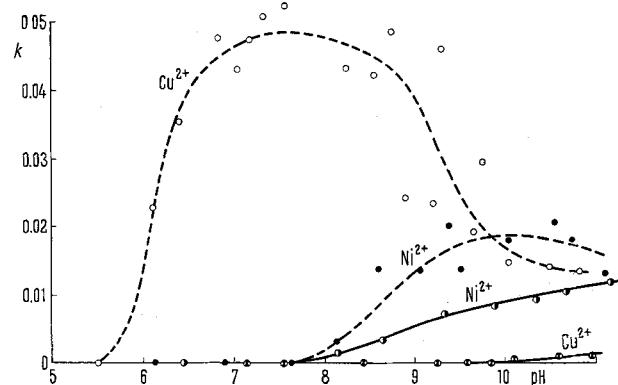


Fig. 1. Katalytische Aktivität, bestimmt als Anfangsgeschwindigkeitskonstante k des H_2O_2 -Zerfalls, gemessen¹² als Reaktion pseudo-erster Ordnung in bezug auf H_2O_2 ($8 \cdot 10^{-3}$ M) in Abhängigkeit vom pH für die Cu^{2+} - bzw. Ni^{2+} -1:1-Komplexe ($4 \cdot 10^{-4}$ M) von Angiotensin II (durchgezogene Linien) und Polymyxin B^{5,9} (gestrichelte Linien).

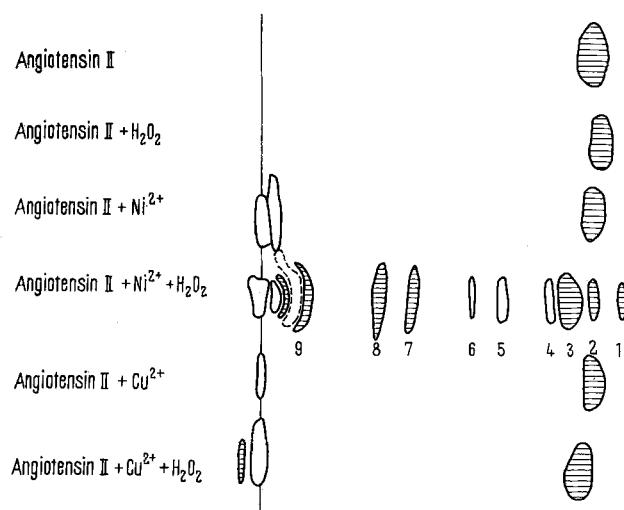


Fig. 2. Hochspannungselektrophoretischer Nachweis der Degradation des Ni^{2+} -Angiotensin II-Komplexes mittels H_2O_2 ; nicht abgebaut wird der entsprechende Cu^{2+} -Komplex. Zum Vergleich wurden mit aufgetragen die Ni^{2+} - bzw. Cu^{2+} -Komplexe ohne Zusatz von H_2O_2 , sowie Angiotensin II mit H_2O_2 und Angiotensin II allein. Bei den nicht numerierten Banden links handelt es sich wohl um die Metallionen sowie EDTA. (Bedingungen: pH 1,9; 4000 Volt; 70 mAmp.).

¹⁰ Dass eine Komplexbildung zwischen Angiotensin II und Cu^{2+} bzw. Ni^{2+} stattfindet, zeigt sich bei der Titration eines 1:1-Ansatzes am Freiwerden von Protonen, sowie an der Farbänderung; Cu^{2+} : pH > ca. 8 blauviolett; Ni^{2+} : pH > ca. 9 gelb⁹.

¹¹ Ein solcher liegt hier sicher vor¹⁰; allgemein ist jedoch bei solchen Versuchen zu bedenken, dass über den Grad der Ausbildung des Komplexes erst auf Grund der Stabilitätskonstanten eine Aussage möglich ist (vgl. auch^{12,3}).

¹² H. SIGEL und U. MÜLLER, Helv. chim. Acta 49, 671 (1966).

¹³ H. BRINTZINGER und H. ERLENMEYER, Helv. chim. Acta 48, 826 (1965).

¹⁴ Mit Ni^{2+} wurde bei pH 10 und mit Cu^{2+} bei pH 8,5 gearbeitet (eventuell geringe Niederschlagsbildung); $t = 20^\circ\text{C}$; bei Bedarf wurde die Reaktionslösung nach Zufügen von EDTA am Rotationsverdampfer bei 40°C etwas eingeengt (vgl. auch¹).

¹⁵ Kieselgel S-HR; Fliessmittel vgl. 7.

¹⁶ Die Reaktionslösung wird eigenartigerweise nach ca. 15 min leicht gelbstichig (offenbar wird das koordinierte Angiotensin II an einer Haftstelle durch HOO^- verdrängt) und nach ca. 30 min tritt ein feiner Niederschlag auf; trotzdem nimmt die H_2O_2 -Konzentration praktisch nicht ab, ebenso findet offenbar keine Degradation statt. Vermutlich besteht der Niederschlag aus einem ternären Peroxokomplex, der aber nicht in den «aktiven» Komplex^{12,5} überzugehen vermag.

¹⁷ Dies weist darauf hin, dass beide Reaktionen über einen gemeinsamen «Zwischenkomplex» verlaufen, bedeutet aber nicht, dass die Katalyse des H_2O_2 -Zerfalls und die der «Zerstörung» beim selben pH ihr Maximum haben (vgl. hierzu⁸).

¹⁸ Herrn Prof. Dr. H. ERLENMEYER danken wir für sein Interesse an dieser Arbeit. Herrn Dr. W. RITTEL (CIBA-Aktiengesellschaft, Basel) sind wir für die Überlassung von Angiotensin II, sowie Fr. S. REIMANN und Herrn P. ANDERS für ihre sorgfältige Hilfe bei den Versuchen dankbar.