

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
12. Jg. 1974, S. 87–91

Hydrolyse von Arylphosphaten durch multiple Formen alkalischer Phosphatasen¹⁾

Untersuchungen über alkalische Phosphatasen menschlicher Gewebe, II. Mitteilung

Von K. Lorentz, Barbara Flatter, J. Voss und D. Heydrich¹⁾

Aus der I. Medizinischen Klinik (Direktor: Prof. Dr. U. Ritter) der Medizinischen Hochschule Lübeck und dem Institut für Organische Chemie und Biochemie (Direktor: Prof. Dr. K. Heyns) der Universität Hamburg

(Eingegangen am 7. Mai/30. November 1973)

Es wird der Umsatz von Phenylphosphat, 4-Nitrophenylphosphat, Naphthyl-(1)-phosphat und drei synthetisierten Arylphosphaten durch alkalische Phosphatasen aus sechs Organen untersucht und mit dem Verhalten von Serumaktivitäten verglichen. Die *Michaelis-Menten*-Konstanten aller Isoenzyme erniedrigen sich gleichartig mit wachsender Elektrophilie der Substituenten im Benzolkern, wobei die 2-Position einen größeren Einfluß ausübt als die 4-Stellung. Die Phosphatase des Serums verhält sich bei verschiedenen Erkrankungen gleich. Sie zeigt bei der Bestimmung der K_m -Werte die Eigenschaften des intestinalen und bei der Cholsäureinhibition die des hepatischen Enzyms. Daher wird die Existenz einer einheitlichen Serumaktivität, die sich von den Phosphatasen der untersuchten Organe unterscheidet, postuliert und ihr differentialdiagnostischer Wert verneint.

Hydrolysis of arylphosphates by multiple forms of alkaline phosphatase. Studies on human alkaline phosphatases, II.

The turnover of phenyl phosphate, 4-nitrophenyl phosphate, naphthyl phosphate, and three other arylphosphates by alkaline phosphatases from six human tissues was investigated and compared with the behaviour of activities from human sera. The Michaelis-Menten-constant of every phosphatase was lowered identically by increasing electrophilic strength of the substituent, the 2-position being more effective than the 4-substitution. The serum phosphatases from patients with different diseases showed identical behaviour; they possessed the characteristic K_m values of intestinal phosphatase, but behaved like the hepatic enzyme with respect to cholic acid inhibition. These results show the existence of a single uniform serum activity, different from other multiple forms, and without importance for clinical differential diagnosis.

Bisher sind multiple Formen der alkalischen Phosphatase (Orthophosphorsäuremonoester-phosphohydrolase, EC 3.1.3.1) beim Menschen durch unterschiedliche Hitze-stabilität (2, 3), Molekülgröße (4, 5) sowie Hemmung durch Hamstoff (6, 7) oder Gallen- bzw. Aminosäuren (8) charakterisiert worden. Ihre klinische Bedeutung bei erhöhten Serumaktivitäten wird positiv (9), eingeschränkt positiv (3, 5, 7, 10, 11, 12) oder kritisch (6, 13) beurteilt, weil statt grundsätzlich verschiedener Eigenschaften in Geweben, im Serum nur graduelle Differenzen auftraten. Da diese geringen Unterschiede möglicherweise auf dem Vorliegen einer einzigen Aktivität im Serum beruhen (1), wird das Verhalten alkalischer Phosphatasen aus sechs menschlichen Organen gegenüber sechs Arylphosphaten untersucht und mit dem Verhalten von Seren verglichen.

Material und Methoden

Gewinnung und Aufarbeitung der untersuchten Proben folgten den Angaben der I. Mitteilung (1).

Reagenzien

Alle käuflichen Reagenzien wurden von E. Merck (Darmstadt) bezogen. Die Phenole wurden durch Umkristallisation in Äthanol gereinigt, die übrigen Substrate wie folgt synthetisiert:

Dicyclohexylammonium-2-nitrophenylphosphat:

27,8 g (0,2 mol) 2-Nitrophenol in 50 ml trock. Pyridin lösen, in 20 ml (0,22 mol) Phosphoroxichlorid innerhalb von 40 min unter Rühren eintropfen, 0,2 g Kaliumchlorid und 0,1 g Phosphor-pentachlorid hinzusetzen und 15 min unter Rückfluß erhitzen. Pyridinhydrochlorid abfiltrieren, mit 30 ml Pyridin waschen, die vereinigten Durchläufe auf dem Wasserbad bei 1333 Pa einengen und mit Diäthyläther digerieren: 46 g Phosphorsäure-(mono)-2-nitrophenylesterdichlorid (80 % d. Th.). Die ölige Masse wird unter Köhlen mit 50 g Eis versetzt und bei Raumtemperatur am Rotationsverdampfer evakuiert. Anschließend 50 ml Natriumbicarbonat (0,5 mol/l) zugeben und rühren, bis keine Phasentrennung mehr eintritt. Evtl. mit konz. Schwefelsäure auf pH 0–1 einstellen und die 2-Nitrophenylphosphorsäure mit Diäthyläther erschöpfend extrahieren. Extrakte mit Natriumsulfat trocknen, einengen und unter schnellem Rühren mit dest. Cyclohexylamin/Diäthyläther (Vol. 10 ml + 30 ml) bis zum Auftreten (etwa pH 8) von 2-Nitrophenol-Anion tropfenweise

¹⁾ Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft
²⁾ Die Arbeit enthält wesentliche Teile der Inauguraldissertation von D. Heydrich

versetzen. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit trock. Diäthyläther gewaschen und zweimal in Äthanol umkristallisiert (enthält 1 Molekül Kristallwasser). – Ausbeute: 26 g (30 % d. Th.), Fp. 166–169° C.

$C_{18}H_{34}N_3O_7P$ (435,46) Massefraktionen
Ber. C 0,4965 H 0,0787 N 0,0965 P 0,0712
Gef. C 0,4960 H 0,0796 N 0,0960 P 0,0570

Dicyclohexylammonium-2-chlor-4-nitrophenylphosphat:

Herstellung analog 2-Nitrophenylphosphat, doch ohne Phosphor-pentachlorid. Erst Pyridin in vacuo entfernen, dann Esterdichlorid (Ausbeute 69 % d. Th.) mit Aceton eluieren und mit Diäthyläther fällen. Extraktion der Arylphosphorsäure mit Diäthyläther/Äthylacetat (Vol. 0,9 + 0,1 l) und weitere Aufarbeitung wie oben. – Ausbeute 21 % d. Th., Fp. 159–161° (aus Äthanol, 1 Molekül Kristallwasser).

$C_{18}H_{33}ClN_3O_7P$ (469,91) Massefraktionen
Ber. C 0,4601 H 0,0708 Cl 0,0754 N 0,0894 P 0,0659
Gef. C 0,4618 H 0,0720 Cl 0,0773 N 0,0877 P 0,0633

Dicyclohexylammonium-4-chlor-2-nitrophenylphosphat:

Synthese wie bei 2-Chlor-4-nitrophenylphosphat, doch Aceton-eluat portionsweise mit berechneter Menge Wasser versetzen und nach Hydrolyse des Esterdichlorids Aceton am Rotationsverdampfer entfernen. – Ausbeute 35 % d. Th., Fp. 153–155° (aus Äthanol, 1 Molekül Kristallwasser).

$C_{18}H_{33}ClN_3O_7P$ (469,91) Massefraktionen
Ber. C 0,4601 H 0,0708 Cl 0,0754 N 0,0894 P 0,0659
Gef. C 0,4588 H 0,0720 Cl 0,0739 N 0,0878 P 0,0639

Nach den Elementaranalysen nahmen wir eine Reinheit von 975 g (820 g bei 2-Nitrophenylphosphat) pro kg Substanz mit Beimengung von Orthophosphorsäurediarylestern an und berücksichtigten dieses Verhältnis bei allen Einwägen. Vor Aufnahme der Spektren extrahierten wir deshalb die Lösungen mit Benzol/Äthylacetat (Vol. 10 ml + 20 ml).

Standardpuffer (Diäthanolamin 1 mol/l, Magnesiumchlorid 0,5 mmol/l) pH 9,8:

96,4 ml Diäthanolamin und 102 mg $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ mit etwa 800 ml bidest. Wasser lösen, mit konz. Salzsäure auf pH 9,8 bringen und auf 1000 ml auffüllen.

Geräte

Wir registrierten alle Spektren und den Umsatz von Phenylphosphat in der 1 cm-Quarzküvette mit dem Spektralphotometer PMQ II (Zeiss, Oberkochen) und die Hydrolyse der übrigen Arylphosphate mit dem Photometer Eppendorf 1101 M und angeschlossenem Kompensationsschreiber 4412 (Netheler & Hinz, Hamburg).

Vorgehen

Wegen der gegenseitigen Abhängigkeit von pH-Optimum und Substratkonzentration (14) führten wir alle Messungen im Standardpuffer durch. Der Substratumsatz wurde bei 8 verschiedenen Konzentrationen zwischen 25 $\mu\text{mol/l}$ und 20 mmol/l (Phenylphosphat in 7 Stufen von 100 $\mu\text{mol/l}$ bis 10 mmol/l) und der Einfluß von L-Cystein und Cholsäure bei 5 mmol/l Substrat gemessen. Die Berechnung der mit kinetischen Tests gemessenen Aktivitäten in U/l beruhte auf den Differenzen der bei pH 9,8 ermittelten mikromolaren Extinktionskoeffizienten ($\Delta\epsilon_{\mu\text{mol}}$) zwischen freien Phenolen oder Naphthol und den zugehörigen Arylphosphaten bei 25°.

Bei konstantem Probevolumen (PV) von 50 μl und einer Schichtdicke (d) von 1 cm ergaben sich folgende Ansätze, wobei RV dem Reaktionsvolumen, v der Geschwindigkeit des Kompensationsschreibers in cm/min und b seiner Registrierbreite in cm/E0-E1,0 entsprechen:

1. Phenylphosphat: $\Delta\epsilon_{\mu\text{mol}}$ 1,31 $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$ (275 nm)
RV = 2620 μl U/l = $\Delta E/\text{min} \cdot 40000$
2. Naphthyl-(1)-phosphat: $\Delta\epsilon_{\mu\text{mol}}$ 5,45 $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$ (374 nm)
RV = 2550 μl , v = 1 cm/min, b = 20 cm; U/l = tga · 468

3. 2-Nitrophenylphosphat: $\Delta\epsilon_{\mu\text{mol}}$ 4,42 $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$ (405 nm)
RV = 2210 μl , v = 1 cm/min, b = 40 cm; U/l = tga · 250

4. 4-Nitrophenylphosphat: $\Delta\epsilon_{\mu\text{mol}}$ 18,53 $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$ (405 nm)
RV = 3700 μl , v = 1 cm/min, b = 20 cm; U/l = tga · 200

5. 4-Chlor-2-nitrophenylphosphat:
 $\Delta\epsilon_{\mu\text{mol}}$ 4,5 $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$ (436 nm)
RV = 2250 μl , v = 1 cm/min, b = 20 cm; U/l = tga · 500

6. 2-Chlor-4-nitrophenylphosphat:
 $\Delta\epsilon_{\mu\text{mol}}$ 16,62 $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$ (405 nm)
RV = 3320 μl , v = 2 cm/min, b = 20 cm; U/l = tga · 400

Alle Werte bestimmten wir doppelt unter den Bedingungen einer Reaktion nullter Ordnung (Anfangsgeschwindigkeit) und ermittelten aus ihnen V durch direkte Auftragung v gegen [S] und nach *Lineweaver-Burk*, während K_m ebenfalls graphisch nach *Eadie-Hofstee* abgeleitet wurde.

Ergebnisse

Spektren

Während die chlorierten Nitrophenole in Lösung lichtempfindlich sind (15), erwiesen sich ihre Monophosphate als stabil. Die hypochrome Verschiebung des Maximums durch die Veresterung war beim 2-Nitrophenol etwas stärker ausgeprägt als bei den chlorierten Derivaten (Tab. 1). Im übrigen entsprachen die molaren Extinktionskoeffizienten der Nitrophenole bei pH 9,8 etwa den Werten der Literatur (15–18) in alkalischer Lösung (Tab. 1).

Tab. 1. Absorptionsmaxima und molare Extinktionskoeffizienten substituierter Phenole bei pH 9,8 (0,1 mol/l Diäthanolamin), in 0,2 mol/l Natriumhydroxid (15), Natriumhydroxid (16) und alkalischer Lösung (18).

Verbindung	Max. (nm)	ϵ (cm^2/mol)	Max. (nm)	ϵ (cm^2/mol)
2-Nitrophenylphosphat	265	$3,95 \cdot 10^6$	320	$2,1 \cdot 10^6$
2-Nitrophenol	280	$3,76 \cdot 10^6$	415	$4,64 \cdot 10^6$
(15)			416	$4,80 \cdot 10^6$
(16)			414	$4,60 \cdot 10^6$
4-Chlor-2-nitrophenylphosphat	260	$3,36 \cdot 10^6$	340	$1,97 \cdot 10^6$
4-Chlor-2-nitrophenol	255	$5,34 \cdot 10^6$	425	$4,65 \cdot 10^6$
(15)			425	$4,38 \cdot 10^6$
(16)			426	$4,68 \cdot 10^6$
(18)			427	$4,46 \cdot 10^6$
2-Chlor-4-nitrophenylphosphat	310	$8,30 \cdot 10^6$		
2-Chlor-4-nitrophenol	265	$4,68 \cdot 10^6$	400	$16,90 \cdot 10^6$
(15)			400	$24,32 \cdot 10^6$
(18)			400	$16,00 \cdot 10^6$

Substratumsatz und Inhibitoren

Die Substratabhängigkeit der untersuchten Isoenzyme war gleichartig, so daß nur das Verhalten der Leberphosphatase graphisch dargestellt wurde (Abb. 1). Allen Aktivitäten waren folgende Eigenschaften gemeinsam:

1. Der höchste Substratumsatz wird mit 4-Nitrophenylphosphat erreicht, ausgenommen Ileum (Phenylphosphat) und Leukocyten (4-Chlor-2-nitrophenylphosphat).

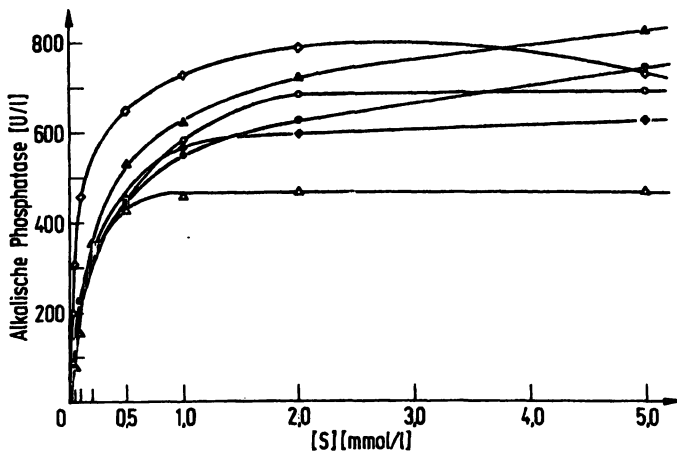


Abb. 1. Substratabhängigkeit von alkalischer Phosphatase aus menschlicher Leber (unter 0,5 mmol/l nicht alle Meßpunkte aufgetragen).

Substrate:	4-Chlor-2-nitrophenylphosphat	□ - □
	2-Chlor-4-nitrophenylphosphat	○ - ○
	2-Nitrophenylphosphat	■ - ■
	4-Nitrophenylphosphat	● - ●
	Phenylphosphat	▲ - ▲
	Naphthyl-(1)-phosphat	△ - △

- Die größte Substrataffinität besteht gegenüber 4-Chlor-2-nitrophenylphosphat.
- Die chlorierten Nitrophenylphosphate führen zu einer Überschußhemmung, ausgenommen Niere und Leukocyten (2-Chlor-4-nitrophenylphosphat) bzw. Ileum (4-Chlor-2-nitrophenylphosphat).
- Gegenüber Naphthyl-(1)-phosphat besteht schon ab 1 mmol/l unverändert bis 20 mmol/l Maximalgeschwindigkeit.

Die aus den Kurven abgeleiteten Werte für K_m , V und die Substratkonzentration, bei der V eintritt, sind in Tabelle 2 dargestellt. Danach dürfte die Bildung des Enzymsubstratkomplexes am schnellsten bei 4-Chlor-2-nitrophenylphosphat eintreten, sein Zerfall dagegen beim Umsatz von 4-Nitrophenylphosphat, auch beim Vergleich einer einheitlichen Konzentration von 5 mmol/l.

In Ergänzung der von Fishman & Sie (8) mit Phenylphosphat gemessenen Daten fanden wir eine generelle Hemmung durch L-Cystein und eine selektive Inhibition durch Cholsäure, welche die intestinale Aktivität (vor allem bei Einsatz von 4-Nitrophenylphosphat, 2-Nitrophenylphosphat, 2-Chlor-4-nitrophenylphosphat und Phenylphosphat) nicht beeinflusste (Tab. 3).

Eigenschaften von Seren

Aufgrund der mit Organextrakten gemessenen Umsätze prüften wir folgende Verfahren, um den Ursprung der Serumaktivität zu untersuchen:

- Trotz weitgehender Analogie bei Verwendung von Arylphosphaten differiert die Aktivität der Isoenzyme bei der Hydrolyse von 2 mmol/l 2-Nitrophenylphosphat und Phenylphosphat, so daß verschiedene 2-Nitrophenylphosphat/Phenylphosphat-Quotienten resultieren: Dünndarm 0,64 – Leber 0,83 – Niere 0,94 – Milz und Knochen 1,0 – Leukocyten 1,13. – Das Verfahren dieser Quotientenbildung in Seren war nur für Aktivitäten über 170 U/l (im Standardansatz, 19) geeignet und lieferte dann bei 25 Patienten (Lebercirrhose 5, akuter inkompletter Verschußikterus 5, Hepatitis 5, Tumoren mit Lebermetastasen 7 und Tumoren mit

phat und Phenylphosphat, so daß verschiedene 2-Nitrophenylphosphat/Phenylphosphat-Quotienten resultieren: Dünndarm 0,64 – Leber 0,83 – Niere 0,94 – Milz und Knochen 1,0 – Leukocyten 1,13. – Das Verfahren dieser Quotientenbildung in Seren war nur für Aktivitäten über 170 U/l (im Standardansatz, 19) geeignet und lieferte dann bei 25 Patienten (Lebercirrhose 5, akuter inkompletter Verschußikterus 5, Hepatitis 5, Tumoren mit Lebermetastasen 7 und Tumoren mit

Tab. 2. Eigenschaften multipler Formen der alkalischen Phosphatase. Verhalten gegenüber verschiedenen Arylphosphaten bei pH 9,8: Michaelis-Konstante (K_m), Maximalgeschwindigkeit (V), Substratkonzentration [S] bei V und relative Umsätze, bezogen auf 4-Nitrophenylphosphat und 5 mmol/l (v rel.).

K_m [mmol/l]	V [U/l]	[S] [mmol/l]	V rel.	v rel.	Organ
Phenylphosphat					
0,79	152	>10	1,0	1,0	Milz
0,61	1250	>10	0,95	0,97	Knochen
0,46	930	>10	1,0	1,1	Leber
0,86	77	>10	0,85	0,94	Niere
0,55	520	>10	1,65	1,52	Ileum
0,61	85	>10	0,85	0,90	Leukocyten
4-Nitrophenylphosphat					
0,54	150	>20	1,0	1,0	Milz
0,33	1300	20	1,0	1,0	Knochen
0,56	930	>20	1,0	1,0	Leber
0,58	89	20	1,0	1,0	Niere
0,41	315	>20	1,0	1,0	Ileum
0,77	100	>20	1,0	1,0	Leukocyten
2-Nitrophenylphosphat					
0,17	112	5*	0,75	0,87	Milz
0,19	1000	3*	0,77	0,84	Knochen
0,21	625	5*	0,67	0,84	Leber
0,15	60	>20	0,67	0,75	Niere
0,31	255	5 ⁺⁺	0,81	0,88	Ileum
0,27	78	5*	0,78	1,0	Leukocyten
2-Chlor-4-nitrophenylphosphat					
0,41	96	5*	0,64	0,75	Milz
0,33	1072	3*	0,82	0,90	Knochen
0,36	693	5*	0,75	0,94	Leber
0,27	50	5 ⁺⁺	0,56	0,74	Niere
0,33	270	3*	0,85	0,87	Ileum
0,69	72	25	0,72	0,77	Leukocyten
4-Chlor-2-nitrophenylphosphat					
0,09	111	3*	0,74	0,78	Milz
0,08	1175	2*	0,90	0,92	Knochen
0,08	815	2*	0,88	0,98	Leber
0,06	45	2*	0,51	0,59	Niere
0,16	313	10 ⁺⁺	0,99	1,05	Ileum
0,44	114	5*	1,14	1,35	Leukocyten
Naphthyl-(1)-phosphat					
0,12	90	2 ⁺⁺	0,60	0,70	Milz
0,11	720	5 ⁺⁺	0,55	0,64	Knochen
0,13	467	1 ⁺⁺	0,50	0,63	Leber
0,13	51	5 ⁺⁺	0,57	0,75	Niere
0,21	230	2 ⁺⁺	0,73	0,79	Ileum
0,14	36	1 ⁺⁺	0,36	0,46	Leukocyten

* Überschußhemmung ab bezeichneter Konzentration

++ Konstante Geschwindigkeit ab bezeichneter Konzentration

Tab. 3. Eigenschaften multipler Formen alkalischer Phosphatasen aus Humangeweben. Hemmung durch *L*-Cystein (5 und 10 mmol/l) und Cholsäure (10 und 20 mmol/l) bei 5 mmol/l Substraten gegenüber der Kontrolle (Aktivität ohne Inhibitor = 1,0).

Milz	Knochen	Leber	Niere	Dünndarm	Leukocyten	Inhibitor
Phenylphosphat						
0,37	0,05	0,05	0,04	0,02	0,78	Cystein 5
0,59	0,42	0,53	0,57	0,93	0,55	Cholsäure 10
4-Nitrophenylphosphat						
0,02	0,01	0,02	0,01	0,01	0,21	Cystein 5
φ	φ	φ	0,01	φ	0,05	Cystein 10
0,43	0,35	0,40	0,44	0,92	0,28	Cholsäure 10
0,26	0,26	0,33	0,31	0,67	0,12	Cholsäure 20
2-Nitrophenylphosphat						
φ	φ	φ	0,01	0,09	0,28	Cystein 10
0,70	0,58	0,54	0,65	0,88	0,53	Cholsäure 10
0,58	0,50	0,45	0,60	0,85	0,31	Cholsäure 20
2-Chlor-4-nitrophenylphosphat						
0,07	0,02	0,03	0,02	0,01	0,88	Cystein 5
0,66	0,53	0,52	0,61	0,91	0,60	Cholsäure 10
4-Chlor-2-nitrophenylphosphat						
φ	0,01	0,01	0,02	0,02	0,93	Cystein 5
0,60	0,53	0,62	0,61	0,77	0,53	Cholsäure 10
Naphthyl(1)-phosphat						
0,01	0,02	φ	0,04	0,01	0,92	Cystein 5
0,78	0,50	0,74	0,75	0,82	0,63	Cholsäure 10

Knochenmetastasen 3 Fälle) Werte zwischen 0,7 und 1,35 ($\bar{x} = 1,08$). Quotienten und Erkrankungen ließen sich einander nicht zuordnen. Normale Serumaktivitäten (20 Gesunde mit Werten unter 170 U/l, nach lc. 19) zeigten bei größerer Streuung höhere Quotienten von 1,5 bis 3,4 ($\bar{x} = 2,2$).

2. Bei Gegenwart von 10 mmol/l Cholsäure in einem Ansatz mit 5 mmol/l 4-Nitrophenylphosphat behält Dünndarmphosphatase fast die volle Aktivität bei starker Hemmung der anderen Isoenzyme (Tab. 3). Die Anwendung der Cholsäureinhibition auf das obengenannte Kollektiv von 25 Kranken mit verschiedenen Leiden ergab eine Hemmung von 0,34–0,56 ($\bar{x} = 0,47$) der Ausgangsaktivität. Auch hier korrelierten die Quotienten nicht mit den Erkrankungen, sofern man die Ergebnisse in den Organextrakten zugrundelegte. So wiesen 3 Pools, in denen jeweils Serum von 4 Patienten mit Knochenmetastasen (2 Prostata-, 2 Mammacarcinome), mit akutem Verschlusßikterus sowie ohne innere Erkrankungen (Normalseren) gemischt wurden, folgende Werte auf: Normal 0,50 – Verschlusßikterus 0,47 – Knochenmetastasen 0,46. Im gleichen Bereich von 0,41–0,51 ($\bar{x} = 0,46$) lagen die Werte der 20 Gesunden. Parallelbestimmungen mit Zusatz von 1 g/l Dodecylsulfat (in den Ansätzen mit und ohne Cholsäure) produzierten dieselben Befunde bei Stimulation der absoluten Aktivität auf 1,02–1,08 der dodecylsulfatfreien Tests.

3. Die Bestimmung der *Michaelis-Menten*-Konstanten läßt eine auffallend niedrige Substratkonzentration für

das Isoenzym des Knochens bei 4-Nitrophenylphosphat und für die Nierenaktivität bei 4-Chlor-2-Nitrophenylphosphat erkennen, während die intestinale Phosphatase bei Naphthylphosphat abweichend von den anderen Aktivitäten eine hohe K_m zeigt (Tab. 2). Die Aufnahme der *Michaelis*-Konstanten für diese drei Substrate mit den genannten Poolseren ergab jedoch beinahe identische Werte, unerachtet ihrer vermuteten Organherkunft (Tab. 4).

Tab. 4. Eigenschaften der Serumaktivität alkalischer Phosphatase gegenüber Arylphosphaten. Einsatz von Mischungen aus je 4 Seren von Gesunden, Patienten mit Verschlusßikterus bzw. Knochenmetastasen.

Gesunde	Verschlusßikterus	Knochenmetastasen	Konstanten
4-Nitrophenylphosphat			
0,45	0,42	0,47	K_m [mmol/l]
205	340	1140	V [U/l]
1,0	1,0	1,0	V rel.
4-Chlor-2-nitrophenylphosphat			
0,19	0,17	0,17	K_m [mmol/l]
202	330	985	V [U/l]
1,0	0,97	0,86	V rel.
Naphthyl(1)-phosphat			
0,16	0,20	0,18	K_m [mmol/l]
150	268	830	V [U/l]
0,73	0,79	0,73	V rel.

Diskussion

Die multiplen Formen der alkalischen Phosphatase zeigen gegenüber Arylphosphaten ein ähnliches Verhalten, wobei die Substrat-Umsatz-Kurven mehr von der Art des Substrats und weniger von der Herkunft des Enzyms bestimmt werden. *Skillen & Harrison* (20) fanden, allerdings nur mit verschiedenen Seren und intestinaler Aktivität, bei pH 9,5 überhaupt keine Unterschiede. Bei pH 10,5 wurde die Form der Kurve weder vom eingesetzten Enzym noch vom Substrat (4-Nitrophenylphosphat oder Naphthylphosphat) bestimmt. Sie hing vielmehr von der Art des Puffers und seiner Phosphorylierungstendenz ab.

Aus unseren Ergebnissen bei Konstanz von Pufferion und pH-Wert läßt sich für alle multiplen Formen der alkalischen Phosphatase nach den K_m -Werten folgendes ableiten: Die Substrataffinität hängt in spezifischer Weise von der Substitution am Aromaten ab. So zeigt 2-Chlor-4-nitrophenylphosphat niedrigere Werte als 4-Nitrophenylphosphat, aber höhere als 2-Nitrophenylphosphat und 4-Chlor-2-nitrophenylphosphat. Offenbar wirkt sich ein stark elektrophiler Substituent in der 2-Position – vielleicht aufgrund seines sterischen Effektes – besonders stark aus.

Bei diesen gleichartigen Ergebnissen erscheint eine qualitative Aussage über den Ursprung der Phosphatase des

Serums schwierig, doch zeigen die K_m -Werte aller Poolseren bei jedem Substrat eine weitgehende Übereinstimmung mit der intestinalen Form. Andererseits entspricht die Cholsäurehemmung, die – nach dem Ergebnis der Zusatzversuche mit Dodecylsulfat – nicht durch eine allfällige Lipoproteinbindung des Enzyms modifiziert wird, dem Verhalten des Leberenzym, mit dem auch bei der Disk-Elektrophorese Übereinstimmung besteht. Ähnliches gilt auch für den gleichzeitigen Umsatz von 2-Nitrophenylphosphat und Phenylphosphat bei 2 mmol/l, der eher auf Leber und Knochen als auf eine Herkunft aus der Dünndarmmucosa deutet, dabei allerdings eine größere Streuung als die Cholsäureinhibition aufweist.

Da zu diesem Punkt verschiedene Annahmen (3, 6, 7, 9, 10, 21, 22) vorliegen, die teilweise auf der Existenz mehrerer Isoenzyme im Serum beruhen, fassen wir unsere Beobachtungen wie folgt zusammen: In allen untersuchten Seren existiert nach den Ergebnissen von Cholsäureinhibition, K_m -Bestimmung und Disk-Elektrophorese nur eine multiple Form, deren Charakter vom Sekretorstatus und ABO-System abhängt und durch unterschiedliche Erkrankungen nicht verändert wird. Einige ihrer Eigenschaften stimmen mit der intestinalen, andere mit der hepatischen Aktivität überein. Ihre Untersuchung erscheint für die Differentialdiagnose der Hyperphosphatasämie ohne klinisches Interesse.

Literatur

- Lorentz, K., Flatter, B. & Heydrich, D. (1973), diese Z. 12
- Posen, S., Neale, F. C. & Clubb, J. S. (1965), Ann. Intern. Med. 62, 1234–1243.
- Green, S., Anstiss, C. L. & Fishman, W. H. (1971), Enzymologia 41, 9–26.
- Dunne, J., Fennelly, J. J. & Mc Geaney, K. (1967), Cancer 20, 71–76.
- Fennelly, J. J., Dunne, J., Mc Geaney, K., Chong, L. & Fitzgerald, M. (1969), Ann. N.Y. Acad. Sci. 166, 794–810.
- Bahr, M. & Wilkinson, J. H. (1967), Clin. Chim. Acta 17, 367–370.
- Horne, M., Cornish, C. J. & Posen, S. (1968), J. Lab. Clin. Med. 72, 905–915.
- Fishman, W. H. & Sie, H.-G. (1971), Enzymologia 41, 141–167.
- Johnson jr., R. B., Ellingboe, K. & Gibbs, Ph. (1972), Clin. Chem. 18, 110–115.
- It-Koon, T. (1969), Clin. Chim. Acta 25, 117–125.
- Statland, B. E., Nishi, H. H. & Young, D. S. (1972), Clin. Chem. 18, 1468–1474.
- Ratliff, Ch. R., Hall, F. F., Culp, Th. W., Gevedon, R. E. & Westfall, C. L. (1972), Amer. J. Gastroenterol. 58, 22–29.
- Winkelman, J., Nadler, S., Demetriou, J. & Pileggi, V. J. (1972), Amer. J. Clin. Pathol. 57, 625–634.
- Fernley, H. N. (1971), in The Enzymes (Boyer, P. D., Hrsg.) 3. Aufl., Bd. 4, 417–447, Verlag Academic Press, New York & London.
- Kirby, A. J. & Varvoglis, A. G. (1967), J. Amer. Chem. Soc. 89, 415–423.
- Rapoport, M., Hancock, C. K. & Meyers, E. A. (1961), J. Amer. Chem. Soc. 83, 3489–3494.
- Kezdy, F. & Bender, M. L. (1962), Biochemistry 1, 1097–1106.
- Bower, V. E. & Robinson, R. A. (1960), J. Phys. Chem. 64, 1078–1079.
- Empfehlungen der Dtsch. Ges. Klin. Chem. (1972), diese Z. 10, 281–291.
- Skillen, A. W. & Harrison, J. (1973), Clin. Chim. Acta 45, 287–292.
- Kaschnitz, R., Patsch, J. & Peterlik, M. (1969), Z. Gesamte Exp. Med. 149, 145–151.
- Massarat, S. & Massarat, Sch. (1971), Enzyme 12, 593–605.

Prof. Dr. Klaus Lorentz
I. Med. Klinik der Med. Hochschule Lübeck
24 Lübeck
Kronsforder Allee 71/73