

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.  
Vol. 21, 1983, pp. 53–61

## Prolinarylamidase in Humanserum

Von W. Appel

Zentrallaboratorium der St.-Vincentius-Krankenhäuser (Professor Dr. med. P. M. Reisert) Karlsruhe und der Kinderklinik Mannheim (Professor Dr. med. E. Huth) der Universität Heidelberg

(Eingegangen am 17. August 1981/16. August 1982)

**Zusammenfassung:** Die katalytischen Konzentrationen einer Prolinarylamidase in Humanserum wurden mittels *L*-Prolin- $\beta$ -naphthylamid (Endpunktmethode) und *L*-Prolin-*p*-nitranilid (kontinuierliche Methode, optimiert) bestimmt. Das Substratoptimum liegt bei 1,53 mmol/l, der  $K_m$ -Wert bei 0,13 mmol/l, Substratüberschußhemmung wird nicht beobachtet. Das pH-Optimum liegt bei pH 7,20; Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan- und N-Morpholino-3-propansulfonsäure-Puffer sind gleichwertig. Reduzierende Substanzen, SH-Reagenzien, Komplexbildner, Antikoagulantien, Proteinaseinhibitoren sowie die Chloride von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$  und  $\text{Ni}^{++}$  besitzen keinen Einfluß. Die schwachen Aktivierungseffekte der Chloride von  $\text{Cd}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Hg}^{++}$ ,  $\text{Co}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  und  $\text{Ca}^{++}$  sind nicht sicher von Metallproteinatbildungen abzugrenzen. EDTA und Benzethoniumchlorid inhibieren. Serumeigene niedermolekulare Inhibitoren für Prolinarylamidase wurden nicht aufgefunden.

Die katalytischen Konzentrationen liegen in der Regel unter 10 U/l (37 °C). Die Variationskoeffizienten betragen in Serie um 9,1%, von Tag zu Tag um 14,5%. Als vorläufige obere Grenze des Normwertes aus 91 Probanden wird 8 U/l angenommen. Vergleichende Bestimmungen an Seren von weiteren 372 Patienten mit den *p*-Nitraniliden von Glycin, *L*-Alanin, *L*-Leucin und  $\gamma$ -Glutaminsäure deuten auf eine diagnostische Sonderstellung der Prolinarylamidase.

Die kontinuierliche Methode konnte für den Vitatron AKES-Analysenayutomaten adaptiert werden.

### *Proline arylamidase in human serum*

**Summary:** The catalytic concentrations of proline arylamidase in human sera were determined with *L*-proline- $\beta$ -naphthylamidé (endpoint-method) and *L*-proline-*p*-nitranilide (continuous reaction). The continuous method was optimized: Tris-HCl, 40 mmol/l, pH 7,2; [S] = 1.53 mmol/l; T = 37 °C, t = 5–15 min, no additives. The pH-optimum was found to be 7.20; substrate excess inhibition was not observed. Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane und N-mörpholino-3-propane sulfonic acid buffers gave similar reaction rates. Reducing substances, SH-reagents, complex-forming or buffer substances, anticoagulants, proteinase inhibitors and the chlorides of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$  and  $\text{Ni}^{++}$  did not influence the activity of the enzyme. Slight activation by the chlorides of  $\text{Cd}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Hg}^{++}$ ,  $\text{Co}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  and  $\text{Ca}^{++}$  could not be clearly differentiated from the effects of metalloproteinat formation. EDTA and benzethonium chloride inhibited the catalytic activity. In human sera no low molecular weight inhibitors were detectable. Catalytic concentrations were usually in the range below 10 U/l (37 °C). The coefficients of variation were found to be 9.1% intraserial and about 14.5% day-to-day. The preliminary upper limit of "normal" range was established as 8.0 U/l (37 °C). Comparative simultaneous determinations of the catalytic concentrations, using *L*-leucine-, *L*-alanine-, glycine,  $\gamma$ -*L*-glutamic- and *L*-proline-*p*-nitranilide in the sera of 372 patients, suggest a special diagnostic role for proline arylamidase.

The continuous method has been adapted for Vitatron-AKES-Analyser.

## Einführung

„Prolinarylamidase“ (EC 3.4.11.2) ist bislang für die klinisch-chemische Diagnostik nicht herangezogen worden. Dieser Begriff steht im folgenden für eine Exopeptidase-Aktivität mit Präferenz für *L*-Prolin- $\beta$ -naphthylamid oder *L*-Prolin-*p*-nitranilid.

Der Inhalt der vorliegenden Untersuchung ist die Ausarbeitung und Optimierung einer Routinemethode zur Bestimmung der katalytischen Konzentration dieses Enzyms in Humanserum mit dem Ziel, organ-unspezifische Veränderungen der Konzentrationen bei Erkrankungen mit pathobiochemischen Mechanismen im Bereich des Bindegewebes, des rheumatischen Formenkreises und des Immunsystems sichtbar werden zu lassen.

## Material und Methoden

### Geräte

Spektralphotometer Zeiss DM 4 mit Drucker, Küvettenwechselautomatik ZVS 9 und Registrierschreiber Servogor Z 10;

Enzymautomat Eppendorf 5020/II;

Photometer mit Rechner und Drucker Eppendorf PCP 6121;

Säulenchromatographie-Einrichtung LKB;

Diaflo-Filterkegel (Amicon);

Collodium-Hülsen (Sartorius);

HP-Statistik-Tischrechner 9805 A.

### Reagenzien

*L*-Prolin-*p*-nitranilid ( $M_r = 235,1$ );

*L*-Alanin-*p*-nitranilid-hydrochlorid ( $M_r = 209,1$ );

Glycin-*p*-nitranilid-hydrobromid ( $M_r = 276,1$ ) (Fluka, Buchs);

*L*-Leucin-*p*-nitranilid ( $M_r = 251,3$ );

*L*- $\gamma$ -Glutamyl-3-carboxy-*p*-nitranilid ( $M_r = 267,1$ ) (Merck, Darmstadt).

*p*-Nitranilin, Kalibrierlösung, 0,300 mmol/l (Boehringer Mannheim, Nr. 15912);

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), *N,N'*-bis-(2-Hydroxyethyl)-glycin, *N*-Morpholino-3-propan sulfonsäure (Mops), Ascorbinsäure, *N*-Ethylmaleinimid, Benzethoniumchlorid, *L*-Cysteinhydrochlorid, Dithioerythrit, EDTA-di-Natriumsalz, Heparin-Lithium- und -Ammoniumsalz, *p*-Hydroxybenzoesäure, 8-Hydroxylammoniumchlorid, Trypsininhibitor aus Sojabohnen, Zitronensäure-tri-Natriumsalz, Iodacetamid, 1,10-Phenanthrolin, Phenylmethylsulfonylfluorid (alles Serva, Heidelberg);

CaCl<sub>2</sub>, CdCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub> und NaCl (alles Merck, Darmstadt);

Aprotinin (Trasylo<sup>®</sup>) = Trypsin-Inhibitor aus Rinderorganen (Bayer, Leverkusen);

Sephadex G-25, medium (Pharmacia, Uppsala);

Salzsäurelösung, 1,0 und 0,1 mol/l, Natronlauge, 1,0 und 0,1 mol/l, Eisessig, *N*-Dimethylformamid, Methanol;

tridestilliertes Wasser (Quarzdestillat).

## Herstellung der Lösungen

Kontinuierliche Methode für 80–100 Bestimmungen:

Trispufferlösung, 50 mmol/l, pH 7,20: 0,605 g Tris in 25,0 ml tridest. Wasser lösen, 45,0 ml 0,1 mol/l HCl-Lösung zugeben, auf 100,0 ml auffüllen und pH-Wert mit Glaselektrode prüfen.

Mops-Pufferlösung, 200 mmol/l, pH 6,8: 4,180 g Mops in 100,0 ml tridest. Wasser lösen und die gewünschten pH-Werte durch Zugabe von 1,0 mol/l NaOH-Lösung mittels Magnetrührer und Glaselektrode einstellen.

NaCl-Stammlösung, 5,0 mol/l: 29,2 g NaCl in 100,0 ml tridest. Wasser lösen.

Substratlösungen, 20 mmol/l: 0,2 mmol des jeweiligen Substrates, z.B. 47,0 mg *L*-Prolin-*p*-nitranilid, in 0,2 ml, maximal 0,5 ml Dimethylformamid lösen und auf 10,0 ml mit der jeweiligen Pufferlösung auffüllen.

Herstellung der Lösungen für die Endpunktmethode siehe l.c. (1), für die „Automaten“-Methode siehe Herstellerangaben.

## Untersuchungsmaterial

Die Blutspecimen entstammen stationären Patienten der acht Fachkliniken unserer Krankenhäuser. Die Blutabnahme erfolgte zwischen 8 und 9 Uhr, die Serumgewinnung anschließend, die Analyse spätestens 3 h danach.

Hämolytische, ikterische, lipämische und über 3 h alte Seren sowie solche ambulanter Patienten wurden ausgesondert und nicht untersucht.

## Bestimmung

Die Bestimmungsansätze, Reaktions- und Meßbedingungen sind in Tabelle 1 aufgeführt. Meßwellenlänge 405 nm.

Tab. 1. Reaktionsbedingungen für die Messung der katalytischen Konzentration der Prolinarylamidase.

T = Temperatur                      d = Schichtdicke  
W = Wellenlänge                    A = Absorption  
s = Spaltbreite                      t = Reaktionszeit

Lösung	$\mu$ l	Konzentration im Reaktionsansatz
Trispufferlösung pH 7,20	1000	38,5 mmol/l
Substratlösung	100	1,53 mmol/l
Serumprobe	200	—

## Kontinuierliche Messung:

T = 37 °C     $\lambda = 405 \text{ nm}$     s = 5 nm    d = 10 mm

Messung gegen Trispufferlösung

Meßzeit: t = 5–15 min

Meßbereich:  $\Delta = 0,05\text{--}0,8$

## Endpunktmessung:

T = 37 °C    nach t = 3 und 13 min je 0,5 ml aliquoten Teil des Reaktionsansatzes der Diazotierung zuführen.

## Mechanisierte Messung:

Vitatron AKES II mit halbierten Volumina und f = 754

## Berechnung

Die Berechnung der katalytischen Konzentrationen erfolgte bei der Endpunktmethode mit Hilfe einer mit *p*-Nitranilidlösung aufgestellten Bezugskurve, bei der kontinuierlichen Methode über

die Formel: Katalytische Konzentration (U/l) =  $A \cdot \text{min}^{-1} \cdot 754$ . Die mathematisch-statistische Auswertung wurde mit dem t-Test nach Student für verbundene Stichproben, dem Wilcoxon-Test und dem zweiseitigen Kolmogoroff-Smirnoff-Test mit Hilfe eines Tischrechners und einer EDV-Anlage durchgeführt (siehe auch Legenden zu Tabellen, insb. Tab. 5).

**Ergebnisse**

Analytik und Qualitätssicherung bei der kontinuierlichen Bestimmung mittels L-Prolin-p-nitranilid:

Der Variationskoeffizient in Serie beträgt für  $\bar{x} = 5,56 \text{ U/l}$  und  $n = 18$ :  $\text{VK}_s = 9,11\%$ ; von Tag zu Tag mit portionsweise eingefrorenen Proben eines Serumpools für  $\bar{x} = 12,43 \text{ U/l}$  und  $n = 8$ :  $\text{VK}_T = 14,5\%$ .

Da das Enzym nicht in reiner oder gereinigter Form vorliegt, sind entsprechende Richtigkeitskontrollen durch Zusatz- oder Aufstockversuche nicht möglich.

Die Reaktion verläuft nach einer Vorperiode von 2–3 min über wenigstens 2 h linear (Abb. 1). Ein-

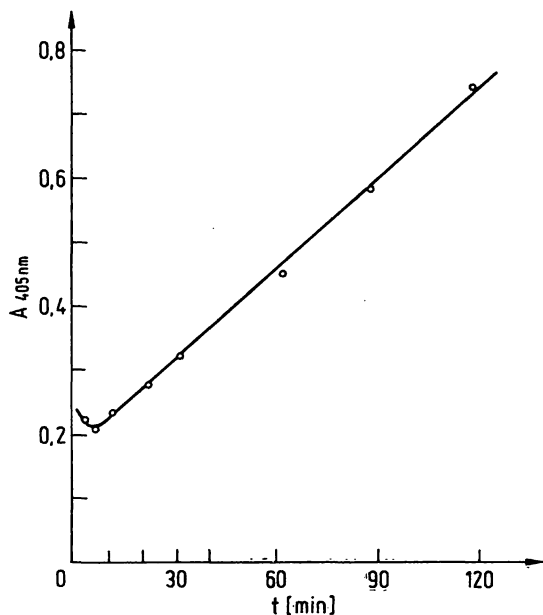


Abb. 1. Prolinarylamidase in Humanserum. Zeit-Aktivitätsbeziehung.  
Substrat: L-Prolin-p-nitranilid, 1,53 mmol/l  
Ordinate: Reaktionszeit in min  
Abszisse: Substratumsatz als  $A_{405 \text{ nm}}$

satz verschiedener Volumina von Seren mit verschiedenen katalytischen Konzentrationen ergibt eine lineare Beziehung (Abb. 2). Eine Substrat-Inhibierung ist bis zu Sättigungskonzentrationen nicht beobachtbar (Abb. 3).

Der  $K_m$ -Wert beträgt  $0,13 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Das pH-Optimum der Substrathydrolyse liegt bei pH 7,20; die Kurve nimmt zum saueren Bereich hin

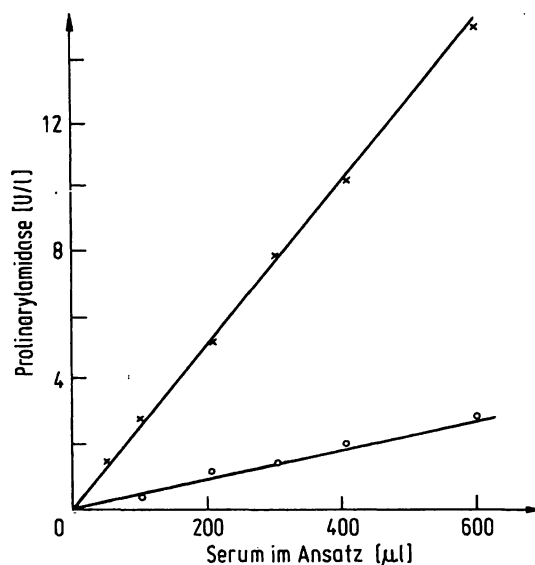


Abb. 2. Prolinarylamidase in Humanserum: Menge-Aktivitätsbeziehung.  
Substrat: L-Prolin-p-nitranilid, 1,53 mmol/l  
Ordinate: Serum im Ansatz in  $\mu\text{l}$   
Abszisse: Katalytische Konzentration in U/l  
○—○ Serumpool von Gesunden, x—x Serumpool von Patienten.

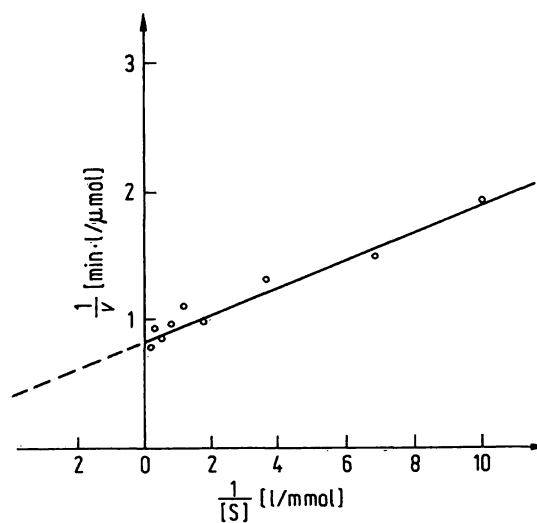


Abb. 3. Prolinarylamidase in Humanserum: Lineweaver-Burk-Plot.  
Substrat: L-Prolin-p-nitranilid  
Ordinate: Reziproke Substratkonzentration  $1/S$  in  $\text{l} \cdot \text{mmol}^{-1}$   
Abszisse: Reziproke Reaktionsgeschwindigkeit  $1/v$  in  $\text{l} \cdot \text{U}^{-1} = \text{min} \cdot \text{l}/\mu\text{mol}$

rasch, zum alkalischen hin langsamer ab (Abb. 4). Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-HCl- und N-Morpholino-3-propansulfonsäure-Na-Puffer verhalten sich gleichartig.

Lagerung von Humanserum bewirkt rasche Inaktivierung. Aufbewahrung nach 5 h bei 37 °C, 17 h bei Raumtemperatur und 24 h bei 4 °C führen zu jeweils 50% Verlust der katalytischen Konzentrationen.

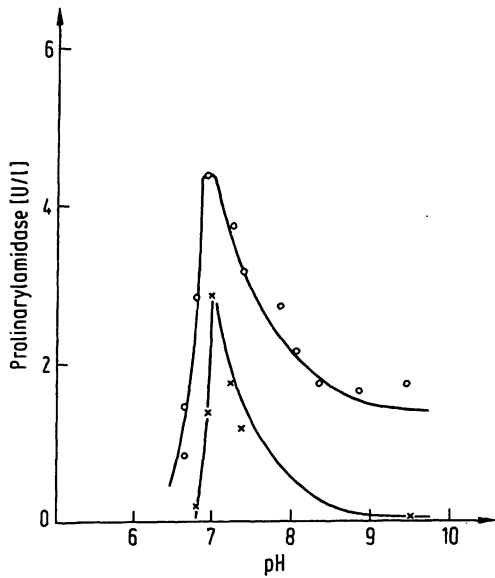


Abb. 4. Prolinarylamidase in Humanserum: pH-Abhängigkeit.  
 Abszisse: pH-Werte  
 Ordinate: Katalytische Konzentration in U/l  
 O—O Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-HCl-Puffer  
 x—x N-Morpholino-3-propansulfonsäure-Na-Puffer

Einmaliges Einfrieren und Auftauen ist möglich.

Der Einfluß von Effektoren ist in Tabelle 2 dargestellt. Reduktionsmittel und SH-Reagenzien sind wirkungslos, ebenso Chelat- und Komplexbildner, Gerinnungshemmer, Puffersubstanzen und Proteinase-Inhibitoren.

Nicht eindeutig sind die Wirkungen von Metallsalzen. Aus Registrierkurven kinetischer Messungen ergibt sich kein Einfluß der Chloride von Na<sup>+</sup>, Cd<sup>++</sup>, Co<sup>++</sup>, Mn<sup>++</sup> und Ni<sup>++</sup> dann, wenn diese mit Serum 10 min bei 37 °C vor Zugabe des Substrates vorinkubiert werden (Tab. 3a). Wird dagegen mit Serum gestartet, mit und ohne gleichartige Vorinkubation

Tab. 2. Einfluß von Effektoren auf die katalytische Konzentration der Prolinarylamidase. Keine Vorinkubation.

Effektor	c [mmol · l <sup>-1</sup> ]	Relative Aktivität
Serumpool ohne Zusatz	—	=1,00
Ascorbinsäure	1,0	0,98
N-Ethylmaleinimid	1,0	0,71
Benzethoniumchlorid	1,0	- <sup>2)</sup>
L-Cystein	1,0	1,18
Dithioerythrit	1,0	0,98
EDTA, di-Natriumsalz	0,1	0,56
Heparin, Ammoniumsalz	0,05	~1,0 <sup>2)</sup>
Heparin, Lithiumsalz	0,05	~1,0 <sup>2)</sup>
p-Hydroxybenzoesäure	1,0	0,79
8-Hydroxychinolin	1,0	0,93
Hydroxylammoniumchlorid	1,0	1,00
Iodacetamid	1,0	0,81
Monoiodacetat	1,0	~1,0
N, N'-bis-(2-Hydroxyethyl)-glycin	50	~1,0
N-Morpholino-3-propansulfonsäure	50	~1,0
1,10-Phenanthrolin	1,0	1,06
Phenylmethylsulfonylfluorid	1,0	0,80 <sup>1)</sup>
Aprotinin (Trasylo <sup>®</sup> )	10000 KIE	1,02
Trypsininhibitor aus Sojabohnen	1 mg	0,95
Citronensäure, tri-Natriumsalz	10	1,03
NaCl	100	~1,0
MgCl <sub>2</sub>	1,0	1,31
CaCl <sub>2</sub>	1,0	1,21
ZnCl <sub>2</sub>	1,0	1,46
CdCl <sub>2</sub>	1,0	1,69
HgCl <sub>2</sub>	1,0	1,40
CoCl <sub>2</sub>	1,0	1,30
NiCl <sub>2</sub>	1,0	1,18
MnCl <sub>2</sub>	1,0	1,05
CuCl <sub>2</sub>	1,0	1,14

<sup>1)</sup> Auskristallisierend  
<sup>2)</sup> Leichte Trübung bzw. Ausfällung.

Tab. 3a. Metallproteinatbildung: Kinetik der Lichtabsorption (scheinbare Enzymaktivität).

Reaktionsansatz: Standardbedingungen, Konzentration der Metallsalze: stets 0,75 mmol/l, Zahlenwerte: Aus ΔA/min bei 405 nm berechnete scheinbare Enzymaktivitäten in U/l in den Meßbereichen 2. bis 10. und 10. bis 20. Minute. Beim 4. Ansatz zusätzlich berechnet aus ΔA/min bei (405–620) nm.

Start	Substrat		Serum		Serum + Substrat		Serum + Substrat				Sichtbare Trübung
	Serum	10	Substrat	10	keine	keine	keine	keine	405–620	405–620	
Vorinkubation min	10		10								
Meßwellenlänge	405		405		405		405		405–620		
Meßzeiten (min)	2.–10.	10.–20.	2.–10.	10.–20.	2.–10.	10.–20.	2.–10.	10.–20.	2.–10.	10.–20.	
NaCl	3,0	1,5	1,9	1,9	3,0	2,4	2,8	2,4	2,8	2,4	—
CdCl <sub>2</sub>	4,0	1,8	16,0	4,0	27,7	2,3	17,0	4,0	9,0	1,0	—
CoCl <sub>2</sub>	4,0	2,0	5,7	5,7	9,5	3,2	8,0	3,2	4,0	2,0	—
MnCl <sub>2</sub>	3,0	1,4	3,2	3,2	4,4	2,7	10,0	2,6	5,0	2,0	—
NiCl <sub>2</sub>	1,8	1,2	17,2	4,6	3,2	2,6	9,0	3,6	4,5	2,6	—
ZnCl <sub>2</sub>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+++

mit Substrat, bewirken  $\text{Cd}^{++}$  und  $\text{Co}^{++}$  in den ersten 2 bis etwa 10 min starke Absorptionszunahmen, die sich nach 10–20 min Reaktionszeit auf die Werte der Absorptionszunahmen ohne Effektor einpendeln. Durch Zweiwellenlängenmessungen  $\Delta A$  (405)–(620) können unspezifische Trübungseffekte teilweise eliminiert werden (Tab. 3a). Eine Basislinienkorrektur aus Gesamtspektren von 280–700 nm zu verschiedenen Reaktionszeiten war nicht möglich, da kein kurzweiliges Minimum der 405 nm-Bande meßbar ist – ähnlich wie bei den klinisch-chemischen Routinebestimmungen der Leucinarylamidase und der  $\gamma$ -Glutamylpeptidase mit *p*-Nitraniliden.

Aus den Gesamtspektren wurde eine Abgrenzung der scheinbaren (durch Metallproteinat-Eintrübung) von den echten (Metallaktivierung) Absorptionszunahmen pro Zeiteinheit gegenüber Ansätzen ohne Metallsalzzusatz versucht. Die (scheinbaren) katalytischen Aktivitäten nach Zusatz von 0,75 mmol/l  $\text{CdCl}_2$  lagen in der 10.–20. Minute bei 405 nm um 4,4 U/l, bei (405–495) nm um 3,5 U/l und bei (405–620) nm bei 1,8 U/l (gleichzeitiger Start mit Serum und Substrat). In der Anfangsphase der Enzymreaktion bis zu 10 min ergaben sich (scheinbare) Enzymaktivitäten um 15,8, 4,9 bzw. 2,8 U/l. Dieser Effekt nahm bei  $\text{Cd}^{++}$ -Konzentrationen von 0,025 bis 1,0 mmol/l stetig zu. Die Metallproteinat- und/oder Aktivierungseffekte stellen keine Sofortreaktionen dar: Vorinkubationen von  $\text{Cd}^{++}$  mit Serum, nicht mit Substrat, zeigen die Zeitabhängigkeit dieser Reaktionen (Tab. 3b).

Versuche zur Abtrennung oder Isolierung niedermolekularer Hemmstoffe im Serum mit niedrigen

Tab. 3b. Metallproteinatbildung: Cadmiumchlorid und Prolinarylamidase.

Reaktionsansatz: Standardbedingungen, Konzentration des  $\text{CdCl}_2$ : 0,75 mmol/l. Zahlenwerte: Aus den fortlaufendregistrierten Absorptionsänderungen  $\Delta A$  in den Meßbereichen 2. bis 10. und 10. bis 20. Minute in U/l ausgedrückte tatsächliche (ohne  $\text{Cd}^{++}$ -Zusatz) oder scheinbare (mit  $\text{Cd}^{++}$ -Zusatz) Enzymaktivitäten. Zusätzliche Angaben über deren prozentuale Veränderungen.

Start	Substrat					
Vorinkubation	Serum mit und ohne $\text{CdCl}_2$					
Meßwellenlänge	405 nm					
Meßzeiten (min)	2.–10.			10.–20.		
Vorinkubation	ohne	mit	%	ohne	mit	%
0 min	1,3	13,0	1100	1,6	1,8	113
5 min	1,5	5,0	330	1,4	0,9	64
10 min	1,5	3,0	200	1,4	0,4	28

oder hohen katalytischen Konzentrationen ergaben keine Hinweise auf deren Existenz. Nach Ultrafiltration (Collodium-Hülsen), zentrifugierender Filtration (Diaflo-Filterkegel) und Dialyse gegen verschiedene Pufferlösungen (Rühdialyse bei 4 °C) stiegen die katalytischen Konzentrationen im Konzentrat bzw. Innendialysat nicht an. Zusatz eines inaktiven Diffusats zu Innendialysaten, auch solchen mit verringerten Enzymaktivitäten, bewirkten weder Erhöhung noch Verminderung der katalytischen Konzentrationen der Innendialysate. Konzentrierende Ultrafiltration (Amicon-Zellen) bei 4 °C bewirkte eine zum Konzentrationsfaktor nicht proportionale Erhöhung der Enzymaktivität. Gelfiltrationsuntersuchungen an Sephadex G 25 und G 100 (1,0 × 100-cm Säulen) mit tridestilliertem Wasser und Natriumchloridlösungen verschiedener Konzentrationen (stufenweise und als lineare Gradienten) als Äquilibrier- und Elutionsmedium ergaben keine Hinweise auf die Existenz niedermolekularer Enzyminhibitoren.

#### Untersuchungen an Patientenserum

Die Messungen wurden aus zeitlichen und technischen Gründen in drei Serien durchgeführt.

*Serie I* Substratvergleiche: 87–115 Patientenserum.

*Endpunktmethode:* Aus Gründen besserer Vergleichbarkeit wurde jeweils die gleiche niedrige Substratkonzentration gewählt: für *L*-Prolin-*p*-nitranilid, *L*-Alanin-*p*-nitranilid und Glycin-*p*-nitranilid,  $c_s = 0,08$  mmol/l, für *L*-Leucin-*p*-nitranilid  $c_s = 4,00$  mmol/l und für  $\gamma$ -*L*-Glutamyl-*p*-nitranilid  $c_s = 3,60$  mmol/l. Die Werte aller Stichproben weisen eine links-schiefe, nach logarithmischer Transformation eine *Gauß*'sche Verteilung auf.

Die Wertepaare in den Substratgruppen *L*-Leucin-*p*-nitranilid: *L*-Alanin-*p*-nitranilid zeigen eine lineare Regression mit  $y = -1,78 + 0,95x$  und eine befriedigende Korrelation mit  $r = 0,81$ . Die Paardifferenzen sind im *Wilcoxon*-Test und – nach logarithmischer Transformation – im *t*-Test nach *Student* mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p = 0,05$  signifikant (Tab. 4).

In den Substratgruppen *L*-Leucin-*p*-nitranilid: Glycin-*p*-nitranilid und *L*-Leucin-*p*-nitranilid:  $\gamma$ -*L*-Glutamyl-*p*-nitranilid einerseits, und *L*-Leucin-*p*-nitranilid: *L*-Prolin-*p*-nitranilid und  $\gamma$ -*L*-Glutamyl-*p*-nitranilid: *L*-Prolin-*p*-nitranilid andererseits sind die Werte miteinander nicht korreliert ( $r = 0,4$ ).

Bei einer Einzelauswertung von 91 Seren mit Leucinarylamidaseaktivitäten im Normbereich fallen 12

Tab. 4. Substratvergleich mit Patientenseren, Serie I (siehe Text). Zeichenerklärung siehe Legende zu Tab. 5.

Substratgruppen <i>p</i> -Nitroanilide von	Statistische Kenngröße			Q	Regression			t-Test t	Wilcoxon C
	n	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$		K	a	b		
L-Leucin	115	16,8	0,81	0,85	0,81	-1,78	0,95	4,70	-5,52
L-Alanin	115	14,3	0,98						
L-Leucin	114	17,9	1,39	0,06	0,23	0,21	0,06	12,3	16,9
Glycin	114	1,09	0,06						
L-Leucin	123	17,3	0,95	2,84	0,37	-69,8	8,61	7,47	-7,56
L-Glutaminsäure	123	49,2	4,56						
L-Leucin	91	15,9	0,72	0,30	0,07	0,20	0,01	21,5	17,6
L-Prolin	91	0,48	0,08						
L-Glutaminsäure	87	42,4	4,59	0,01	0,10	0,53	-0,01	9,15	26,3
L-Prolin	87	0,46	1,89						

Seren mit deutlich bis stark erhöhten Prolinarylamidaseaktivitäten auf; sie verhalten sich jedoch unauffällig gegenüber den vier anderen Substraten.

Serie II Substratvergleiche: 88–127 Patientenseren.

**Kontinuierliche Methode:** Substratkonzentration für L-Prolin-*p*-nitranilid  $c_s = 0,14$  mmol/l, sonst wie bei Serie I. Die Ergebnisse entsprechen denen der Serie I. Die graphischen Darstellungen (Abb. 5–9) und die statistische Auswertung zeigen wiederum, daß eine Korrelation ( $r = 0,81$ ) nur bei den Wertepaaren der Gruppe L-Leucin-*p*-nitranilid: L-Alanin-*p*-nitranilid erkennbar ist (Tab. 5).

Die Einzeldifferenzen können aufgrund des zweiseitigen Kolmogoroff-Smirnoff-Tests mit  $p = 0,01$  in

der Regel als nicht normal verteilt angesehen werden. Sie (und die Paardifferenzen untereinander) sind im Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben mit  $p = 0,05$  signifikant. Ihr absoluter Betrag spiegelt die verschiedenen Hydrolysegeschwindigkeiten wider.

Die Einzelbetrachtung in der Gruppe L-Leucin-*p*-nitranilid: L-Prolin-*p*-nitranilid zeigt (Abb. 8) 11 Seren mit erhöhter Leucinarylamidase, jedoch unauffälliger Prolinarylamidase-Aktivität; umgekehrt weisen 10 Seren hohe hydrolytische Aktivitäten gegenüber L-Prolin-*p*-nitranilid, jedoch normale gegenüber L-Leucin-*p*-nitranilid auf. Ähnliches gilt für die Gruppe L-Glutamyl-*p*-nitranilid: L-Prolin-*p*-nitranilid (Abb. 9).

Tab. 5. Substratvergleich mit Patientenseren, Serie II (siehe Text).

n = Anzahl der gepaart untersuchten Seren verschiedener Patienten  
M = Median  
 $\bar{x}$  = Arithmetischer Mittelwert  
 $s_{\bar{x}}$  = Streuung  
 $\Delta\bar{x}$  = Differenz von  $\bar{x}$  beider Gruppen  
 $\Delta s_{\bar{x}}$  = Differenz der Streuung  
Q = Quotient von  $\bar{x}$  beider Gruppen  
C = Gemessene Prüfgröße im Wilcoxon-Test

0-Hyp = Null-Hypothese: Die Meßwerte eines Paares von Substraten aus je einem Patientenserum sind voneinander nicht signifikant unterscheidbar.  
K = Regressionskoeffizient einer linearen Regression  
a, b = Glieder und Konstanten der linearen Regressionsgleichung  
F = Gemessene Prüfgröße in der Varianzanalyse  
t = Gemessene Prüfgröße im gepaarten t-Test nach Student (für Tab. 4).

Substratgruppen <i>p</i> -Nitroanilide von	Statistische Kenngrößen						Wilcoxon		Regression			Varianz-	
	n	M	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	$\Delta\bar{x}$	$\Delta s_{\bar{x}}$	Q	C	0-Hyp.	K	a	b	Analyse  F  0,05
L-Leucin	112	14,55	16,73	0,810	2,366	0,517	0,86	-5,237	abgel.	0,841	-2,179	0,988	264,5
L-Alanin	112	12,50	14,36	0,953									
L-Leucin	110	14,90	18,05	1,372	16,96	1,359	0,06	-9,267	abgel.	0,227	0,910	0,010	6,1
Glycin	110	0,92	1,091	0,061									
L-Leucin	127	14,90	17,31	0,946	31,88	4,265	2,84	-7,857	abgel.	0,367	18,83	1,573	18,81
L-Glutaminsäure	127	28,90	49,19	4,521									
L-Leucin	90	14,35	15,84	0,693	15,37	0,704	0,03	-0,238	abgel.	0,079	0,622	-0,009	0,5
L-Prolin	90	0,310	0,476	0,081									
L-Glutaminsäure	88	26,05	42,40	4,597	41,95	4,585	0,01	-8,147	abgel.	0,158	0,322	0,003	2,21
L-Prolin	88	0,310	0,449	0,080									

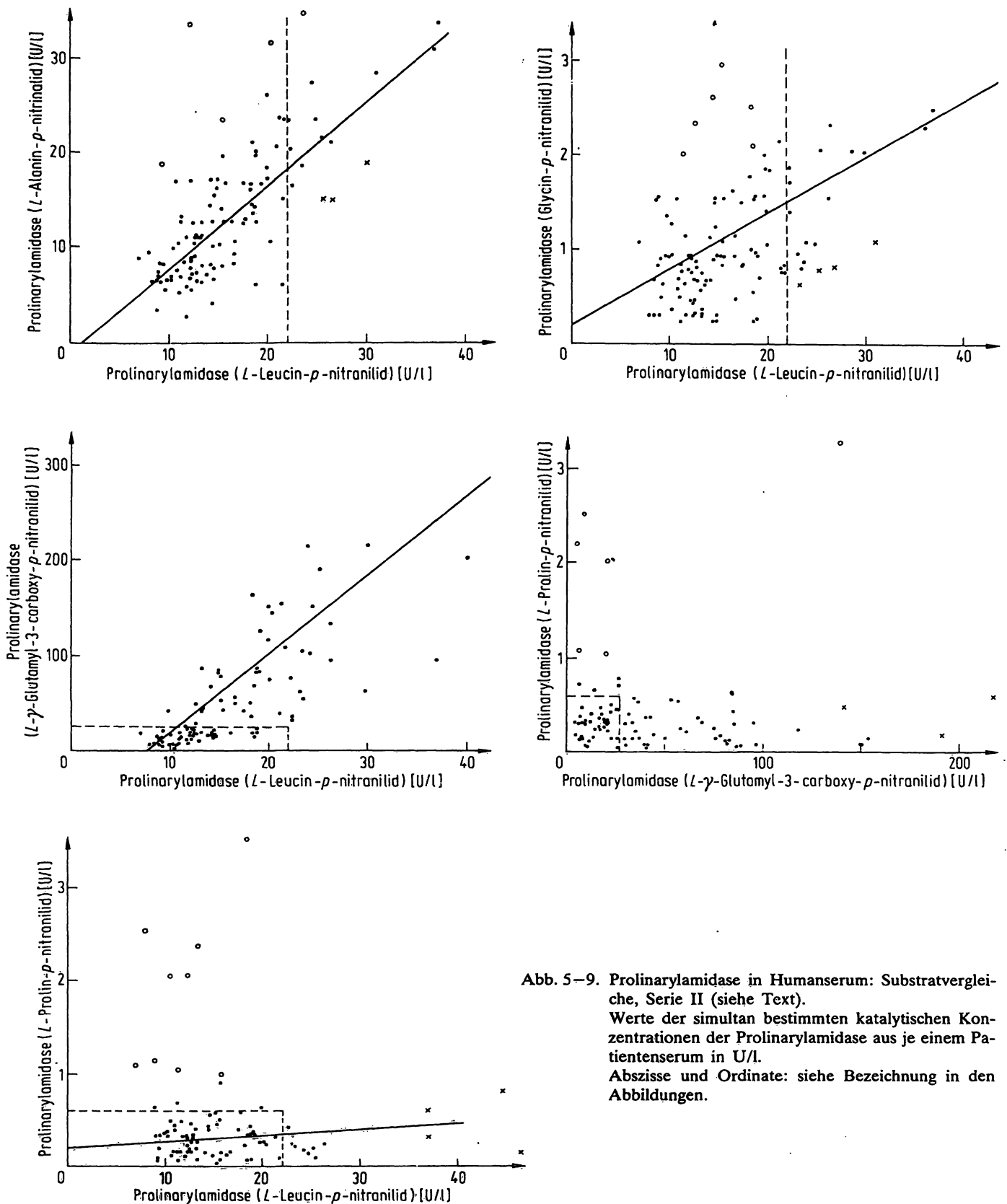


Abb. 5-9. Prolinarylamidase in Humanserum: Substratvergleiche, Serie II (siehe Text). Werte der simultan bestimmten katalytischen Konzentrationen der Prolinarylamidase aus je einem Patientenserum in U/l. Abszisse und Ordinate: siehe Bezeichnung in den Abbildungen.

**Serie III** Vorläufiger „Normbereich“ für Prolinarylamidase: 130 Patientenserum, kontinuierliche Methode.

Für das Routineverfahren festgelegte Substratkonzentration für L-Prolin-p-nitranilid  $c_s = 1,53$  mmol/l.

Anhand eines selektierten Patientengutes (vorwiegend Patienten mit banalen oder gastrointestinalen Erkrankungen) wird bei links-schiefer Verteilung ein Median von  $M = 3,10$  U/l und ein arithmetischer Mittelwert von  $\bar{x} = 4,86$  U/l mit einer Streuung von  $s = 4,70$  U/l gefunden. Nach Elimination der oberen

Extremwertgrenze (90. Oter Zentilwert) ergibt sich  $\bar{x} = 3,65$  U/l,  $s = 1,98$  U/l ein Grenzwert von  $\bar{x}' + 2,35s' = 8,20$  U/l. Somit wird als vorläufiger „Normbereich“: „0–8 U/l“ festgelegt. Für die patientenbezogene Einzelauswertung werden willkürlich Werte von 8,1 ... 14,9 U/l mit „leicht erhöht (+)“, von 15,0 ... 29,9 U/l mit „erhöht (++)“ und  $\geq 30,0$  U/l mit „stark erhöht (+++)“ bezeichnet.

Die Ergebnisse dieser Auswertung und mögliche klinische Gesichtspunkte werden an anderer Stelle mitgeteilt werden.

### Diskussion

Die vorliegende Untersuchung soll einen Beitrag darstellen zur Frage, ob organunspezifische pathobiochemische Reaktionsabläufe im Bereich der Grundsubstanz durch Bestimmung der katalytischen Konzentrationen bestimmter Enzyme im Blutserum faßbar werden. Für die klinisch-chemische Diagnostik, insbesondere im Falle der Longitudinalbeobachtung, sind routinefähige quantitative Analyseverfahren erforderlich. Hierfür eignen sich für die Bestimmung von Enzymen des Protein- bzw. Peptidabbaus und -umbaus die sog. „chromogenen Substrate“ in besonderem Maße. In vorliegendem Falle wird das Prinzip der Hydrolyse von Aminosäure- bzw. Peptid-Arylamiden (z.B. bei *L*-Leucin-*p*-nitranilid, *L*- $\gamma$ -Glutamyl-*p*-nitranilid, Tosylglycyl-*L*-propyl-*L*-arginin-*p*-nitranilid) verwendet, um Enzymaktivitäten zu erfassen, die am Kollagenabbau beteiligt sein können. Dabei wird die z.Z. in der klinisch-chemischen Diagnostik heftig geführte Diskussion zur Substratspezifität gegenüber diesem Substrat und dessen Carboxyderivat nicht berührt. Ziel dieser Untersuchung ist die Ausarbeitung eines Verfahrens zur quantitativen Bestimmung der katalytischen Konzentration einer „Prolinarylamidase“ mittels *L*-Prolin-*p*-nitranilid unter Routinebedingungen an Patientenserum.

„Arylamidase“ ist ein Überbegriff für ein komplexes System von Peptidasen mit überschneidenden Substratspezifitäten, Isoenzymen und multiplen Formen (1–3).

„Prolinarylamidase“ sei die vorläufige Bezeichnung einer Exopeptidase mit Präferenz für *L*-Prolin-*p*-nitranilid und - $\beta$ -naphthylamid und ist möglicherweise identisch mit der Dipeptidhydrolase „Prolindipeptidase“ (*L*-Prolylaminosäurehydrolase, *L*-Prolylglycindipeptidase, Iminodipeptidase, Prolinase, EC 3.4.13.8, früher EC 3.4.3.6).

Dieses Enzym katalysiert die hydrolytische Spaltung der Dipeptidbindung von *L*-Prolylaminosäure in *L*-Prolin und Aminosäure (4–9).

Klassisches Substrat ist *L*-Prolylglycin; hydrolysiert werden *L*-Prolylglycylglycin, Prolyl-*L*-prolin und Salmin, nicht dagegen die entsprechenden *L*-Hydroxyprolinerivate, Aminoaryl-*L*-Prolin („Prolidase“), *L*-Prolyl-*L*-arginin-, Glycyl-*L*-prolyl- und Glycyl-*L*-prolyl-*L*-alanin-peptide sowie *L*-prolinfreie Di- und Tripeptide (10).

Die Eigenschaften der untersuchten Prolinarylamidase entsprechen z.T. denen der Prolyldipeptidase, wobei der Hauptunterschied im gegensinnigen Verhalten gegenüber  $\text{Co}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$  und  $\text{Ca}^{++}$  liegt. Mikrosomale Arylamidasen werden durch  $\text{Co}^{++}$  aktiviert (1, 11), lysosomale inhibiert (4); bei Sicherung einer  $\text{Me}^{++}$ -Aktivierung könnte die Prolinarylamidase im Humanserum mikrosomalen Ursprungs sein. Zugabe von  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Cd}^{++}$  und  $\text{Co}^{++}$ , in geringerem Maße von  $\text{Mn}^{++}$ ,  $\text{Ca}^{++}$  oder  $\text{Mg}^{++}$  zu Humanserum führt zu einer sofort einsetzenden und zunehmend langsamer verlaufender Eintrübung aufgrund einer Metallproteinatbildung. Diese kann auch durch Messung von Gesamtspektren zu verschiedenen Zeiten einer fortlaufenden Enzymreaktion von echten Aktivierungseffekten nicht eindeutig abgegrenzt werden.

Die Untersuchung des Arylamidasen-„Clusters“ im Humanserum deutet auf eine diagnostische Sonderstellung der Prolinarylamidase. Der daraufhin ermittelte vorläufige Entscheidungsbereich für unauffälliges Verhalten wird mit 0–8 U/l angenommen. In einer anschließenden prospektiven Pilot-Studie sollen Erfahrungen zur diagnostischen Sensitivität und Spezifität bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, Bindegewebserkrankungen und bei der Strahlentherapie von Tumorerkrankungen gesammelt werden.

### Danksagung

Herrn Professor Dr. *Reisert* sei an dieser Stelle für die Realisierbarkeit und Unterstützung für diese Studie ausdrücklich gedankt. Dankbare Anerkennung sei Frau *Ingrid Kirstein* für ihre sorgfältige technische Mitarbeit ausgesprochen. Besonders bedanken möchten wir uns bei Herrn Dr. *Koller*, Abt. Allgemeine Biochemie, Medizinische Forschung der Firma Boehringer Mannheim und damit auch dieser Firma für die statistische Auswertung.

### Nachtrag

Inzwischen konnte in einer gezielten klinischen Studie an 90 selektierten Patienten die Sonderstellung der Prolinarylamidase gegenüber carcinoembryonalem Antigen (CEA) und Tennessee polypeptide antigen (TPA) sowie 3 Dipeptidylarylamidasen gesichert werden.

**Literatur**

1. Appel, W. (1974) Peptidasen. In: Methoden der enzymatischen Analyse, 3. Aufl. (Bergmeyer, H. U., ed.) Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße, Band 1, S. 987ff.
2. Appel, W., Huth, E. & Hermann, H. (1976) Immunität und Infektion 4, 182–189.
3. Lorentz, K., Marunowski, A. & Ritter, U. (1974) Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 12, 468–473.
4. Lorentz, K., Koch, C.-D., Flatter, B. & Molz, J. (1975) Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 13, 45–48.
5. Mäkinen, K. K. (1969) Acta Chem. Scand. 23, 1409–1438.
6. McDonald, J. K., Leibach, F. H., Grindeland, R. E. & Ellis, S. (1968) J. Biol. Chem. 243, 4143–4150.
7. Oya, H., Nagatsu, T. & Harada, M. (1970) Experientia 26, 252–253.
8. Unger, Th. & Struck, H. (1977) Clin. Chim. Acta 78, 113–120.
9. Hopsu-Havu, V. K. & Sarimo, S. R. (1967) Hoppe-Seyler's, Z. Physiol. Chem. 348, 1540–1546.
10. Sarid, S., Berger, A. & Katchalski, E. (1962) J. Biol. Chem. 237, 2207–2213.

Prof. Dr. rer. nat. Walter Appel  
Dipl.-Chem., Klin. Chem.  
Zentrallaboratorium der St.-Vincentius-Kranken-  
häuser  
Südenstraße 32  
D-7500 Karlsruhe 1