Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
12. Jg. 1974, S. 468–473

Disk-Elektrophorese multipler Formen von Arylamidasen¹⁾

Untersuchungen über Arylamidasen menschlicher Gewebe, I. Mitteilung

Von K. Lorentz, Alexandra Marunowski²⁾ und U. Ritter

Aus der I. Medizinischen Klinik (Direktor: Prof. Dr. U. Ritter) der Medizinischen Hochschule Lübeck

(Eingegangen am 22. März/24. Juli 1974)

Die disk-elektrophoretische Trennung von Arylamidasen menschlicher Herkunft ergibt organtypische Muster, die von denen der γ -Glutamyltransferase (EC 2.3.2.2) abweichen. Das Serum Gesunder zeigt nur eine anodische Fraktion (Typ 1), zu der bei hepatobiliären Erkrankungen bis zu drei langsamer wandernde Banden in bestimmter Reihenfolge kommen (Typen 2, 3 und 4). Ihr Erscheinen bedeutet ein empfindliches Indiz für den Eintritt einer Cholestase, ist jedoch nicht krankheitsspezifisch. Die Lokalisation der vier Fraktionen korrespondiert nicht mit dem Verteilungstyp in Organextrakten, insbesondere ist die Wanderungsgeschwindigkeit der anodischen Bande höher als die in anderen Geweben. Durch Einwirkung von Neuraminidase werden alle schnellwandernden Arylamidasefraktionen verschiedener Organe so verlangsamt, daß eine einheitliche Beweglichkeit resultiert. Die Mehrzahl der langsamen Banden verschwindet. Ähnliche Beobachtungen bei der γ -Glutamyltransferase führen zu der Hypothese, daß die Freisetzung von Enzymen mikrosomaler Herkunft in das Serum physiologischerweise nach glykosidischer Bindung an Neuraminsäure erfolgt.

Disc-electrophoresis of multiple forms of arylamidase. Studies on human arylamidases, I

The disc-electrophoresis of arylamidases in human tissues yields typical patterns quite different from those of γ -Glutamyltransferase. There is only one fast fraction in normal sera (type 1); three additional slower bands in a certain sequence (types 2, 3, and 4), indicate the onset of biliary stasis, but they are without diagnostic specificity. The patterns do not correspond to the distribution of multiple forms observed in any of the tissue homogenates; in particular, the anodic fraction of the serum is the fastest moving activity of any tissue. Neuraminidase treatment abolishes the majority of the slowly migrating fractions and so retards the different anodic bands that a single band of uniform mobility is produced. Similar effects in the separation of γ -Glutamyltransferase lead to the conclusion that the release of microsomal activities into the serum is accompanied by the formation of a glycosidic linkage between the enzyme and neuraminic acid.

α -Aminoacylpeptid-Hydrolasen (EC 3.4.11.) spalten L-Aminosäuren bzw. Glycin aus Peptiden, Aminosäureamiden oder -arylamiden ab, sofern die N-terminale Aminosäure eine freie α -Aminogruppe trägt und sterische Ähnlichkeit mit L-Leucin aufweist (1). Wegen dieser geringen Substratspezifität wird nach der intrazellulären Lokalisation der Enzyme zwischen „Aminopeptidasen“ des Cytosols (EC 3.4.11.1), die bevorzugt L-Aminosäureamide und Peptide spalten, und mikrosomalen „Arylamidasen“ (EC 3.4.12.1), die vor allem L-Aminosäurearylamide hydrolysieren, unterschieden (2, 3). Letztere katalysieren die kinetisch meßbare Freisetzung von 4-Nitroanilin aus geeigneten Substraten nach

die zur Bestimmung der Enzymaktivität im Serum dient.

Daher versuchten wir, in dieser und den folgenden Mitteilungen, die Arylamidasen im Serum und in Organhomogenaten von anderen Aktivitäten abzugrenzen, das Verhalten ihrer multiplen Formen zu charakterisieren, ihre Verteilung bei der Disk-Elektrophorese zu beschreiben und ihre Bedeutung für die klinische Differential-

diagnose zu prüfen. Weiter untersuchten wir die Eignung verschiedener Substrate für die Messung der Arylamidaseaktivität in Geweben und Seren sowie die Bedingungen für deren optimale Bestimmung unter Routineverhältnissen.

Material und Methoden

Wir bestimmten das Isoenzymmuster aus den Seren von 30 Gesunden und 185 Patienten mit verschiedenen Erkrankungen unmittelbar nach der Blutentnahme oder nach verschiedener Lagerungsdauer der Seren bei -28°C sofort nach dem Auftauen. Außerdem wurden Gewebe aus Lebermetastasen sowie makroskopisch und histologisch unauffällige Proben von Herz, Hirn, Niere, Nebenniere, Leber, Milz, Pankreas, Prostata und Dünndarmmukosa 12–24 h post mortem entnommen, mit Natriumchloridlösung (155 mmol/l) bei 4°C blutfrei gespült und nach Abtrennung des Bindegewebes in etwa 0,2 g schwere Stücke zerschnitten. Sie wurden anschließend bis zur weiteren Aufarbeitung, ebenso wie ein mehrfach mit Natriumchloridlösung (155 mmol/l) gewaschenes Erythrocytenkonzentrat und eine nach Marks (4) hergestellte Leukocytenpräparation bei -28°C eingefroren.

¹⁾ Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

²⁾ Die Arbeit enthält wesentliche Teile der Inauguraldissertation von A. Marunowski.

Unmittelbar vor dem Test tauten wir diese Proben auf, versetzten je 1 g Gewebe oder Konzentrat mit 5 ml Triton X-100 (10 g/l) und homogenisierten 3×10 s unter Eiskühlung mittels Ultra-Turrax (Jahnke & Kunkel, Staufen) und anschließend 3×20 s mit einem Glaspistill nach Potter-Elvehjem. Die Homogenate wurden bei 4°C 30 min mit 17 000 g bzw. 60 min mit 100 000 g zentrifugiert und die Überstände elektrophoretisch aufgetrennt.

Reagenzien³⁾

Riboflavin, TEMED und Triton X-100 lieferte Serva (Heidelberg), Neuraminidase Boehringer (Mannheim) und die übrigen Substanzen Merck (Darmstadt), wobei Acrylamid in Chloroform und BIS in Aceton umkristallisiert wurden (5).

Acetylalaninnaphthyl-(2)-amid stellten wir aus ANA durch Acetylierung mit Essigsäureanhydrid in Dioxan und anschließende Fällung mit Diäthyläther her. Umkristallisation in Tetrahydrofuran unter Zusatz von Cyclohexan; Fp 180°C , Ausbeute 90% d. Th.

Alle Lösungen wurden, wenn nicht anders erwähnt, mit bidest. Wasser hergestellt. Die Ansätze zur Disk-Elektrophorese entsprechen bis auf die Lösungen A und E. den Angaben von Davis (nach l. c. 5).

Elektrodenpuffer (Tris 5 mmol/l, Glycin 38 mmol/l) pH 8,3; Ionenstärke 0,025.

Trenngel (1 Tl.³⁾ A, 2 Tle. B und 4 Tle. C)

- A. Borat 420 mmol/l, TEMED 15,3 mmol/l, pH 8,8.
- B. Acrylamid 4,2 mmol/l, BIS 48 mmol/l.
- C. Ammoniumperoxodisulfat 6,1 mmol/l.

Sammelgel (1 Tl. D, 2 Tle. E, 1 Tl. F und 4 Tle. G)

- D. Tris 215 mmol/l, TEMED 30,7 mmol/l, pH 6,8.
- E. Acrylamid 2,25 mol/l, BIS 130 mmol/l.
- F. Riboflavin 100 mmol/l.
- G. Saccharose 1,16 mol/l.

Lösung C 8 h, die anderen 5 d haltbar (Kühlschrank).
Bromphenolblaulösung (10 g/l Äthanol)
Phosphatpuffer (50 mmol/l) pH 7,0.

Substrat-Diazonium-Lösung (ANA 0,95 mmol/l, Echtblausalz B 0,7 g/l, Phosphat 50 mmol/l) pH 7,0: 60 min haltbar. – Bei Verwendung von Acetyl-ANA werden 32 mg mit 3,5 ml DMSO gelöst und nach Zugabe von 70 mg Echtblausalz B mit Puffer auf 100 ml aufgefüllt. – Zum Ausschluß einer durch aromatische Verbindungen bedingten Pseudoreaktion wurde Phosphatpuffer mit Echtblausalz ohne Substrat verwendet.

Substratpuffer (*L*-Aminosäure-4-nitroanilid 5 mmol/l, Tris-Salzsäure 50 mmol/l) pH 7,5.
Trichloressigsäure (200 g/l)
Essigsäure (70 g/l)
Amidoschwarz 10 B (20 g/l) in Essigsäure.
Dissoziationslösung (2-Mercaptoäthanol 200 mmol/l, Tris 10 mmol/l) pH 8,4.

Geräte

Wir trennten die Proben in 8 cm langen Duranglasröhrchen (mit 0,5 cm lichter Weite und plangeschliffenen Enden) mit der analytischen Apparatur „Standard-PAA“ (Biomol, Ilvesheim) und beurteilten die Gelzylinder durch Ausmessen der Laufstrecke, da die Densitometrie mittels Pherogrammauswerter 2602, Photometer Eppendorf 1101 M und Kompensationsschreiber 4412 (sämtlich Netheler & Hinz, Hamburg) keine weiteren Informationen lieferte. Photometer und Schreiber dienten für die ki-

netischen Tests (s. II u. III. Mitteilung) bzw. für die Messung der Eluate aus den segmentierten Zylindern bei 405 nm.

Vorgehen

Zum Test auf Polymerbildung (6) wurden gleiche Volumina Organüberstand bzw. Serum und Dissoziationslösung (Kontrollen in Boratpuffer ohne 2-Mercaptoäthanol) gemischt und 1 h bei 25°C sowie anschließend 12 h bei 4°C gehalten. Die anderen Proben wurden ohne Vorbehandlung verwendet.

In den senkrecht gestellten Röhrchen, deren untere Enden in der Apparatur mit „Parafilm“ (Marathon Prod., Neenah, Wisc. USA) verschlossen waren, wurden in üblicher Weise nacheinander Trenngel 5 cm und Sammelgel 2,5 cm hoch polymerisiert (5), nach Entfernen des Parafilms im gefüllten Anodenteil der Kammer justiert und, nach Einfüllen des Elektrodenpuffers (mit einigen Tropfen Bromphenolblau) in den Kathodenteil, mit $10\text{--}20\ \mu\text{l}$ Probe (unter Saccharosezusatz bei den Organextrakten) beschickt.

Für die ersten 60 min legten wir eine Spannung von 50 V, für die folgenden 3 h von 80 V an, bis die von Bromphenolblau gebildete Front das untere Röhrchenende erreichte. Bei Auftrennung von Seren kann die Laufdauer bis zum Eintreffen der markierten Albuminfraktion verlängert werden.

Zur Proteinfärbung wurden die (nach l. c. 5) aus den Röhrchen entfernten Gele 15 min in Trichloressigsäure oder Sulfosalicylsäure (200 g/l) gelegt, 2×15 min in Wasser gespült und nach 10 min Anfärbung in Amidoschwarz mit mehrfach erneuerter Essigsäure über 24 h entfärbt. Die Arylamidaseaktivität wurde durch 60 min lange Inkubation der Gelzylinder in Substrat-Diazonium-Lösung bei 35°C , anschließende Fixierung für 10 min in Trichloressigsäure und mehrfaches Spülen in Essigsäure dargestellt. Die dunkelroten Banden erschienen auf hellem Untergrund und waren bei Aufbewahrung der Gele in Essigsäure 6 Monate ohne Intensitätsverlust haltbar.

Die optimalen Bedingungen des Verfahrens ergaben sich aus Versuchen nach der Methode von Smith & Rutenburg (7). Die Lokalisation der Enzymaktivität folgte weitgehend dem Vorgehen von Beier et al. (8), während zum quantitativen Test 0,5 cm breite Gelsegmente in 0,70 ml Substratpuffer zerrieben und $2\text{--}5$ h bei 25°C inkubiert wurden. Nach optischer Beurteilung der gelb werdenden Suspensionen wurden die Polyacrylamidpartikel, evtl. nach Zusatz von 100 mmol/l Salzsäure, abgeschleudert (5 min Zentrifuge 3200 Eppendorf) und die Überstände in der 1 cm-Mikroküvette gemessen. Mit derselben Technik bestimmten wir die Verteilung der Aktivität von γ -Glutamyltransferase (EC 2.3.2.2.) im Serum durch Elution der Gelsegmente mit 0,5 ml Substratpuffer zur γ -Glutamyltransferase-Bestimmung (*L*-Glutaminsäure-5-(4-nitroanilid) 4 mmol/l, Glycylglycin 40 mmol/l, Tris 185 mmol/l pH 8,25).

Außerdem untersuchten wir den Einfluß von Neuraminidase durch Inkubation von 0,5 ml Serum (oder Organextrakt) mit 100 mU Neuraminidase in 0,2 ml Acetatpuffer 0,5 mol/l pH 5,0 über 8 h bei 37°C , wobei im Ansatz ein pH-Wert von 6,0 bis 6,2 resultierte.

Ergebnisse und Diskussion

Spezifität und Reproduzierbarkeit

Nur Erythrocytenhämolyat und die mit der Front wandernden Pigmente der Blasengalle produzieren mit Diazoniumlösung eine Pseudoreaktion. Acetyl-ANA wurde von keinem Organextrakt oder Serum gespalten. Der Vergleich von histochemischer Darstellung und dem Umsatz von *L*-Aminosäure-4-nitroaniliden ergab mit allen Organhomogenaten übereinstimmende Muster. Das Alaninderivat wurde 1,2 bis 1,6 mal schneller als die Leucinverbindung, 5 mal rascher als das Prolinanaloge und eineinhalb- (Milz, Leber, Pankreas) bis zehn-

³⁾ Benutzte Abkürzungen:

ANA	<i>L</i> -Alaninnaphthyl-(2)-amidhydrobromid
BIS	N, N'-Methylenbisacrylamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyläthylendiamin
Tl(e)	Volumenteil(e)

fach (Niere) so schnell wie Acetyl-L-alanin-4-nitroanilid umgesetzt. Die beiden letztgenannten Substrate wurden durch Seren praktisch nicht gespalten.

Die Lokalisation und Breite der enzymhaltigen Fraktionen variierte bei der Zehnfachbestimmung aus derselben Organ- oder Serumprobe bei 5,8 cm Laufstrecke (Albumin) um jeweils maximal $\pm 0,1$ cm. Im Gegensatz zu Methoden, die Stärke (2, 9, 10, 11), Agar (12), Papier (13), Celluloseacetat (14) oder Polyacrylamid (7, 15) verwenden und unbefriedigende (9, 12) oder photographisch nicht dokumentierbare (2, 10, 11, 13, 14, 15) Trennungen liefern, erlaubt das beschriebene Verfahren, ebenso wie die ähnliche Technik von Dingjan et al. (16), die Darstellung eindeutiger, gut reproduzierbarer Isoenzymmuster, auch bei Mischung von zwei Organextrakten (Abb. 1). Dies ändert sich weder durch Zusätze von Saccharose (Endkonzentration 20 g/l), Humanalbumin (50 g/l) oder DMSO (200 mmol/l), noch durch Vorinkubation mit Dissoziationslösung. Dies macht eine bei Aminopeptidasen (EC 3.4.11.1) beobachtete Polymerbildung (6) als Ursache für das Auftreten langsam wandernder Banden unwahrscheinlich.

Multiple Formen

Zwischen der Aktivitätsverteilung und den Maxima der Proteinfärbung bestand kein Zusammenhang. Lagerung und mehrfaches Auftauen hatten keinen Einfluß auf die Enzymmuster, die bei 17 000 g- und 100 000 g-Überständen identisch ausfielen, da das Sammelgel alle Partikel am Start zurückhielt.

Die Arylamidasemuster waren an jeweils 8 nach Lebensalter und postmortaler Entnahmezeit unterschiedlichen Proben eines Organs konstant.

Tabelle 1 stellt alle Ergebnisse, Abbildung 1 eine Auswahl typischer Trennungen dar. Beide lassen bis zu vier (I–IV) Fraktionen erkennen, von denen die erste nur bei 2 von 8 Leberextrakten eine Aufspaltung (in Ia u. Ib) aufwies. Allein in der Niere änderte sich das Muster mit

Abb. 1. Pherogramme von Seren und 17 000 g-Überständen folgender Organe (von links): Serum beim Gesunden (Typ 1), bei Verschlauikterus (Typ 4), bei Lebermetastasen (Typ 3); Dünndarm, Leber, Pankreas, Niere; Pankreas-Leber, Leber-Niere (Mischungen). — Sammelgel oben (Kathode), Trenngel unten (Anode), Darstellung mit ANA (s. Methodik).

dem Lebensalter, indem die nur beim Kind in den Papillenspitzen und dem Markanteil nachweisbare Bande II verschwand. Dort erschien beim Erwachsenen die Bande I der Nierenrinde.

Unabhängig vom Alter und Geschlecht trat in allen 30 Seren von Gesunden nur eine Bande mit der Lokalisation 4,8–5,4 cm (Mitte 5,1 cm = Wanderungsquotient 0,86) auf. Sie folgte unmittelbar dem Albumin (5,4–6,2 cm, Mitte 5,8 cm = Wanderungsquotient 1,0) und war damit schneller als jede Fraktion der Organhomogenate (Abb. 1). Die erste Zone war auch bei den 185 Seren der Erkrankten ausnahmslos vorhanden und am stärksten ausgebildet.

Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen der Literatur (7, 9, 11, 14, 17) weitgehend überein, wenn auch Schoebel & Wewalka (10) ein oder zwei Serumenzyme und andere Autoren mit ANA zwei (15, 18), mit dem Leu-

Tab. 1. Lokalisation der Arylamidaseaktivität in Polyacrylamid (Angabe in cm Distanz vom Start). Unterstrichene Zahlen = intensive Anfärbung, Zahlen in Klammern = schwache oder inkonstante Banden.

Organ	IV	III	II	Ib	Ia
Lunge				<u>4,0–4,4</u>	
Leber				<u>4,2–4,4</u>	4,4–4,8
Metastasenleber					<u>4,4–4,8</u>
Pankreas			<u>3,7–4,0</u>		<u>4,4–4,6</u>
Milz			<u>3,9–4,0</u>		
Prostata					4,6–5,2
Niere				<u>4,0–4,4</u>	(4,4–4,8)
Nebennierenrinde					<u>4,7–4,9</u>
Jejunum		<u>2,7–3,0</u>	<u>3,4–3,7</u>	4,0–4,2	
Knochen				3,9–4,2	
Blasengalle	2,5–2,6	3,3–3,4		<u>4,1–4,4</u>	
Hämolysat			3,5–3,8		
Leukocyten				4,2–4,3	

cinanalogen aber nur eine (15, 17) Fraktion im Serum Gesunder nachwies. Da nach unseren Ergebnissen an segmentierten Zylindern beide Substrate identische Muster liefern, dürfte es sich um Artefakte handeln. Vielmehr zeigte das Auftreten einer weiteren Bande in jedem von uns untersuchten Fall eine Erkrankung hepatobiliären Ursprungs an, auch wenn die Arylamidaseaktivität des Serums noch im Normalbereich (s. III. Mitteil.) lag. Falsch positive Fälle wurden hierbei nicht beobachtet.

Dabei erschienen nacheinander in obligater Reihenfolge neben der anodischen Fraktion, die dann häufig bis in den Bereich von Ia reicht (Typ 1), die Banden IV (Typ 2), IV + IIIa (Typ 3) und zuletzt IV + IIIa + IIa (Typ 4). Andere Kombinationen fehlten (Tab. 2). Die Zonen IIa und IIIa wanderten etwas schneller als II und III bei den Organhomogenaten, ihre Zuordnung blieb daher zweifelhaft. Zwischen dem Muster der multiplen Formen und der Aktivität von Arylamidase und alkalischer Phosphatase bestand nur eine lockere Beziehung (Abb. 2): Der Median der lognormal verteilten Enzymaktivität in Seren stieg mit höherer Zahl der Arylamidasebanden an. Zur Höhe der γ -Glutamyltransferase im Serum ließ sich keine Beziehung nachweisen.

Wir beurteilten den diagnostischen Wert dieser Muster nach Kollektiven gleicher Symptomatik und Pathogenese, da morphologisch einheitliche Erkrankungen (z. B. Lebercirrhose) weder gleiche klinisch-chemische Parameter (Enzymaktivitäten im Serum, Bilirubinspiegel, Gerin-

Abb. 2. Arylamidase-Isoenzymmuster in Beziehung zur Serumaktivität von Arylamidase und alkalischer Phosphatase bei 185 Patienten. — Abszisse: Typ (Isoenzymbanden), Ordinate (logarithmisch geteilt): Aktivität (U/l), bestimmt mit *L*-Leucin-4-Nitroanilid (Arylamidase, ●) bzw. 4-Nitrophenylphosphat (Alkalische Phosphatase, ×) nach l.c. (20), m = Median.

Tab. 2. Isoenzymmuster der Arylamidaseaktivität von Seren in Polyacrylamid (Angabe in cm Distanz vom Start).

Serum	IV	III	II	Ib	Ia	0
Typ 1				(4,4–4,7)		4,8–5,4
Typ 2	2,5–2,6			(4,4–4,7)		4,8–5,4
Typ 3	2,5–2,6	3,5–3,6			4,4–4,7	4,8–5,4
Typ 4	2,5–2,6	3,5–3,6	3,8–4,2		4,4–4,7	4,8–5,4

nungsfaktoren, Albumingehalt) noch ähnliche Isoenzymmuster aufwiesen. Als Kriterien der Cholestase galten dabei Werte des Serumbilirubins über 30 $\mu\text{mol/l}$ und der alkalischen Phosphatase über 370 U/l (nach l. c. 20). Mit Ausnahme der Kollektive A und H–L waren alle Diagnosen laparoskopisch, bioptisch, autoptisch oder operativ gesichert. Bei strittiger Zuordnung (z. B. Pankreaskopfcarcinom mit Verschlußikterus) wurde nach der vorherrschenden Symptomatik entschieden. Die Tabelle 3 demonstriert mehrbandige Enzymmuster mit zu-

Tab. 3. Isoenzymmuster im Serum bei verschiedenen Erkrankungen.

	Gesamt	Typ 1	Typ 2	Typ 3	Typ 4
A. Gesunde Erwachsene (Freiwillige Probanden)	30	30	—	—	—
B. Cholestase ohne Leberbeteiligung (Cholecystitis, Choledochusstein)	17	—	1	5	11
C. Leberkrankheiten ohne Cholestase (chronisch persistierende und akute Hepatitis, Cirrhose, Fettleber)	36	10	10	13	3
D. Lebererkrankungen mit Cholestase (chronisch aggressive Hepatitis, Cirrhose, Fettleber)	29	4	4	11	10
E. Tumoren mit Lebermetastasen ohne Cholestase (Magen-, Colon-, Mamma-, Bronchial-, Pankreas-, primäres Lebercarcinom)	11	2	1	5	3
F. Tumoren ohne Lebermetastasen (Bronchial-, Magencarcinom)	18	8	1	7	2
G. Hämatologische Erkrankungen (Lymphogranulomatose, myeloische Leukämie, Plasmocytom, Polycythämie)	11	9	—	—	2
H. Pankreatitis (akute und chronische rezidivierende Pankreatitis)	20	2	5	8	5
I. Diabetes mellitus	9	8	1	—	—
K. Pneumonie	7	6	—	—	1
L. Sonstige (Cardiosklerose, Herzinfarkt, Hypertonie, chronische Pyelonephritis, Lungenembolie, Hirninfarkt, Thrombosen)	27	22	5	—	—

nehmender Cholestase und ihr Fehlen bei extrahepatischen und extrabiliären Krankheiten. Sofern neben der Bande I eine oder weitere Banden erschienen, war immer eine Beteiligung der Leber anzunehmen (Lymphogranulomatose, G; biliäre Lobärpneumonie, K), wie sich autopsisch bestätigen ließ. Da das Auftreten einer oder mehrerer Arylamidaseaktivitäten in Verlaufskontrollen anderen Kriterien der Cholestase voraufging und bei Besserung das Verschwinden dieser Banden die Normalisierung der anderen Werte einleitete, liegt der Wert der diskelektrophoretischen Untersuchung am ehesten in der Frühdiagnose von Cholestasen, ohne allerdings deren Ursache zu bezeichnen. Eine morphologische oder ätiologische Diagnose ist, in Übereinstimmung mit anderen Autoren (16, 21) durch das Verfahren nicht möglich.

γ -Glutamyltransferase und Inkubation mit Neuraminidase

Entgegen Beobachtungen von Dalal & Winsten (22) über ein identisches Verhalten von 2 Arylamidaseaktivitäten und 2 von 3 Isoenzymen der γ -Glutamyltransferase im Serum bei der Elektrophorese auf Celluloseacetat und Chromatographie an DEAE-Cellulose, fanden wir deutliche Unterschiede zwischen beiden Enzymen. Im Serum Gesunder war γ -Glutamyltransferase immer zwischen 5,3 und 5,7 cm (Wanderungsquotient 0,95) und meist auch von 3,6–3,9 cm (Wanderungsquotient 0,50) in 2 Banden nachzuweisen, deren Lage von der Position der Arylamidase abweicht. Bei γ -Glutamyltransferase-Aktivitäten über 220 U/l trat neben einer Verbreiterung der anodischen Zone eine dritte Bande bei 3,6–3,9 cm (Wanderungsquotient 0,65) auf. Dieses Verhalten stimmt mit den Befunden von Plaut et al. (23) bei der Celluloseacetatfolien-Elektrophorese überein. Auch in den Organextrakten von Lunge, Leber und Niere ließ sich keine Koinzidenz der Aktivitätspherogramme beider Enzyme feststellen.

Analog dem Verhalten alkalischer Phosphatase nach Inkubation mit Neuraminidase (24) nahm auch bei beiden Enzymen die Wanderungsgeschwindigkeit der frontalen Banden ohne Einbuße der Gesamtaktivität in den Proben ab. Die Laufstrecke der anodischen γ -Glutamyltransferase-Fraktion (Serum, Leber) verkürzte sich um 1,6 auf 3,0–3,3 cm (Wanderungsquotient 0,62), bei der Arylamidase (Serum 0, Lunge Ib, Leber Ib, Jejunum Ib)

Abb. 3. Arylamidaseaktivität in Pherogrammen vor (jeweils links) und nach Inkubation mit Neuraminidase. Von links: Niere, Lunge, Leber, Serum Typ 1, Serum Typ 3. – Sammelgel oben (Kathode), Trenngel unten (Anode), Darstellung mit ANA (s. Methodik).

ging sie nur um 0,6 auf 4,3–4,9 cm (Wanderungsquotient 0,73) zurück. Während sich die langsamen Fraktionen der γ -Glutamyltransferase nicht veränderten, verschwanden sie beim Nachweis von Arylamidase aus den Pherogrammen von Organextrakten und pathologischen Seren unter gleichzeitiger Intensitätszunahme der verzögerten Frontbande partiell oder völlig (Abb. 3). Die Anfärbung im Sammelgel nahm ab.

Somit scheint der Austritt mikrosomaler Enzyme ins Serum mit ihrer glykosidischen Bindung an Neuraminsäure einherzugehen, da unter physiologischen Bedingungen nur neuraminsäurehaltige Formen dort gefunden werden. Während andere Autoren Leber (10, 14, 19), Pankreas (9) oder Knochen, Leber und Dünndarm gemeinsam (15) als Quelle der anodischen Aktivität ansehen, halten wir diese schnelle Fraktion für die eigenständige multiple Form der Arylamidase im Serum, ohne ihre Herkunft bezeichnen zu können. Die bei Cholestase auftretenden langsamen Banden entsprächen danach „unreifen“ Vorstufen, deren Existenz durch ein Mißverhältnis zwischen Enzymsynthese und folgender Beladung mit Neuraminsäure zu erklären wäre.

Danksagung

Frl. Barbara Flatter danken wir für ihre ausgezeichnete technische Mitarbeit an diesen Untersuchungen.

Literatur

1. Dixon, M. & Webb, E. C. (1964), Enzymes, 2. Aufl., S. 748–749, Verlag Longmans, Green & Co., London.
2. Rehfeld, N., Peters, J. E., Giesecke, H., Beier, L. & Haschen, R. J. (1967), Acta Biol. Med. Ger. 19, 809–818.
3. Appel, W. (1974), in Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H. U., Hrsg.) 3. Aufl., Bd. 1, 987–1015, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr.
4. Marks, P. A. (1968), in Methods of Enzymology (Colowick, S. P. & Kaplan, N. O., Hrsg.), 2. Aufl., Bd. 9, 131–137, Verlag Academic Press, New York & London.
5. Maurer, H. R. (1968), Disk-Elektrophorese, S. 26, 43 u. 64. Verlag Walter de Gruyter & Co., Berlin.
6. Ludwig, M. & Hanson, H. (1973), Acta Biol. Med. Ger. 29, 539–550.

7. Smith, E. E. & Rutenburg, A. M. (1970), *Biochem. Med.* **4**, 418–424.
8. Beier, L., Beier, I. & Haschen, R. J. (1969), *Clin. Chim. Acta* **24**, 405–410.
9. Kowlessar, O. D., Haeffner, L. J. & Sleisenger, M. H. (1960), *J. Clin. Invest.* **39**, 671–675.
10. Schobel, B. & Wewalka, F. (1962), *Klin. Wochenschr.* **40**, 1048–1056.
11. Smith, E. E. & Rutenburg, A. M. (1966), *Science* **152**, 1256–1257.
12. Schlaeger, R. & Kattermann, R. (1971), *Clin. Chim. Acta* **33**, 13–19.
13. Smith, E. E., Pineda, E. P. & Rutenburg, A. M. (1962), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **110**, 683–687.
14. Smith, E. E. & Rutenburg, A. M. (1963), *Nature (London)* **197**, 800–801.
15. Jones, D. D., Williams, G. F. & Prochazka, B. (1972), *Enzymologia* **43**, 325–332 u. 339–343.
16. Dingjan, P. G., Jongeneel, J., Postma, T. & Stroes, J. A. P. (1973), *Clin. Chim. Acta* **49**, 215–224.
17. Dubbs, C. A., Vivonia, Ch. & Hilburn, J. M. (1960), *Science* **131**, 1529–1530.
18. Dubbs, C. A., Vivonia, Ch. & Hilburn, J. M. (1961), *Nature (London)* **191**, 1203–1204.
19. Pineda, E. P., Goldbarg, J. A., Bank, B. M. & Rutenburg, A. M. (1960), *Gastroenterology* **38**, 698–712.
20. Empfehlungen der Dtsch. Ges. Klin. Chem. (1972), *diese Z.* **10**, 281–291.
21. Peters, J. E., Nilius, R. & Otto, L. (1973), *Clin. Chim. Acta* **45**, 177–187.
22. Dalal, F. R. & Winsten, S. (1973), *Clin. Chem.* **19**, 655.
23. Plaut, D., Mac Queen, J., Soto, A. & Romero, P. (1973), *Clin. Chem.* **19**, 655.
24. Lorentz, K., Flatter, B. & Heydrich, D. (1974), *diese Z.* **12**, 81–86.

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