

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.  
13. Jg. 1975, S. 49–52

## Zur Bestimmung der Arylamidaseaktivität des Serums<sup>1)</sup>

### Untersuchungen über Arylamidasen menschlicher Gewebe, III. Mitteilung

Von K. Lorentz, C.-D. Koch, Barbara Flatter und Jutta Molz

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

(Eingegangen am 27. September 1974)

Die Bestimmung von Arylamidase im Serum mit *L*-Alanin-4-nitroanilid wird durch Erhöhung der Pufferkonzentration und durch Reaktion bei pH 7,8 empfindlicher. Zwischen pH-Wert und Substratkonzentration besteht gegenseitige Abhängigkeit. Metallionen, Thiole und Aminosäuren hemmen, Natriumchlorid stimuliert die Aktivität des Enzyms. Neben kinetischen Daten werden die Stabilität der Arylamidase im Serum, ihre Normwerte mit dem vorgestellten Verfahren und dessen Vergleich mit anderen Methoden beschrieben.

### The estimation of serum arylamidase. Studies on human arylamidases, III.

The determination of serum arylamidase with *L*-alanine-4-nitroanilide as a substrate can be made more sensitive by increasing the buffer concentration at pH 7.8. There is a reciprocal relationship between substrate and hydrogen ion concentration. The enzyme is activated by sodium chloride, but inhibited by amino acids, thiols and metal ions. Stability, kinetic data, normal values of the serum activity and a comparison with other methods of arylamidase determination are reported.

Durch Untersuchungen von Geweben und Seren (2) ließ sich in Übereinstimmung mit *Schlaeger* (3) die besondere Eignung von *L*-Alanin-4-nitroanilid zur kinetischen Messung der Arylamidaseaktivität nachweisen. Im folgenden Beitrag wurden die optimierten Bedingungen zur Enzymbestimmung im Serum untersucht und mit dem empfohlenen Verfahren (4) verglichen.

20 Seren testeten wir nach Dialyse gegen 100 Teile 1 mmol/l Phosphatpuffer pH 7,5 über 10 h bei 4°C. In 20 weiteren prüften wir die Haltbarkeit des Enzyms durch sofortige Bestimmung und Messung nach Lagerung bei 4°C und -28°C. Die Proben wurden dazu nach 24, 72 und 168 h nach einmaligem oder nach wiederholtem Auftauen untersucht.

Zum Vergleich verschiedener Arylamidasebestimmungen benutzen wir neben dem *t*-Test nach *Student* (6) die Formel von *Bravais & Pearson* (6) zur Korrelation parametrisch verteilter Stichproben und berechneten die Regressionen entsprechend.

## Material und Methoden

Wir benutzten zur Ermittlung der günstigsten Reaktionsbedingungen Poolseren mit normaler und erhöhter Aktivität. Die übrigen Proben entstammten denen der I. Mitteilung (1) und gesunden Probanden. Außerdem verwendeten wir die Testseren Versatol E von Warner-Chilcott (Morris Plains, USA) und Monitrol I von Dade (Miami, USA). Alle Geräte und die weiteren Reagenzien<sup>2)</sup> entsprachen den Angaben der II. Mitteilung (2), ebenso die kinetischen Tests (3,2 ml Substratpufferlösung, 50 µl Probe), ihre Registrierung und Auswertung. Die angegebenen Konzentrationen berücksichtigten das zugesetzte Probevolumen (1,5 % des Gesamtvolumens) nicht. Wir bestimmten die optimalen Verhältnisse von Substratkonzentration, Pufferion und -stärke, pH-Wert und Aktivator in wiederholten Meßreihen bei Konstanz von jeweils vier Parametern bei 25°C unter Variation des fünften. Die *Michaelis*-Konstanten wurden graphisch nach *Hofstee* (5) ermittelt.

## Ergebnisse und Diskussion

### pH- und Substratabhängigkeit

Das pH-Optimum der Arylamidaseaktivität von Seren hängt vom Substrat, dessen Konzentration und der Art des Puffers ab. Während *Leu-4NA* bei pH 7,5 am schnellsten gespalten wird, lag die maximale Hydrolyse von *Ala-4NA* in EDTA und Tris für 5 mmol/l bei pH 7,4 und für 1 mmol/l bei pH 8,0 (Abb. 1). Die für alle weiteren Untersuchungen gewählte *Ala-4NA*-Konzentration von 2,0 mmol/l besaß ein Optimum bei pH 7,8 in Tris und EDTA, in Triäthanolamin dagegen bei pH 8,2. In Phosphat fiel, übereinstimmend mit *Schlaeger* (3), die ebenfalls von der Substratkonzentration abhängige Verschiebung des Optimums mit pH-Werten zwischen 8,8 und 9,0 stärker aus. Die Konzentration der Pufferionen beeinflusste diese Ergebnisse ebenso wenig wie die Gegenwart oder das Fehlen von Effektoren.

<sup>1)</sup> Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft

<sup>2)</sup> Benutzte Abkürzungen:

<i>Ala-4NA</i>	<i>L</i> -Alanin-4-nitroanilid
<i>Leu-4NA</i>	<i>L</i> -Leucin-4-nitroanilid

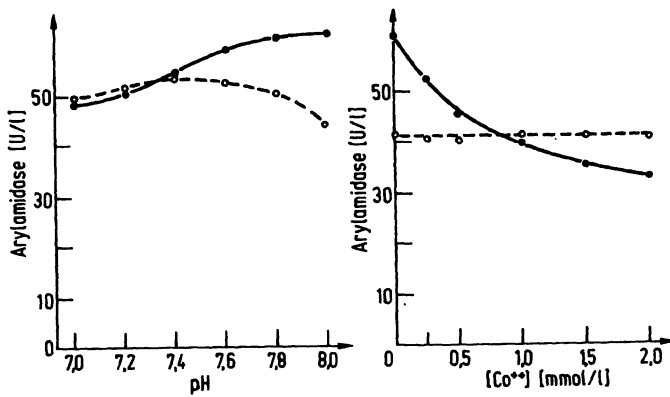


Abb. 1 u. 2. Abhängigkeit der Arylamidaseaktivität des Serums von der Wasserstoffionenkonzentration (Abb. 1, links) und der Gegenwart von Cobalt-(II)-Ionen (Abb. 2, rechts: pH-Wert 7,8) bei 1 mmol/l (○—○) und 5 mmol/l (●—●) L-Alanin-4-nitroanilid in 250 mmol/l Tris Salzsäure-Puffer.

Die wechselseitige Abhängigkeit von Substrat- und Wasserstoffionenkonzentration führte zwischen pH 7,4 und 8,0 zu *Michaelis*-Konstanten von 0,30–0,55 mmol/l Ala-4NA. Den höchsten Umsatz fanden wir in Tris-Salzsäurepuffer bei pH 7,8 mit Ala-4NA-Konzentrationen zwischen 1,6 und 2,0 mmol/l (Abb. 3). Bei unterschiedlichem Verlauf der Kurven  $v$  gegen  $S$  trat oberhalb der genannten Konzentrationen in jedem Fall Überschüßhemmung, wie von *Schlaeger* (3) berichtet, ein. Die zugehörigen  $K_m$ -Werte betragen 0,45–0,48 mmol/l. Bei pH 7,5 trat  $V$  erst bei 2,5 mmol/l, bei pH 8,0 bereits bei 1,5–1,8 mmol/l auf. Beide Werte lagen um 10 % unter der Hydrolyse von 2,0 mmol/l bei pH 7,8.

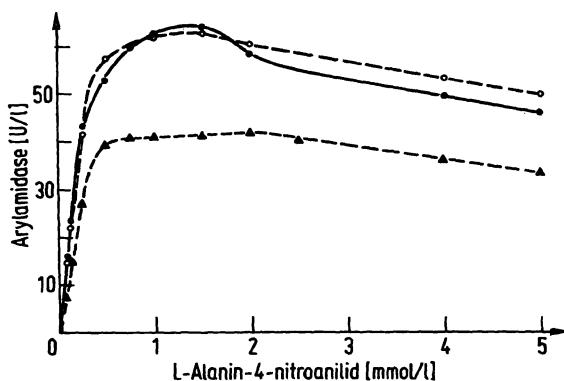


Abb. 3. Substratabhängigkeit von Arylamidase in Seren verschiedener Aktivität in 250 mmol/l Tris-Salzsäure-Puffer pH 7,8.

### Effektoren

Offenbar besitzt Ala-4NA einen protektiven Effekt gegenüber Arylamidase, da bei einer Substratkonzentration von 5 mmol/l die in Gegenwart von 1 mmol/l zunehmende Inaktivierung durch  $\text{Co}^{2+}$  fehlte (Abb. 2). Daher führten wir die weiteren Untersuchungen über den Einfluß von Effektoren bei 2,0 mmol/l Ala-4NA in 250 mmol/l Tris-Salzsäure pH 7,8 durch.

Im Vergleich zur Hydrolyse von Leu-4NA war nur die stärkere Hemmung durch *L*-Cystein bemerkenswert (Tab. 1). SH-Donatoren aktivierten das Enzym ebenso wenig wie Chelatbildner. Die fehlende Stimulation durch Glycylglycin schloß eine gleichzeitige Transferasebestimmung, etwa von  $\gamma$ -Glutamyltransferase (EC 2.3.2.2) aus. pH-Optimum und Substratabhängigkeit wurden durch die aufgeführten Effektoren nicht verändert. Die Hemmung durch *L*-Alanin entsprach dem nichtkompetitiven Typ,  $K_i$  wurde zu 12,6 mmol/l bestimmt. Mit Ausnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  hemmten zweiwertige Metallionen in Konzentrationen über 1 mmol/l stark.

Tab. 1. Relativer Umsatz von Leu-4NA (4) und Ala-4NA (2,0 mmol/l in 250 mmol/l Tris-Salzsäure pH 7,8) durch Poolseren in Gegenwart verschiedener Effektoren.

Effektor	mmol/l	Leu-4NA	Ala-4NA
Kontrolle		1,0	1,0
<i>L</i> -Alanin	10	0,70–0,75	0,55–0,60
	50	0,48–0,53	0,30–0,34
Glycylglycin	10	0,80–0,85	0,90–0,95
	40	0,62–0,67	0,65–0,70
GSH	2	0,82–0,86	0,70–0,74
	10	0,70–0,75	0,22–0,26
<i>L</i> -Cystein	10	0,55–0,60	0,05–0,10
	50	0,15–0,20	0 – 0,04
2-Mercaptoäthanol	2	0,87–0,90	0,80–0,85
	10	0,80–0,85	0,48–0,53
EDTA	2	0,85–0,90	0,90–0,95
	10	0,85–0,90	0,82–0,87
$\text{CoSO}_4$	0,025	0,90–0,95	0,92–0,97
	1	0,88–0,92	0,65–0,70
$\text{MgSO}_4$	0,025	0,92–0,95	0,88–0,93
	1	0,92–0,96	0,90–0,95

Die Wirkung verschiedener Puffer wurde durch Natriumchlorid wesentlich beeinflusst. Eine Übersicht der mit 5 Seren verschiedener Aktivität erhaltenen Resultate ließ neben der erwarteten Streuung der Meßwerte ein Wirkungsoptimum in 250 mmol/l Tris-Salzsäure bei Gegenwart von 250 mmol/l Natriumchlorid erkennen (Tab. 2). Wurde im Kontrolltest (Aktivität 1,0 in 250 mmol/l Tris-Salzsäure)  $\text{Na}^+$  durch äquivalente Mengen  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{K}^+$  ersetzt, resultierten Aktivitäten von 0,78–0,81. Bei Austausch von  $\text{Cl}^-$  gegen Acetat oder EDTA als Anionen fiel der Umsatz auf 0,66–0,71 des Bezugswertes. Möglicherweise liegt diesen Ergebnissen keine Aktivierung durch Natriumchlorid zugrunde, sondern ein allosterischer Effekt infolge verminderter Hydratation des Enzymmoleküls, da die Aktivität der Proben mit zunehmender Pufferkonzentration anstieg (Tab. 2) und bei 0,5 mol/l wieder sank.

Daher wählten wir für die *optimierte Bestimmung* der Arylamidase im Serum folgendes System, mit dem wir

Tab. 2. Relative Aktivität von Seren gegenüber Ala-4NA 2 mmol/l in verschiedenen Puffern: Tris und EDTA pH 7,8, Triäthanolamin pH 8,2 und Phosphat 8,5.

Pufferionen (mmol/l)	Natriumchlorid in mmol/l		
	0	250	500
Tris (50)-Acetat	0,80–0,85	0,85–0,90	
Tris (50)-HCl	0,95–0,98	1,0 –1,05	1,0 –1,05
Tris (100)-HCl	0,95–1,0	1,0 –1,15	
Tris (250)-HCl	1,0	1,15–1,2	1,1 –1,2
Natronlauge-EDTA (50)	0,70–0,80	0,75–0,90	
Natronlauge-EDTA (250)	0,70–0,75	0,95–1,0	0,90–1,0
Triäthanolamin (50)-HCl	0,70–0,85	0,80–0,90	
Triäthanolamin (250)-HCl	0,90–0,95	0,90–1,0	1,0 –1,05
Kaliumphosphat (50)	0,70–0,80	0,80–0,90	
Kaliumphosphat (250)	0,75–0,80	0,85–0,90	0,9 –0,95

die obengenannten pH-, Substrat- und Effektoreinflüsse bestätigten:

Tris-Salzsäure-Puffer	250 mmol/l	pH 7,8
Natriumchlorid	250 mmol/l	
L-Alanin-4-nitroanilid	2,0 mmol/l	

Mit diesem Ansatz, der bei gleichen  $K_m$ -Werten 1,1–1,2 fach höhere Umsätze als die Bestimmung ohne Natriumchlorid lieferte, führten wir alle weiteren Tests durch (sog. optimierte Bestimmung).

Die Dialyse der Seren ließ nach Volumenkorrektur mit 0,96–1,0 der Ausgangsaktivität keine diffusiblen Effektoren in der Probe nachweisen. Ein Zusatz von Detergentien (bis 250 mmol/l Dodecylsulfat, Cetyltrimethylammoniumhydrobromid, Triton X-100, Dimethylsulfid) steigerte die Hydrolyse von Ala-4NA nicht.

#### Stabilität, Reproduzierbarkeit

Die Haltbarkeit der Substratpufferlösung entsprach mit einer Spontanhydrolyse von etwa 2 % innerhalb von 3 Monaten bei 4°C Aufbewahrungstemperatur den Werten von *Schlaeger* (3). Die Seren zeigten gegenüber Ala-4NA und Leu-4NA nach Lagerung bei 4°C und -28°C bis zu 168 h, übereinstimmend mit *Amador & Wacker* (7) noch 0,97–1,05 der Ausgangsaktivität. Dagegen führte zweimaliges Auftauen und Einfrieren zu einem Abfall auf  $0,91 \pm 0,10$  (1s), dreimalige Wiederholung dieses Prozesses zum Rückgang auf  $0,77 \pm 0,15$  der ursprünglichen Serumaktivität gegenüber Leu-4NA, während die Hydrolyse von Ala-4NA konstant blieb. Dies deutet am ehesten auf eine Labilität der „echten“

Leucinaminopeptidase (EC 3.4.11.1). Ähnliche Resultate erhielten wir mit den Testseren Monitrol I und Versatol E, deren Arylamidaseaktivität im Unterschied zum Verhalten der alkalischen Phosphatase (8) sofort nach dem Lösen der lyophilisierten Probe den endgültigen Wert erreichte. Gegenüber allen untersuchten Seren differierte in diesen Testseren, offenbar als Folge der unterschiedlichen Stabilität beider Enzyme, die Spaltung von Ala-4NA und Leu-4NA (nach l.c. 4) beträchtlich:

Monitrol I:	Leu-4NA	19 U/l,
	Ala-4NA	30 U/l („optim.“)
Versatol E:	Leu-4NA	17 U/l,
	Ala-4NA	27 U/l („optim.“).

Bei 25 manuellen Bestimmungen lag die Präzision in der Serie zwischen 3,2 % ( $\bar{x} = 61$  U/l,  $s = \pm 2,0$  U/l) und 4,1 % ( $\bar{x} = 20,3$  U/l,  $s = \pm 0,8$  U/l). Die Reproduzierbarkeit von Tag zu Tag erreichte mit diesen Proben 4,6 % bzw. 4,4 % ( $n = 25$ ).

#### Normalwerte, Vergleich mit anderen Verfahren

In den Seren von 96 gesunden Erwachsenen zwischen 20 und 76 Jahren (Mittel 41 Jahre, je 16 Probanden in 6 Altersgruppen von jeweils 10 Jahren Klassenbreite) fanden wir Werte zwischen 19,8 und 45,2 U/l (Lognormalverteilung, geometrisches Mittel 27,9 U/l,  $s = \pm 5,5$  U/l, 90 % – Vertrauensbereich 20,2–39,8 U/l).

Einen Vergleich der mit vier verschiedenen Verfahren zur Arylamidasebestimmung erhaltenen Daten zeigt Tabelle 3. Danach lieferte die vorgeschlagene Methode gegenüber dem Verfahren von *Schlaeger* (3), mit dem die nächsthöheren Resultate erhalten wurden, um 11,6 % ( $s = \pm 4,6$  %,  $p < 0,001$ ; t-Test für gepaarte Daten) höhere Werte. In jedem der 48 untersuchten Seren erhielten wir mit dem beschriebenen Vorgehen die höchste Aktivität.

Tab. 3. Vergleich der vorgeschlagenen Arylamidasebestimmung (y) mit drei anderen Verfahren. Mittelwerte in Klammern.

Substrat Konzentration	Lit.	Bereich [U/l]	Regressionsgleichung	r	$s_y : x$
Ala-4NA 2 mmol/l		26,2–185 (60,4)			
Ala-4NA 2 mmol/l	(3)	21,7–162 (54,0)	$1,12 x + 0,08$	$0,999 \pm 2,15$	
Ala-4NA 4 mmol/l	(9)	14,1–109 (36,8)	$1,60 x + 1,44$	$0,994 \pm 4,24$	
Leu-4NA 4 mmol/l	(4)	16,7–121 (41,6)	$1,45 x - 0,08$	$0,993 \pm 4,64$	

## Literatur

1. Lorentz, K., Marunowski, A. & Ritter, U. (1974), diese Z. 12, 468-473.
2. Lorentz, K., Petersen, S. & Ritter, U. (1974), diese Z. 13, 45-48, vorstehend.
3. Schläpfer, R. (1973), diese Z. 11, 326-328.
4. Empfehlungen der Deut. Ges. Klin. Chem. (1972), diese Z. 11, 281-291.
5. Hofstee, B. H. J. (1959), Nature (London) 184, 1296-1298.
6. Sachs, L. (1971), Statistische Auswertungsmethoden, 3. Aufl. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
7. Amador, E. & Wacker, W. E. C. (1965), in Methods of Biochemical Analysis (Glick, D., Hrg.) Bd. 13, 274-276, Verlag Interscience Publishers, New York.
8. Smith, A. F. & Fogg, B. A. (1972), Clin. Chem. 18, 1518-1523.
9. Roche-Diagnostica (1974), Arylamidase opt., Art. Nr. 1301.

Prof. Dr. Klaus Lorentz  
24 Lübeck  
Kronsforder Allee 71/73