

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.  
11. Jg. 1973, S. 326–328

## Messung der Serum-Arylamidase mit L-Alanin-*p*-nitroanilid Zur Frage des optimierten „LAP“-Tests

Von R. SCHLAEGER

*Aus der Abteilung für Klinische Chemie der Medizinischen Klinik der Universität Göttingen*

(Eingegangen am 25. Januar/9. April 1973)

Es wird vorgeschlagen, für die Messung der Serum-Arylamidase Alanin-*p*-nitroanilid anstelle des z. Z. gebräuchlichen Substrats Leucin-*p*-nitroanilid zu verwenden. Alanin-*p*-nitroanilid benötigt wegen seiner hervorragenden Löslichkeit keinen Lösungsvermittler. Der Test ist wirtschaftlicher, ergibt eine um 25% höhere Empfindlichkeit und wird durch Oxytocinase nicht gestört.

### *Estimation of serum arylamidase with L-alanine-*p*-nitroanilide as a substrate*

Alanine-*p*-nitroanilide is recommended as a substrate for serum arylamidase instead of the commonly used leucine-*p*-nitroanilide. It has an excellent solubility. The new test is economical, results in a 25% increase in sensitivity and oxytocinase does not interfere.

Für die Messung der Aminosäure-Arylamidase (sog. LAP, EC 3.4.1.2) im Serum wurde von der Enzymkommission der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie ein „optimierter“ Test mit Leucin-*p*-nitroanilid in der Endkonzentration 4 mmol/l vorgeschlagen (1). Die Empfehlungen der Enzymkommission sollen zur Vereinheitlichung der Methodik und damit zu vergleichbaren Meßwerten und Normalbereichen in allen Enzymlaboratorien führen. Ohne diese Intention stören zu wollen, erscheinen doch noch einige Überlegungen zur Frage des optimalen Substrats für die LAP-Messung gerechtfertigt.

L-Leucin-*p*-nitroanilid ist seit TUPPY (2) das gebräuchliche Substrat zur Messung der Aminosäure-Arylamidase. Es hat jedoch einen wesentlichen Nachteil: Bereits bei 1,6 mmol/l wird die Löslichkeitsgrenze überschritten (3), weit vor Erreichen der für maximale Umsatzgeschwindigkeit notwendigen und empfohlenen Substratkonzentration von 4 mmol/l. Eine ausreichende Stabilisierung der übersättigten Lösung gelang der Industrie mit einem geeigneten Lösungsvermittler<sup>1)</sup>. Bei der relativ geringen Substratspezifität dieser Peptidase sollten jedoch auch andere Substrate in die Untersuchungen zur Optimierung der LAP-Messung einbezogen werden. Aminosäure-Arylamidase zeigt die größte Aktivität mit dem  $\beta$ -Naphthylamid des Alanins (4, 5). Alanin- $\beta$ -naphthylamid wird dreimal rascher umgesetzt als Leucin- $\beta$ -naphthylamid. Die Unterschiede zwischen den entsprechenden Aminoacyl-*p*-nitroaniliden, deren Verwendung Voraussetzung für einen kinetischen Test ist, sind geringer. Dennoch bietet Alanin-*p*-nitroanilid u. E. wesentliche Vorteile gegenüber dem bisher gebräuchlichen Leucin-*p*-nitroanilid.

<sup>1)</sup> Merckotest Leucin-Arylamidase.

### Methodik

L-Leucin-*p*-nitroanilid und L-Alanin-*p*-nitroanilid-Hydrochlorid sowie alle übrigen verwendeten Reagenzien waren analysenreine Produkte der Firma E. Merck, Darmstadt. Alle Enzymaktivitätsmessungen erfolgten bei 25°C unter fortlaufender Registrierung der Extinktionszunahme bei 405 nm im Filterphotometer „Eppendorf“ mit Küvettenwechselautomatik und Schreiber der Firma Netheler und Hinz, Hamburg. Zur Dosierung von Reaktionslösung und Serum wurden Probe-Reagenz-Dosiergeräte der gleichen Firma eingesetzt. Die Bestimmung der optimalen Substratkonzentration geschah in Tris-HCl-Puffer, 50 mmol/l, für das Alaninsubstrat bei pH 7,5, für das Alaninsubstrat bei pH 8,0. Der Serumanteil betrug, wie im Standardtest, 0,09 (Volumenfraktion). Bei der Bestimmung des *pH*-Optimums wurde das jeweilige aktuelle pH im Testansatz mit einer Mikro-Glaselektrode kontrolliert. Die Pufferkonzentration betrug wieder 50 mmol/l. Die Konzentration von Leucin-*p*-nitroanilid im Test war 4 mmol/l, diejenige von Alanin-*p*-nitroanilid 2 mmol/l.

Zur Korrelationsprüfung der Hydrolyse von Alanin- und Leucin-*p*-nitroanilid wurden frische unausgewählte Patientenserum mit normaler und erhöhter LAP bzw. Serum von lebergesunden Schwangeren untersucht. Alanin-Arylamidase wurde mit dem von uns unter „Ergebnisse“ dargestellten Test gemessen, Leucin-Arylamidase mit dem Merckotest, der den Empfehlungen der Enzymkommission entspricht. Die Angabe der Enzymaktivität erfolgte in Internationalen Einheiten pro Liter Serum (U/l); definitionsgemäß entspricht 1 U der Freisetzung von 1  $\mu$ mol *p*-Nitroanilin pro Minute unter standardisierten Bedingungen.

### Ergebnisse und Diskussion

Optimale Substratkonzentrationen für die Hydrolyse von Leucin- und Alanin-*p*-nitroanilid

In Abbildung 1 ist die Aktivität der Serum-Arylamidase in Abhängigkeit von der Konzentration der beiden Substrate Leucin- und Alanin-*p*-nitroanilid dargestellt. Sämtliche untersuchten Seren mit normaler bzw. erhöhter LAP zeigten mit Leucin-*p*-nitroanilid das geäußerte Verhalten (1): Maximale Umsatzgeschwindigkeit

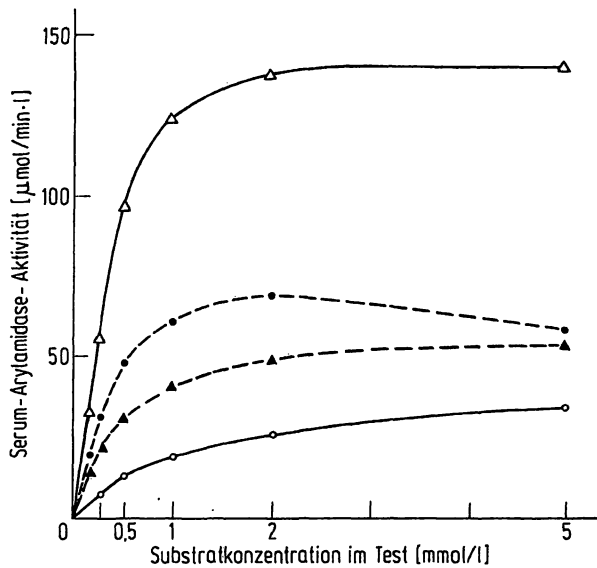


Abb. 1

Abhängigkeit der Serum-Arylamidase-Aktivität von der Substratkonzentration.  $\Delta$ — $\Delta$  Leucin-*p*-nitroanilid und  $\circ$ — $\circ$  Alanin-*p*-nitroanilid, Serum einer Schwangeren im letzten Trimenon, Tris-puffer 50 mmol/l, pH 7,5.  $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$  Leucin-*p*-nitroanilid und  $\bullet$ — $\bullet$  Alanin-*p*-nitroanilid, Serum eines Patienten mit extrahepatischer Cholestase, Tris-Puffer 50 mmol/l, pH 8,0

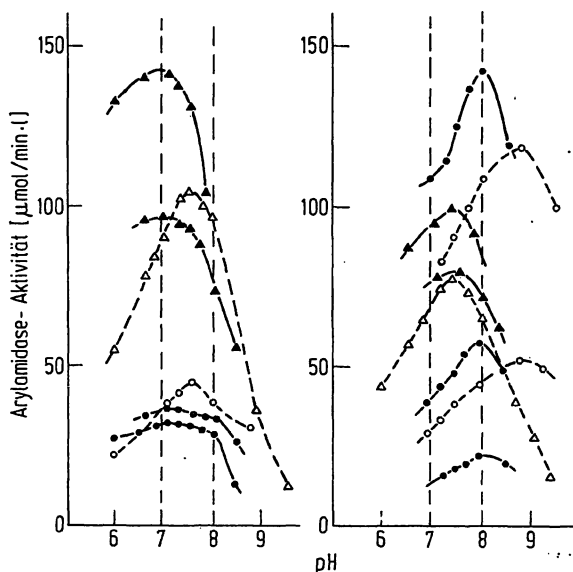


Abb. 2

pH-Abhängigkeit der Leucin- und Alanin-*p*-nitroanilid-Hydrolyse. Linke Bildhälfte: Schwangeren-Seren. Rechts: Seren von Gesunden und Leberkranken.  $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$  Leucin-*p*-nitroanilid in Tris-Puffer,  $\Delta$ — $\Delta$  Leucin-*p*-nitroanilid in Phosphat-Puffer.  $\bullet$ — $\bullet$  Alanin-*p*-nitroanilid in Tris-Puffer,  $\circ$ — $\circ$  Alanin-*p*-nitroanilid in Phosphat-Puffer. Einzelheiten s. unter „Methodik“

bei einer Konzentration im Test zwischen 4 und 5 mmol/l. Die Hydrolyse von Alanin-*p*-nitroanilid dagegen erreicht die maximale Geschwindigkeit bereits bei 2 mmol/l, bei höherer Konzentration kommt es zu einer Substrathemmung. Unter jeweils optimalen Meßbedingungen ist die Umsatzrate von Alanin-*p*-nitroanilid konstant höher als diejenige von Leucin-*p*-nitroanilid.

Ganz anders als die Arylamidase im Serum Gesunder und Leberkranker verhält sich die Arylamidase im Serum schwangerer Frauen gegenüber dem Alanin-Substrat. Im letzten Trimenon kommt es bekanntlich zu einem starken Anstieg der Leucin-*p*-nitroanilid

spaltenden Aktivität im Serum. Diese hohe „LAP“ beruht auf dem Plazentaenzym Oxytocinase (6). Die maximale Aktivität der Oxytocinase mit Alanin-*p*-nitroanilid wird erst bei Konzentrationen von 25 bis 30 mmol/l erreicht, d. h. der  $K_m$ -Wert der Oxytocinase für Alanin-*p*-nitroanilid ist rund 10fach größer als für Leucin-*p*-nitroanilid.

#### Einfluß von pH, Puffer und Ionen

Das pH-Optimum der Alanin-*p*-nitroanilid-Spaltung liegt für sämtliche gemessenen Seren, mit Ausnahme der Schwangerenserum, mit Tris-HCl-Puffer bei pH 8,0 (s. Abb. 2, rechte Bildhälfte). Mit Phosphat-Puffer ist das Optimum zum Alkalischen verschoben, die maximal erreichbare Aktivität ist stets geringer. Die Arylamidase im Serum Schwangerer ergab mit beiden Substraten ein pH-Optimum bei 7,0 mit Tris-Puffer, und pH 7,5 mit Phosphat-Puffer (Abb. 2, linke Bildhälfte).

Eine Aktivierung durch ein- oder zweiwertige Ionen fanden wir nicht. Auch für die Leucin-*p*-nitroanilid-Hydrolyse sind aktivierende Ionen nicht bekannt. Die Beibehaltung der NaCl-Konzentration von 250 mmol/l empfahl sich uns zur Vermeidung unspezifischer Trübungen.

#### Empfohlene Testanordnung

Nach den vorliegenden Befunden kann folgender Testansatz empfohlen werden: Herstellung eines Reaktionsgemisches folgender Zusammensetzung (in Klammern Endkonzentrationen im Test):

Tris-HCl-Puffer pH 8,0	55 mmol/l (50)
Natriumchlorid	275 mmol/l (250)
L-Alanin- <i>p</i> -nitroanilid-Hydrochlorid	2,2 mmol/l (2)

Das Reaktionsgemisch ist mindestens 4 Wochen bei 4°C haltbar ohne Auskristallisation oder nennenswerte Spontanhydrolyse des Substrats. Nach 10wöchiger Aufbewahrung im Kühlschrank war rund 1% des Substrats spontan hydrolysiert.

Zur Messung werden 500  $\mu$ l Reaktionsgemisch und 50  $\mu$ l Serum in eine Halbmikro-Küvette pipettiert und die Extinktionszunahme bei 25°C und 405 nm über drei bis fünf Minuten fortlaufend registriert. Die Reaktion verläuft über einen sehr weiten Zeit- und Enzymaktivitätsbereich linear.

#### Korrelation der Leucin-Arylamidase- und der Alanin-Arylamidaseaktivität im Serum von Gesunden, Leberkranken und Schwangeren

In Abbildung 3 sind die mit dem beschriebenen Test gemessenen Serumaktivitäten der Alanin-Arylamidase auf der Abszisse, die Aktivitäten der mit dem „optimierten“ LAP-Test gemessenen Leucin-Arylamidase auf der Ordinate aufgetragen. Bei 90 unausgewählten Seren von nichtschwangeren Patienten mit normaler oder erhöhter LAP fand sich ein Korrelationskoeffizient von  $r = 0,99$ . Diese strenge Korrelation bedeutet, daß mit beiden Substraten das gleiche Enzym erfaßt wird. Alle bisherigen Erkenntnisse über die klinische Wertig-

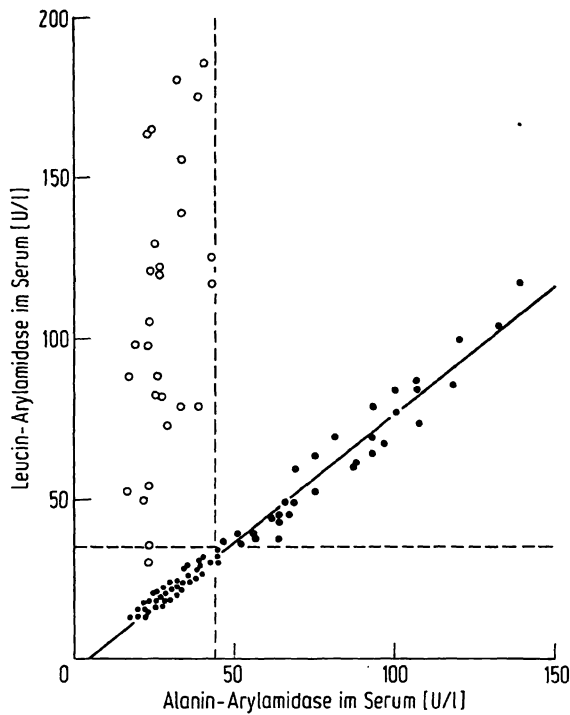


Abb. 3

Korrelation der Leucin- und der Alanin-Arylamidase-Aktivität im Serum. ● Gesunde oder Leberkranke, ○ Schwangere im 2. und 3. Trimenon. Regressionsgerade:  $y = 0,80x - 3$ . Korrelationskoeffizient  $r = 0,99$ ,  $n = 90$ . Die punktierten Linien geben die obere Normgrenze ( $x + 2s$ ) für beide Methoden an. Einzelheiten s. unter „Methodik“.

keit der Arylamidase bei Lebererkrankungen sind auf den neuen Test voll übertragbar. Jedoch ergibt Alanin-*p*-nitroanilid gegenüber dem Leucinsubstrat eine 25% höhere Empfindlichkeit entsprechend dem Winkel der Regressionsgeraden  $y = 0,80x - 3$ . Als vorläufigen Normalbereich (95%-Bereich) fanden wir an 100 Gesunden 15–45 U/l.

Bei 28 lebergesunden Frauen im 2. und 3. Trimenon zeigte sich dagegen keine Korrelation zwischen der Höhe der Leucin-Arylamidase und der Alanin-Arylamidase im Serum ( $r = 0,45$ ). Trotz höchster „LAP“-Werte im letzten Schwangerschaftsdrittel wurde unser Normalbereich der Alanin-Arylamidase niemals überschritten (Abb. 3, offene Kreise). Bei der für die hepatogene Arylamidase optimalen Alanin-*p*-nitroanilid-Konzentration von 2 mmol/l und dem optimalen pH von 8,0 beeinflusst Oxytocinase die Messung praktisch nicht. Eine Erhöhung der Alanin-*p*-nitroanilid spaltenden Aktivität in der Schwangerschaft ist daher Hinweis auf eine Lebererkrankung. Da die alkalische Serum-Phosphatase in der Schwangerschaft von der Plazenta-Phosphatase überlagert wird, ist sie zur Diagnose einer Cholestase wertlos. Hier könnte die Bestimmung der Alanin-Arylamidase zur Differentialdiagnose beitragen. Andererseits besteht durch parallele Bestimmung der Leucin- und Alanin-*p*-nitroanilid-Hydrolyse eine einfache Möglichkeit zur Beurteilung der Oxytocinase (7).

Nach den vorliegenden Befunden hat die Verwendung von Alanin-*p*-nitroanilid als Substrat zur Messung der Serum-Arylamidase gegenüber dem bisher gebräuchlichen Leucin-*p*-nitroanilid zusammenfassend folgende Vorteile:

Der neue Test ergibt eine Empfindlichkeitssteigerung von 25% bei unveränderter klinischer Wertigkeit. Da Oxytocinase das Alanin-Substrat unter den angegebenen Bedingungen praktisch nicht hydrolysiert, ist auf einfache Weise eine Differenzierung der Arylamidase aus Leber und Plazenta möglich. Das Substrat ist leicht löslich und im gebrauchsfertigen Ansatz sehr stabil. Durch Wegfall des Lösungsmittlers und geringeren Substratverbrauch ist der Test außerordentlich wirtschaftlich.

### Literatur

1. Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie (1972), diese Z. 10, 182–192. — 2. TUPPY, H., WIESBAUER, U. & WINTERSBERGER, E. (1962), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 239, 278–288. — 3. SZASZ, G. (1967), Amer. J. Clin. Pathol. 47, 607–613. — 4. FARR, W., REHFELD, N., REICHELT, D. &

HASCHEN, R. J. (1968), Z. med. Labortechnik 9, 78–86. — 5. YMAN, L. (1970), Acta Pharm. Suecica 7, 75–86. — 6. GOEBELSMANN, U. & BELLER, F. K. (1965), diese Z. 3, 49–54. — 7. SCHLAEGER, R. (1972), J. Clin. Lab. Invest. 29, Suppl. 126, Abstr. 23. 24.

Dr. R. Schlaeger  
D-34 Göttingen  
Humboldtallee 1