

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
7. Jg., S. 18—24, Januar 1969

Zur Bestimmung der 5'-Nucleotidase im Serum

Von J. BECKMANN, K. LEYBOLD und L. WEISBECKER

Aus der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Universität Kiel (Direktor: Prof. Dr. L. Weisbecker)

(Eingegangen am 8. August 1968)

Mit dem Ziel, eine möglichst richtige und einfache 5'-Nucleotidase-Bestimmung im Serum aufzubauen, haben wir zahlreiche Literaturangaben experimentell überprüft und optimale Reaktionsbedingungen ermittelt. Es wird ein Vorschlag gemacht, die nicht durch 5'-Nucleotidase bedingte Phosphathydrolyse des Substrates 5'-AMP korrekt abzugrenzen. Als günstigste Reaktionsbedingungen erweisen sich: 37°, da hier die 5'-Nucleotidase-Aktivität um das 3,1fache höher liegt als bei 23°; pH 7,5; 0,16M Tris; 0,5 mM Mn⁺⁺, welches stärker als Mg⁺⁺ aktiviert; 0,1 mM 5'-AMP, da ab 0,12 mM Substrathemmung auftritt. Zur Abgrenzung der unspezifischen Phosphathydrolyse eignet sich ein Substratgemisch von 2'-AMP und 3'-AMP, im Parallelansatz inkubiert, besser als andere Verfahren, in denen z. B. EDTA zur selektiven Hemmung der alkalischen Phosphatase oder Ni⁺⁺ zur selektiven Hemmung der 5'-Nucleotidase benutzt werden. Eine Methode, die 5'-Nucleotidase-Aktivität mittels Phosphatanalyse zu bestimmen, wird vorgeschlagen. Die zeitraubende Endpunktbestimmung kann aber mit einem kinetischen UV-Test, der in der folgenden Arbeit ausführlicher beschrieben wird, umgangen werden.

The measurement of serum 5'-nucleotidase

In order to develop an accurate and simple method for the determination of the 5'-nucleotidase in serum, numerous methods in literature were tested experimentally, and the optimum conditions were determined. A proposal is made for an accurate subtraction of the non-specific hydrolysis of the substrate 5'-AMP. The most suitable conditions of reactivity are: 37° C, for at this temperature the 5'-nucleotidase-activity is 3.1 times higher than at the 23° C-level; pH 7.5; 0.16M tris; 0.5 mM Mn⁺⁺, which activates more intensely than Mg⁺⁺; 0.1 mM 5'-AMP, since above 0.12 mM 5'-AMP, substrate inhibition occurs. For the subtraction of the non-specific phosphate-hydrolysis, the use of a substrate-mixture of 2'-AMP and 3'-AMP is more suitable than EDTA for selective inhibition of alkaline phosphatases, or Ni⁺⁺ for selective inhibition of the 5'-nucleotidase, which are used in other methods. The mixture is incubated in a parallel control test. A method for the determination of the 5'-nucleotidase-activity by phosphate analysis is suggested. Instead of this time-consuming method a kinetic UV-test can be used. It is described in detail in the following paper.

Die Bestimmung der 5'-Nucleotidase¹⁾ im Serum wird wegen ihres empfindlichen Ansprechens bei hepatobiliären Erkrankungen und ihrer Spezifität in zunehmendem Maße der Bestimmung der alkalischen Phosphatase oder der Leucin-Amino-peptidase vorgezogen (1—6). Differentialdiagnostisch ermöglicht sie den Ausschluß eines osteoblastischen Knochenprozesses, der mit AP-Erhöhung im Serum einhergeht (1, 2, 5—12). Eine erhöhte Serum-5'-NTD kann unter Umständen den einzigen Hinweis auf Lebermetastasen, Pericholangitis, Intoxikation, Fettleber, kardiale Stauung oder sonstige leichte Behinderungen des Gallenabflusses geben (4, 6). Ihre fortlaufende Bestimmung eignet sich ferner gut zur Verlaufskontrolle (13).

Die 5'-NTD-Aktivität wird im allgemeinen an Hand der Phosphathydrolyse des Adeninmononucleotides 5'-AMP beim pH-Optimum 7,5 ermittelt. Eine richtige Bestimmung muß die bei diesem pH ebenfalls noch vorhandene Aktivität unspezifischer Phosphatase im Serum berücksichtigen. Die Richtigkeit wird bei den genannten Untersuchern (1—13) z. T. wesentlich durch die unexakte Abgrenzung der letzteren von der 5'-NTD beeinträchtigt. Die Präzision leidet in jedem Falle unter der methodischen Ungenauigkeit der relativ umständlichen Phosphatbestimmung. Überdies ist die für die Vorinkubation von Serum mit 5'-AMP erforderliche Zeit (1/2—2 1/2 Std.) erheblich. Aus diesen Gründen hat sich die 5'-NTD-Bestimmung im Serum bislang

nur vereinzelt durchgesetzt. Den zahlreichen bisher entwickelten methodischen Variationen zur Abgrenzung unspezifischer Phosphatase im Serum von der 5'-NTD liegen 5 prinzipielle Möglichkeiten zugrunde:

1. Die Aktivität der unspezifischen Phosphatase wird mit einem von der 5'-NTD nicht hydrolysierten Phosphatester gesondert ermittelt und von der Gesamthydrolyse von 5'-AMP subtrahiert (4, 6—10).
2. Die Aktivität der unspezifischen Phosphatase beim pH des 5'-NTD-Testes wird vernachlässigt (3).
3. Selektive Hemmung unspezifischer Phosphatase (1, 2).
4. Messung der enzymatischen Phosphathydrolyse mit und ohne Hemmung der 5'-NTD durch Nickelionen (Differenzbestimmung) (5, 11—14).
5. Es wird ausgenutzt, daß Histidin bei pH 8,5 die 5'-NTD aktiviert und die AP geringfügig hemmt. Steigt nach Histidinzusatz die Gesamthydrolyse, so ist das 5'-NTD/AP-Verhältnis erhöht; sinkt sie, so ist es vermindert (15).

Um die Methodik zu verbessern, haben wir in dieser Arbeit optimale Reaktionsbedingungen ausgearbeitet und uns besonders der Frage der richtigen Abgrenzung der spezifischen und unspezifischen Phosphataseaktivitäten zugewandt. In der folgenden Arbeit beschreiben wir eine Möglichkeit, die 5'-NTD im Serum empfindlicher, genauer und schneller zu bestimmen (16).

Material und Methoden

Um Einflüsse auf die 5'-NTD-Aktivität zu studieren, haben wir Seren mit hoher, routinemäßig im klinisch-chemischen Laboratorium bestimmter AP ausgewählt, in denen auch hohe 5'-NTD-

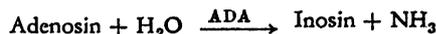
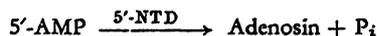
¹⁾ *Enzyme*: 5'-NTD = 5-Ribonucleotid-Phosphohydrolase (EC 3.1.3.5); AP = Alkalische Phosphatase = Orthophosphatmonoe-ster-Phosphohydrolase (EC 3.1.3.1); ADA = Adenosin-desaminase = Adenosin-Aminohydrolase (EC 3.5.4.4).

Aktivität nachweisbar war. Außerdem haben wir aus Aorta vom Menschen nach AHMED und REIS (17) eine praktisch AP-freie 5'-NTD präpariert. Zur Photometrie haben wir ein Eppendorfgerät mit Multiplier und ein Spektralphotometer PMQ II der Fa. Zeiss, Oberkochen, verwendet.

5'-AMP, Adenosindesaminase 10 mg/ml, und Tris von Fa. Boehringer, Mannheim; Glycylglycin von Fa. Th. Schuchardt, München, 2'-AMP und 3'-AMP im Gemisch (2' + 3'-AMP), (z. B. Merck Nr. 869), Adenosin, NiCl₂, MnSO₄, MgCl₂, Na₂S₂O₈, H₂SO₄, HCl, NaOH, CH₃COOH, (NH₄)₂SO₄, Triäthanolamin, Barbitol-Natrium, Natrium-β-Glycerophosphat, di-Natriumphosphat, EDTA, di-Natriumtartrat, Trichloressigsäure, 4-Methylaminophenolsulfat (Metol) und Ammoniummolybdat von Fa. E. Merck, Darmstadt, soweit vorhanden in p. a.-Qualität, ferner Reagenziensätze zur Bestimmung der sauren Phosphatase (SP) und zur kinetischen AP-Bestimmung (Merckotest).

Die Geschwindigkeit der 5'-AMP-Hydrolyse haben wir durch Bestimmung beider Spaltprodukte (P_i und Adenosin) ermittelt. Phosphorsäure haben wir nach LOHMANN und JENDRASSIK (18) mit Metol als Reduktionsmittel bestimmt, Adenosin nach KALČEKAR (19). AP haben wir nach RICK und Mitarbeitern (20, 21) und durch Bestimmung des freigesetzten Phosphats, SP nach ANDERSCH und SZCYPINSKY (22) gemessen. In jedem Falle haben wir Doppelbestimmungen durchgeführt. Leerwerte erhalten wir, indem wir die enzymhaltige Lösung (Serum, Aortenextrakt) nach Ablauf der Inkubationszeit und Zugabe von Trichloressigsäure zur Substratlösung pipettieren.

Um zu einer wenig aufwendigen kinetischen Bestimmung der 5'-NTD-Aktivität zu gelangen, haben wir den UV-Test nach KALČEKAR (19), den SEGAL und BRENNER (23) für Rattenlebermikrosomen und IPATA (24) für Schafhirnextrakt eingesetzt haben, modifiziert und auf Serum übertragen. In diesem Test wird 5'-AMP als Substrat verwendet. Es wird in Adenosin und P_i gespalten. Adenosin wird von zugesetzter ADA zu Inosin desaminiert.



Die letztere Reaktion ist besonders empfindlich durch den Extinktionsabfall bei 265 nm meßbar, dem Maximum des Differenzspektrums Adenosin-Inosin. An Hand des Extinktionskoeffizienten dieser Reaktion ($\Delta\epsilon = 8,69 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$) berechnen wir die μMole des gespaltenen 5'-AMP (23). IPATA hat über einen weiten Aktivitätsbereich strenge Proportionalität zwischen dieser Meßgröße und der 5'-AMP-Hydrolyse nachgewiesen (24).

Dieser kinetische Test wird in 1 cm Quarzküvetten in einem Endvolumen von 3,12 ml bei 265 nm durchgeführt. Die Bandbreite soll 0,9 nm (= 0,2 mm Spaltbreite) nicht überschreiten. Ab 0,2 mm haben wir mit wachsender Spaltbreite verringerte AMP-Absorption zufolge mangelhafter Monochromasie gemessen.

Ergebnisse und Bewertung

Temperatur

Die üblicherweise verwendete Temperatur von 37° haben wir übernommen (7, 14, 15). Es lohnt sich, die Nachteile der Messung bei 37° in Kauf zu nehmen. Wir haben ähnlich wie LEVIN und BOĐANSKY (25) gefunden, daß die Aktivität gegenüber 23° um das 3,1-fache höher liegt.

pH-Wert

Der von den meisten Autoren eingehaltene pH-Wert von 7,5 (2, 7, 14) erweist sich als sehr geeignet (s. Abb. 1). Er liegt für die 5'-NTD gerade noch im op-

timalen Bereich, während die unspezifische 5'-AMP-Hydrolyse im Serum bei pH 7,5 gegenüber anderen pH-Werten relativ sehr gering ist (7, 15, 24, 26, 27).

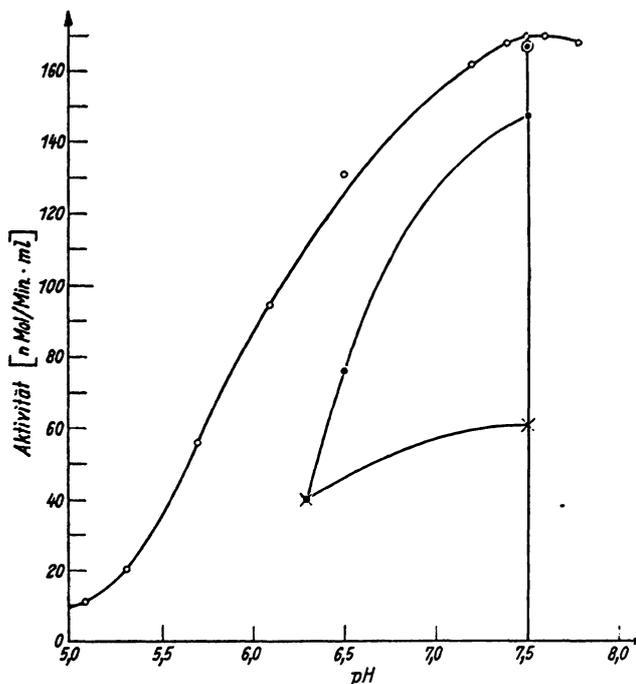


Abb. 1

5'-NTD-Aktivität (nMol 5'-AMP/Min. · ml hydrolysiert) zwischen pH 5,1 und 7,8 und Einfluß von Mn²⁺ und Mg²⁺. ○ = 0,5 mM MnSO₄; ● = 40 mM MgCl₂; ⊙ = 0,5 mM MnSO₄ + 40 mM MgCl₂; × = ohne Mn²⁺ und Mg²⁺. Testansatz: pH und Aktivatoren wie bezeichnet; 0,16M Tris-HCl bzw. Tris-Acetat; sonst wie Abb. 2

Puffer

Wir verwenden Tris, pH 7,5. In Tris zeigt das Enzym bei diesem pH eine deutlich, wenn auch geringfügig höhere Aktivität als in Triäthanolamin und Glycylglycin, die prinzipiell auch geeignet sind, da sie UV-Licht nicht absorbieren und die 5'-NTD nicht hemmen. Die Konzentration des Tris-Puffers ist von Bedeutung. Seren mit erhöhter 5'-NTD-Aktivität weisen oft abnorme Proteinverhältnisse auf, bei denen wir Veränderungen der optischen Dichte bei 265 nm messen, die unterhalb von 0,12M Tris zunehmend als steigender und oberhalb 0,18M Tris zunehmend als fallender „Leerschleib“ imponieren. Wir verwenden als Endkonzentration 0,16M Tris. Diese Konzentration gewährleistet in jedem Falle pH-Konstanz während des Testverlaufs. Im übrigen haben wir in 0,16M Tris regelmäßig eine um 7% höhere Aktivität als in 0,04M Tris gemessen.

Co-Faktoren

Mn²⁺ aktiviert die 5'-NTD stärker als Mg²⁺ (17, 28). Bei ausreichender Mn²⁺-Konzentration wird Mg²⁺-Zusatz überflüssig. Bezeichnen wir die 5'-NTD-Aktivität eines Mischserums bei pH 7,5 ohne Ionenzusatz mit 1, so beträgt sie mit 40 mM Mg²⁺ (2) 2,5, mit 0,5 mM Mn²⁺ 2,8 und mit beiden Ionen in den genannten Konzentrationen ebenfalls 2,8 (vgl. Abb. 1).

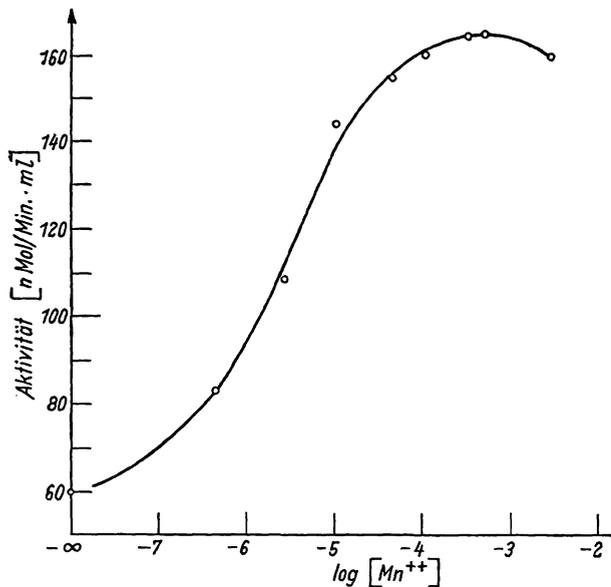


Abb. 2

Einfluß verschiedener Mn^{++} -Konzentrationen auf die 5'-NTD-Aktivität (nMol 5'-AMP/Min. · ml hydrolysiert)

Testansatz: $MnSO_4$ wie bezeichnet; Vol. 3,12 ml; Temp. 37°; 0,16M Tris pH 7,5; 0,1 mM 5'-AMP; 5 μ g ADA in 20 μ l 2,7M $(NH_4)_2SO_4$; 0,1 ml Mischserum mit hoher 5'-NTD-Aktivität (unspez. Phosphatasen bei pH 7,8 kaum meßbar)

Die optimale Mn^{++} -Konzentration ist 0,5 mM (s. Abb. 2). In dieser Konzentration beeinflußt Mn^{++} die unspezifischen alkalischen Phosphatasen im Serum praktisch nicht.

Substratkonzentration

Bei der Wahl der Substratkonzentration sind 5'-AMP-Sättigungskonzentration, Substrathemmung und, speziell im UV-Test, die hohe UV-Absorption des Nucleotides zu berücksichtigen. Wir haben in Mischserum mit hoher 5'-NTD-Aktivität die Abhängigkeit der Aktivität von der 5'-AMP-Konzentration bestimmt. Die graphische Darstellung nach LINEWEAVER und BURK (29) läßt die günstigste Substratkonzentration sowie eine deutliche Substrathemmung erkennen. Als Michaeliskonstante haben wir 11 μ M ermittelt. Überschreitung von 120 μ M 5'-AMP verbietet sich wegen Substrathemmung (s. Abb. 3). Wir verwenden 0,1 mM

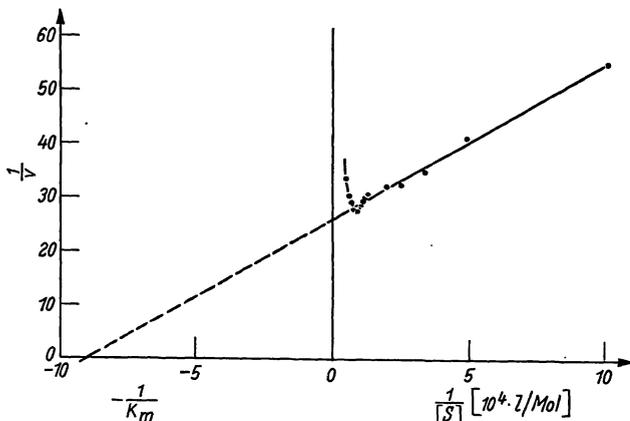


Abb. 3

Reziproke 5'-NTD-Aktivität ($\Delta E_{266}/\text{Min.}^{-1}$) in Abhängigkeit von der reziproken 5'-AMP-Konzentration und Michaeliskonstante (Lineweaver-Burk)

Testansatz: Substrat s. Abszisse; 0,5 mM $MnSO_4$; 0,02 ml Mischserum mit sehr hoher 5'-NTD- und geringer AP-Aktivität; sonst wie Abb. 2

5'-AMP. Bei dieser Konzentration ist die Gesamtabsorption von 5'-AMP und UV-absorbierenden Serumbestandteilen (Protein, Bilirubin) noch ausreichend niedrig, so daß im Spektralphotometer gemessen werden kann. Wir erreichen mit 0,1 mM 5'-AMP 97% der praktisch erreichbaren — das sind 90% der theoretischen — Maximalgeschwindigkeit (vgl. Abb. 3). Die Extinktionsabnahme pro Minute ist der Enzymkonzentration proportional, wenn sie 0,075 nicht überschreitet (kinetischer Test über maximal 5 Min.).

Indikatorenzym Adenosindesaminase

ADA wird von 0,5 mM Mn^{++} um 15% gehemmt. Die von uns im Test verwendete Menge, 5 μ g ADA in 20 μ l 2,7M $(NH_4)_2SO_4$, ermöglicht aber eine praktisch nicht mehr zu steigernde Desaminierung des durch die 5'-NTD freigesetzten Adenosins.

Ausschluß von AMP-Desaminase, Erythrocyten- und Prostataphosphataseaktivitäten

Bestimmt man 5'-NTD in Gegenwart von 16 mM EDTA, das die AP und die 5'-NTD vollständig hemmt (12), oder mit einem 3 mg/100 ml Hämoglobin enthaltenen Hämolyt aus gewaschenen Erythrocyten, die relativ viel AMP-Desaminase und saure Phosphatase enthalten, so läßt sich kein Extinktionsabfall bei 265 nm beobachten. Daraus folgt, daß wir in unserem Test praktisch keine AMP-Desaminase- und Erythrocytenphosphataseaktivitäten messen (beide werden durch EDTA nicht beeinflußt).

Saure Phosphatase im Serum kann sich durch unspezifische Hydrolyse in unserem Test nur bei extremer Erhöhung infolge Prostata-Carcinoms auswirken (s. l. c. 16).

Haltbarkeit der Serum-5'-NTD

Serum-5'-NTD wird außerordentlich langsam inaktiviert, wenn man das Serum bei 0°—4° im Kühlschrank aufbewahrt. Im Mittel haben wir innerhalb von 3 bis 6 Monaten einen Aktivitätsverlust von 3—8% gefunden.

Im folgenden Abschnitt verwenden wir die oben beschriebene Methodik zur Prüfung der bisher in der Literatur angegebenen Möglichkeiten zur Abgrenzung der unspezifischen Phosphataseaktivitäten und beschreiben ein besseres Verfahren (vgl. Einleitung Nr. 1—5):

1. Vergleichssubstrat

Werden zur Erfassung des Anteils der unspezifischen Phosphataseaktivitäten von 5'-AMP in einem Vergleichsansatz die von der 5'-NTD nicht gespaltenen Substrate β -Glycerophosphat (7, 28) oder Phenylphosphat (7, 26, 27, 30) verwendet, so wird vorausgesetzt, daß die unspezifischen Phosphatasen diese Stoffe bei pH 7,5 genau so schnell wie 5'-AMP hydrolysieren. Mehrere Autoren bemerken kritisch, daß diese Voraussetzung nicht erfüllt sei (12, 15, 17).

Als Vergleichssubstrat erweist sich 2'- + 3'-AMP als besonders geeignet; wir verwenden es für unsere Untersuchungen aus folgenden Gründen:

- Die Hydrolyse dieses Substrates, welches von 5'-NTD nicht gespalten wird (28, 31, 32), ist in gleicher Weise wie die 5'-AMP-Spaltung im kinetischen UV-Test mit ADA zu verfolgen, da ebenfalls Adenosin entsteht.
- Von den unspezifischen Serumphosphatasen ist es im wesentlichen AP, die bei pH 7,5 5'-AMP noch hydrolysieren kann (7, 15). Aus kinetischen Untersuchungen anderer Autoren mit mehreren Substraten (33, 34, 35) und eigenen Versuchen (vgl. Abb. 4 und Diskussion) geht hervor, daß sich gerade 2'- + 3'-AMP zur Bestimmung dieser unspezifischen Hydrolyse gut eignet.

2. Vernachlässigung unspezifischer Phosphataseaktivitäten

Abbildung 5 zeigt in einem typischen Beispiel, daß die unspezifische Phosphathydrolyse, besonders wenn die AP im Verhältnis zur 5'-NTD stark erhöht ist, z. B. bei osteoblastischem Knochenprozeß, nicht vernachlässigt werden darf. Die in Abbildung 5 beschriebene AP-Aktivität betrug 2920 mU/ml im kinetischen Test nach RICK und Mitarbeitern (20, 21). Blicke diese AP-Aktivität als solche unberücksichtigt und würde sie als 5'-NTD-Aktivität mitbewertet, so fielen der bei pH 7,5 gemessene 5'-NTD-Wert fast um das Fünffache zu hoch aus. BARDAWILL und CHANG (3), die zwecks Verringerung des AP-Fehlers bei pH 7,3 messen, würden in unserem Beispiel einen 2½fach zu hohen 5'-NTD-Wert messen. Selbst bei niedrigeren pH-Werten bis 6,5 ist in solchem Falle die AP gegenüber der 5'-NTD nicht zu vernachlässigen.

3. Selektive AP-Hemmung

Nach YOUNG ist eine selektive AP-Hemmung durch 1,5 mM EDTA möglich (2). Wichtige Voraussetzungen, unter denen die EDTA-Hemmung stattfindet, beschreibt YOUNG nicht. Eine praktisch vollständige selektive AP-Hemmung durch EDTA ist auch nach unseren Versuchen möglich. Wir beschreiben im folgenden die von uns ermittelten Bedingungen zur selektiven AP-Hemmung in Mischserum mit hoher AP:

- Das Serum muß verdünnt werden. Wir haben es zur Vorinkubation mit EDTA bei 37° 1:30 mit 0,16M Tris pH 7,5 verdünnt.
- 1,5 mM EDTA und
- 40 mM MgCl₂ müssen bei der Vorinkubation zugegen sein.
- Eine Hemmung der AP um 90% wird unter diesen Bedingungen in 2 Stdn. erreicht (s. Abb. 6).

Dabei bleibt die 5'-NTD-Aktivität voll erhalten. Wird 40 mM Mg⁺⁺ nicht zur Vorinkubation, wohl aber im 5'-NTD-Test eingesetzt, so hemmt EDTA zwar die AP schneller, aber die 5'-NTD wird ebenfalls vollständig inaktiv (s. Abb. 7).

Die Vorinkubation von 2 Stdn. erscheint uns für einen einfachen Enzymtest zu lang. Außerdem kann Mn⁺⁺,

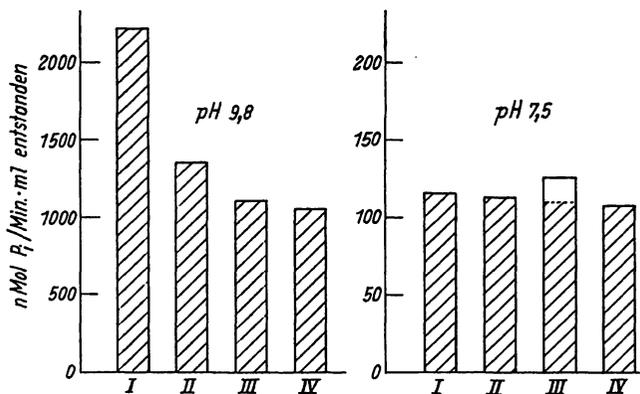


Abb. 4

Vergleich der Hydrolyseraten verschiedener Phosphorsäureester durch Serum bei pH 9,8 und 7,5. I = Phenylphosphat; II = 2'- + 3'-AMP; III = 5'-AMP; IV = β-Glycerophosphat; ▨ = AP-Aktivität; □ = mutmaßlicher 5'-NTD-Anteil an der 5'-AMP-Hydrolyse
 Testansatz: Vol. 2,0 ml; Temp. 37°; Konzentration der Phosphorsäureester 1 mM; Mischserum mit sehr hoher AP-Aktivität
 pH 9,8: 0,1M Diäthanolamin; 50 μM Mg⁺⁺; 0,025 ml Serum; 30 Min. Inkubation
 pH 7,5: 0,16M Tris; 0,5 mM Mn⁺⁺; 0,1 ml Serum; 180 Min. Inkubation

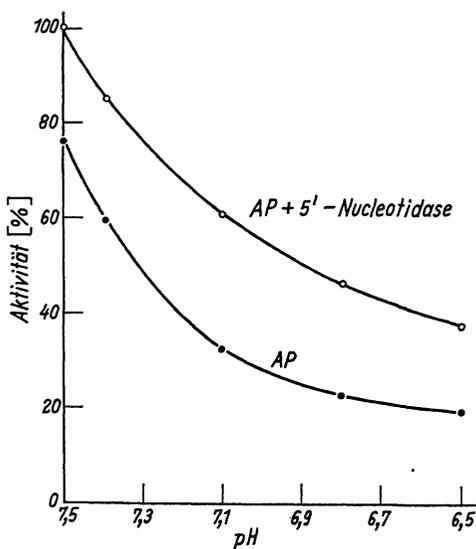


Abb. 5

Phosphathydrolyse bei verschiedenen pH-Werten am Beispiel eines Serums mit hoher AP- und relativ geringer 5'-NTD-Aktivität. 5'-AMP-Hydrolyse/Min./ml bei pH 7,5 gleich 100% gesetzt. ○—○ = 0,1 mM 5'-AMP; ●—● = 0,1 mM 2'- + 3'-AMP als Substrat
 Testansatz, pH und Substrat wie bezeichnet; 0,16M Tris-HCl bzw. Tris-Acetat; 0,5 mM MnSO₄; sonst wie Abb. 2

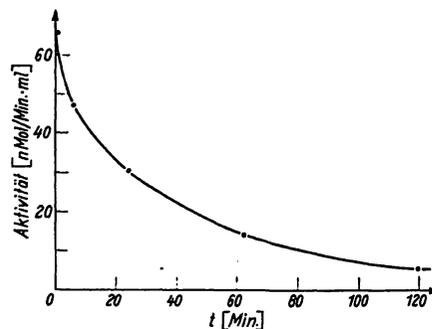


Abb. 6

AP-Aktivität (nMol 2'- + 3'-AMP/Min. · ml hydrolysiert) in Abhängigkeit von der Dauer der Vorinkubation mit EDTA und Mg⁺⁺. 1m AP-Test; 1,5 mM EDTA; 40 mM MgCl₂ (kein Mn⁺⁺); 0,1 mM 2'- + 3'-AMP; 0,16M Tris-HCl; 0,1 ml Mischserum mit sehr hoher AP-Aktivität; sonst wie Abb. 2

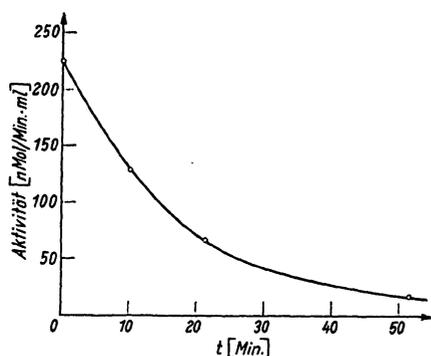


Abb. 7

5'-NTD-Aktivität (nMol 5'-AMP/Min. · ml hydrolysiert) in Abhängigkeit von der Dauer der Vorinkubation mit 1,5 mM EDTA ohne Mg^{++} im 5'-NTD-Test: 0,1 mM 5'-AMP; 0,1 ml Serum mit sehr hoher 5'-NTD- und geringer AP-Aktivität; sonst wie Abb. 6

der günstigste Co-Faktor der 5'-NTD, nicht eingesetzt werden, da er mit EDTA einen sehr stabilen Komplex bildet (log Stabilitätskonstante = 13,4 (36)).

4. Selektive 5'-NTD-Hemmung

Auf Grund der Angaben von AHMED und REIS (17) nutzt CAMPBELL (14) die selektive Hemmbarkeit der 5'-NTD durch Ni^{++} aus und mißt die Serum-5'-NTD als Differenz der 5'-AMP-Hydrolyse ohne und mit Ni^{++} -Ionen. Voraussetzungen für die Richtigkeit dieser Methode sind, daß die 5'-NTD durch die verwendete Ni^{++} -Konzentration (10 mM) vollständig gehemmt und die AP nicht beeinflußt wird. Diese Bedingungen sind jedoch nicht erfüllt. Ebenso wie AHMED und REIS (17) haben wir gefunden, daß 10 mM Ni^{++} die 5'-NTD-Aktivität in einem Aortenmediaextrakt nur zu 90% hemmt. Auch im Serum wird die 5'-NTD, wie Abbildung 8 zeigt, nur zu 90% gehemmt. Darüber hinaus kann auch die Serum-AP, besonders wenn sie zufolge osteoblastischer Knochenprozesse erhöht ist (2, 5, 7), durch Ni^{++} erheblich gehemmt werden. So haben SCHWARTZ und BODANSKY (15) nachgewiesen, daß eine aus menschlichem Knochen angereicherte AP durch 10 mM Ni^{++} bei pH 7,5 zu 70% gehemmt wird.

Bei unseren Versuchen zur Übertragung der kinetischen 5'-NTD-Bestimmung auf Serum hat sich außerdem die Differenzbestimmung mit Ni^{++} verboten, weil Ni^{++} eine Zunahme der optischen Dichte bewirkt (Proteinfällung), die nach einigen Minuten auch als Trübung imponiert. Dieser Effekt kann durch 40 mM Mg^{++} zwar weitgehend, aber nicht vollständig verhindert werden. Außerdem bildet Ni^{++} mit den in Frage kommenden Puffern (Tris, Triäthanolamin, Glycylglycin) Komplexe (36, 37).

5. Gleichzeitige 5'-NTD-Aktivierung und AP-Hemmung durch Histidin

Histidin aktiviert 5'-NTD und hemmt AP bei pH 8,5 (15). Da das Ausmaß der Histidinhemmung sehr gering und außerdem je nach Herkunft der AP unterschiedlich ist (38), wird sich dieser Effekt für eine quantitative 5'-NTD-Bestimmung kaum ausnutzen lassen.

Diskussion

5'-Nucleotidase (5'-NTD), ein ubiquitäres Enzym, welches 5'-Mononucleotide in Nucleosid und Phosphat spaltet, würde sicherlich häufiger im Serum bestimmt werden, wenn die Methodik weniger aufwendig wäre. Schon die große Anzahl der in der Literatur beschriebenen Variationen zur 5'-NTD-Bestimmung deutet darauf hin, daß es einen einfachen, sicheren Test bisher nicht gegeben hat. Wesentliche Nachteile liegen vor allem in der langen Inkubationsdauer, der ungenauen Abgrenzung der unspezifischen Phosphathydrolyse des Nucleotides und in der Endpunktbestimmung mittels Phosphatbestimmung. Wir haben die verschiedenen Literaturangaben methodisch überprüft und außerdem Versuche zur Verbesserung der 5'-NTD-Bestimmung gemacht, um daraus unter möglichst günstigen Bedingungen einen korrekten, sehr viel einfacheren und empfindlicheren Test zu entwickeln. Den naheliegenden Versuch, den von KALCKAR (19) vorgeschlagenen UV-Test auf Serum zu übertragen, haben wir verwirklichen können und damit die Vorteile eines kinetischen Tests ausgenutzt (16).

Zu den im Ergebnisteil beschriebenen Untersuchungen möchten wir noch einige ergänzende Bemerkungen machen, wobei wir im wesentlichen die gleiche Reihenfolge einhalten.

Nach CONWAY und COOKE (39) kommt die AMP-Desaminase im Serum nur in sehr geringen Mengen vor (etwa 0,05 Einheiten gegenüber 14 in Vollblut und 1145 in Skelettmuskulatur) und ist bei Substratkonzentrationen von 0,1 mM äußerst wenig aktiv. Diese Angaben stehen in gutem Einklang mit unseren Versuchen, auf Grund derer wir das Vorkommen wesentlicher AMP-Desaminaseaktivitäten im Serum ausschließen können.

Bei pH 7,5 zeigt AP unter sonst gleichen Bedingungen nur einen Bruchteil der Aktivität bei pH 9,3 (7, 15, 26, 27). Der durch ihre ungenaue Abgrenzung mögliche Fehler bei der 5'-NTD-Bestimmung ist daher geringer, als wenn die 5'-NTD bei pH 9,3, ihrem zweiten Optimum in Gegenwart von Mg^{++} (25), oder bei pH 8,5, ihrem Optimum in Gegenwart von Aminosäuren und Mg^{++} (38, 40) gemessen würde.

Die durch 0,5 mM Mn^{++} bewirkte starke Aktivierung der Serum-5'-NTD liegt im Bereich der durch optimale Mg^{++} -Konzentration erreichbaren Aktivierung. Nach YOUNG (2) wird die Serum-5'-NTD durch 40 mM Mg^{++} um das 3fache, nach SCHWARTZ und BODANSKY (15) um das 2,3fache aktiviert.

Die von uns bei pH 7,5 mit 11 μM 5'-AMP bestimmte Michaeliskonstante für Serum-5'-NTD liegt in derselben Größenordnung wie die in der Literatur für 5'-NTD anderer Herkunft beschriebenen K_m -Werte (23, 24, 25, 32).

Im Bereich der optimalen Substratkonzentration von etwa 100 μM (noch keine Substrathemmung) ist eine genauere Bestimmung der 5'-AMP-Hydrolyserate durch Phosphatbestimmung kaum mehr möglich (24, 38).

Dagegen läßt sich im kinetischen UV-Test noch eine AMP-Spaltung von weniger als 1 nMol registrieren. Da die 5'-NTD-Aktivität im Serum bisher nur mittels Phosphatbestimmung nach längerer Inkubation gemessen wurde, liegen die hierfür verwendeten 5'-AMP-Konzentrationen (1—5 mM (7, 13, 14) bereits in einem Bereich, für den wir Substrathemmung haben nachweisen können.

AP wird ebenfalls durch ihre Substrate gehemmt (21, 38, 41—43). Die Hemmkonzentrationen liegen höher als bei der 5'-NTD und schwanken je nach Substrat (43), pH (41—43) und Herkunft des Enzymes (38).

Daraus resultierende Fehler können wir umgehen durch Verwendung von 2'- + 3'-AMP als Vergleichssubstrat, dessen Hydrolyse gleich der des 5'-AMP im empfindlichen UV-Test gemessen werden kann, und dessen Konzentration wir daher mit 100 μ M so niedrig halten können, daß keine Substrathemmung auftritt.

Einen weiteren Anhalt dafür, daß sich 2'- + 3'-AMP als Vergleichssubstrat zur Bestimmung der unspezifischen Phosphathydrolyse besonders gut eignet, haben wir in den Arbeiten von KING und DELORY (33, 34) gefunden, die mit mehreren AP-Präparationen eine große Anzahl von Substraten untersucht haben und folgende Zusammenhänge aufzeigen: Je saurer ein Phosphatester ist, d. h. je niedriger sein pK_1 -Wert, um so weiter im Alkalischen liegt sein Spaltungsoptimum, um so schneller wird er bei diesem pH hydrolysiert und um so kleiner ist die Michaeliskonstante der AP.

In eine nach diesen Gesichtspunkten aufgestellte Reihe mehrerer Phosphatester haben wir die von KING und DELORY nicht untersuchten Substrate 2'-AMP, 3'-AMP und 5'-AMP nach ihren pK_1 -Werten (44) eingeordnet, die, einander eng benachbart, ebenso wie *o*-Kresylphosphat, zwischen denen von Phenylphosphat und β -Glycerophosphat liegen, 5'-AMP wiederum zwischen 3'-AMP und 2'-AMP (s. Tab. 1).

So wie REIS (26) gemäß der Theorie von KING und DELORY gezeigt hat, daß 5'-AMP von AP langsamer als das saurere Phenylphosphat und schneller als das basischere β -Glycerophosphat gespalten wird, dürfen wir annehmen, daß ein Gemisch von 2'-AMP und 3'-AMP (2'- + 3'-AMP), weil sich das Mittel der pK_1 -Werte dem pK_1 -Wert von 5'-AMP annähert, durch AP auch praktisch ebenso schnell hydrolysiert wird wie

5'-AMP. Tatsächlich hat auch VOLKIN (35) mit einer AP-Präparation aus Knochen gezeigt, daß bei pH 9,0 die Nucleotide 2'-AMP, 3'-AMP und 5'-AMP gleich schnell gespalten werden. Auch nach unseren Versuchen liegen bei pH 9,8 die Hydrolyseraten von 2'- + 3'-AMP und 5'-AMP benachbart zwischen denen von Phenylphosphat und β -Glycerophosphat (s. Abb. 4). Bei pH 7,5 halten die allein von AP gespaltenen Ester noch immer die gleiche Sequenz ein (s. Abb. 4); ihre bei pH 9,8 zweifellos noch deutlich verschiedenen Hydrolyseraten differieren jetzt aber nur noch sehr wenig—möglicherweise deshalb, weil dieser pH vom Spaltungsoptimum der leichter hydrolysierbaren Phosphatester schon so weit entfernt liegt, daß ihre Hydrolyserate derjenigen der basischeren Substrate nahekommt.

Obwohl wir bei pH 7,5 neben der immer vorhandenen spezifischen die unspezifische 5'-AMP-Hydrolyse durch Serum nicht direkt selektiv messen können, nehmen wir aus diesen Gründen an, daß sie, wie bei pH 9,8, zwischen derjenigen des Phenylphosphates und der des β -Glycerophosphates liegt und durch Bestimmung der 2'- + 3'-AMP-Spaltung gut abgeschätzt werden kann. Das gleiche dürfte für *o*-Kresylphosphat zutreffen, dessen pK_1 -Wert dem des 5'-AMP besonders nahekommt.

Unsere Versuche, in denen wir in Gegenwart von 40 mM Mg^{++} durch 1,5 mM EDTA AP fast vollständig hemmen, stehen in Einklang mit den Angaben von MATHIES (45), daß die AP-Hemmung nicht auf Mg^{++} , sondern auf Zn^{++} -Bindung durch EDTA beruht.

Eine 5'-NTD-Hemmung durch 1 mM EDTA (s. Ergebnisse) ist auch von CENTER und BEHAL (28) beschrieben worden. Obwohl sie, wie wir gezeigt haben, in Gegenwart von 40 mM Mg^{++} nicht auftritt, wird auch die Hemmung der Serum-5'-NTD nicht allein auf Mg^{++} -Mangel zurückzuführen sein, da HILL und SAMMONS (12) durch 16 mM EDTA auch in Gegenwart von 40 mM Mg^{++} vollständige 5'-NTD-Hemmung erreichen.

Durch 10 mM Ni^{++} wird, wie SCHWARTZ und BODANSKY (15) gezeigt haben, nicht nur die in Aorta und Serum vorkommende 5'-NTD, sondern auch das aus Bullensperma stammende Enzym nur zu 90% gehemmt. Eine Erhöhung der Ni^{++} -Konzentration kann, wie Abbildung 8 zeigt, noch stärkere Hemmung hervorrufen, aber dann verstärkt sich die in dem von CAMPBELL (14) beschriebenen Testansatz (0,03M Veronal; 1 mM Mn^{++}) mit Serum immer auftretende Trübung. Die von HILL und SAMMONS (12) mit 40 mM Mg^{++} erzielte Verringerung dieser Trübungsreaktion durch Nickelionen wird mit 1M Mg^{++} vollständig; doch hemmt diese hohe Mg^{++} -Konzentration die 5'-NTD und AP erheblich (15).

Auch NaCl- oder Tris-Konzentrationen, die über der höchsten mit Veronal erreichbaren Konzentration liegen, verhindern eine Trübung. Tris setzt jedoch durch Komplexbildung die Ni^{++} -Konzentration herab (37), was auch erklären dürfte, daß LEVIN und BODANSKY (25) in 0,08M Tris nur eine 24proz. Hemmung der Bullensperma-5'-NTD durch 1 mM Ni^{++} fanden.

Tab. 1
Physikalisch-chemische Daten für AP in Abhängigkeit vom Substrat, modifiziert nach DELORY und KING, erweitert um die Adeninmononucleotide

Phosphatester	pK_1	pH-Optimum	K_m (mM)	relative Hydrolyserate (β -Glycerophosphat = 1)
Bromphenyl-P	5,44	9,96	0,3	3,4
Nitrophenyl-P	5,70	9,80	0,5	2,8
Phenyl-P	5,73	9,76	0,6	2,4
3'-AMP	5,88			
<i>o</i> -Kresyl-P	6,04	9,55	0,8	1,5
5'-AMP	6,05			
2'-AMP	6,15			
β -Glycero-P	6,34	8,82	1,2	1,0
α -Glycero-P	6,44	8,62	1,4	0,7
Äthyl-P	6,45	8,08	2,5	0,3

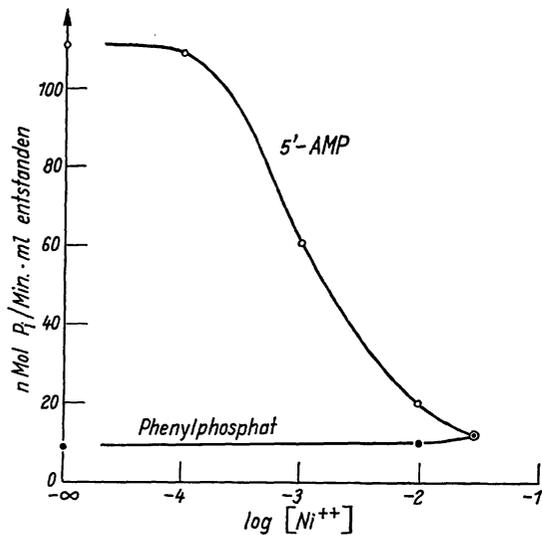


Abb. 8

Hemmung der Serum-5'-NTD durch Ni^{++} . Testansatz (nach CAMPBELL): 1 mM Substrat und $NiCl_2$, wie bezeichnet; Vol. 2,0 ml; Temp. 37° ; 0,03M Veronal pH 7,5; 1 mM $MnSO_4$; 0,2 ml Serum mit hoher 5'-NTD- und AP-Aktivität; 30 Min. Inkubation

Der Gedanke, das in Gegenwart von ADA entstehende sekundäre Reaktionsprodukt NH_4^+ mit Glutamatdehydrogenase anhand der NADH-Oxydation zu bestimmen, liegt nahe (46, 47). Nachteile: Es wird nur $\frac{1}{3}$ der Empfindlichkeit des kinetischen Tests bei 265 nm erreicht. Außerdem haben wir selbst in Seren mit erhöhter 5'-NTD-Aktivität stets einen „Leerschleim“ gefunden, der die enzymbedingte Extinktionsabnahme weit übertrifft.

Wir haben zwar nur den ein Spektralphotometer voraussetzenden UV-Test in seinen technischen Einzelheiten ausgearbeitet und geprüft (s. l. c.). Trotzdem möchten wir abschließend den Untersuchern, die auf eine Endpunktbestimmung mit Phosphatanalyse angewiesen sind, wenn der kinetische UV-Test nicht möglich ist (fehlendes Meßgerät, oder in Gewebsextrakten zu hohe optische Dichte, ADA-Inhibitoren, AMP-Desaminase), einen Vorschlag machen, die in der Literatur und in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse zu einem möglichst empfindlichen und korrekten 5'-NTD-Test zu vereinigen: In zwei Parallelansätzen mit 5'-AMP und 2'- + 3'-AMP wird die Phosphat-hydrolyse durch Serum bestimmt. Die Differenz ist ein Maß für die 5'-NTD-Aktivität (1 mU (37°)/ml = 1 nMol P_i pro Min. pro ml).

Ansatz I: In ein Zentrifugenglas werden einpipettiert: 1,6 ml 0,20M Tris, pH 7,5; 0,1 ml 10 mM $MnSO_4$ (in H_2O); 0,1 ml 20 mM 5'-AMP (mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt). Etwa 5 Min. lang in ein Wasserbad von 37° stellen, dann 0,2 ml Serum zugeben und inkubieren. Nach genau 30 Min. Reaktion mit 2 ml 10proz. Trichloressigsäure stoppen. Zentrifugieren und 2 ml des Überstandes zur Phosphatbestimmung verwenden.

Ansatz II: wird identisch behandelt, enthält aber anstelle von 5'-AMP 0,1 ml 20 mM 2'- + 3'-AMP.

Übersteigt die saure Prostata-Phosphatase 40 mU/ml (nach ANDERSCH und SZCYPINSKI (22))²⁾, so werden 0,2 ml Tris durch 0,2M L-Tartrat²⁾ ersetzt.

²⁾ Merckotest „Saure Phosphatase“.

Literatur

1. YOUNG, I. I., Clin. Res. Proc. 5, 213 (1957).
2. YOUNG, I. I., Ann. N. Y. Acad. Sci. 75, 357 (1958).
3. BARDAWILL, C. und C. CHANG, Canad. Med. Ass. J. 89, 755 (1963).
4. VENNIK, I. E., F. KERN und W. D. CORLEY, Gastroenterology, Baltimore 45, 492 (1963).
5. FRENKEL, M. und I. A. J. VAN TRIET, Israel med. J. 23, 18 (1964).
6. SMITH, K., H. H. VARON, G. J. RACE, D. L. PAULSON, H. C. URSCHEL und J. T. MALLAMS, Cancer 19, 1281 (1966).
7. DIXON, T. F. und M. PURDOM, J. Clin. Path., London 7, 341 (1954).
8. WACHSTEIN, M. und R. SIGISMONDI, Amer. J. Clin. Path. 30, 523 (1958).
9. KOWLESSAR, O. D., J. H. PERT, L. J. HAEFFNER und M. H. SLEISENGER, Proc. Soc. Exper. Biol. Med., N. Y. 100, 191 (1959).
10. KOWLESSAR, O. D., L. J. HAEFFNER, E. M. RILEY und M. H. SLEISENGER, Amer. J. Med. 31, 231 (1961).
11. SALVETTI, A., F. AMBROGI, C. LONI und B. GRASSI, Progresso med., Napoli 21, 14 (1965).
12. HILL, P. G. und H. G. SAMMONS, Clinica chim. Acta, Amsterdam 13, 739 (1966).
13. SCHWARTZ, M. K. und O. BODANSKY, Cancer 18, 886 (1965).
14. CAMPBELL, D. M., Biochem. J. 82, 34p (1962).
15. SCHWARTZ, M. K. und O. BODANSKY, Amer. J. Clin. Path. 42, 572 (1964).
16. LEYBOLD, K., J. BECKMANN und L. WEISBECKER, diese Z. 7, 25 (1969) nachstehend.
17. AHMED, Z. und J. L. REIS, Biochem. J. 69, 386 (1958).
18. LOHMANN, K. und L. JENDRASSIK, Biochem. Zschr. 178, 419 (1926).
19. KALCKAR, H. M., J. biol. Chemistry 167, 445 (1947).
20. RICK, W. und T. U. HAUSAMEN, Z. analyt. Chem. 212, 267 (1965).
21. HAUSAMEN, T. U., R. HELGER, W. RICK und W. GROSS, Clinica chim. Acta, Amsterdam 15, 241 (1967).
22. ANDERSCH, M. A. und A. J. SZCYPINSKI, Amer. J. Clin. Path. 17, 571 (1947).
23. SEGAL, H. L. und B. M. BRENNER, J. biol. Chemistry 235, 471 (1960).
24. IPATA, P. L., Analyt. Biochem. 20, 30 (1967).
25. LEVIN, S. J. und O. BODANSKY, J. biol. Chemistry 241, 51 (1966).
26. REIS, J. L., Biochem. J., 48, 548 (1951).
27. PEARSE, A. G. E. und J. L. REIS, Biochem. J., 50, 534 (1952).
28. CENTER, M. S. und F. J. BEHAL, Arch. Biochem. Biophysics 114, 414 (1966).
29. LINEWEAVER, H. und K. D. BURK, J. Am. chem. Soc. 56, 658 (1934).
30. AHMED, Z. und E. J. KING, Biochim. biophysica Acta, Amsterdam 34, 313 (1959).
31. REIS, J. L., Biochem. J. 46, xxi (1950).
32. SONG, C. S. und O. BODANSKY, Biochem. J. 101, 5c (1966).
33. KING, E. J. und G. E. DELORY, Biochem. J. 33, 1185 (1939).
34. DELORY, G. E. und E. J. KING, Biochem. J. 37, 547 (1943).
35. VOLKIN, E., in: Colowick-Kaplan (Hrsg.): Methods in Enzymology II, S. 539. Academic Press Inc., Publishers, New York (1955).
36. MARTELL, A. E. und M. CALVIN, Die Chemie der Metallchelate-Verbindungen, S. 462. Verlag Chemie, Weinheim (1958).
37. HANLON, D. P., D. S. WATT und E. W. WESTHEAD, Analyt. Biochem. 16, 225 (1966).
38. BODANSKY, O. und M. K. SCHWARTZ, J. biol. Chemistry 238, 3420 (1963).
39. CONWAY, E. J. und R. COOKE, Biochem. J. 33, 479 (1939).
40. HEPPEL, L. A. und R. J. HILMOE, J. biol. Chemistry 188, 665 (1951).
41. ROSS, M. H., J. O. ELY und J. G. ARCHER, J. biol. Chemistry 192, 561 (1951).
42. MORTON, R. K., Biochem. J. 65, 674 (1957).
43. MOTZOK, I., Biochem. J. 72, 169 (1959).
44. ALBERTY, R. A., R. M. SMITH und R. M. BOCK, J. biol. Chemistry 193, 425 (1951).
45. MATHIES, J. C., J. biol. Chemistry 233, 1121 (1958).
46. KIRSTEN, E., C. GEREZ und R. KIRSTEN, Biochem. Zschr. 337, 312 (1963).
47. LORENZ, W., J. KUSCHE und E. WERLE, Biochemische Analytik, Kurzreferat der Tagung vom 29. 4.—2. 5. 1968 in München. S. 16. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, J. F. Bergmann München (1968).

Dr. K. Leybold
23 Kiel Metzstr. 53—57