

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
12. Jg. 1974, S. 23–27

Empfindliche Mikromethode zur Bestimmung der UDP-Glucuronyltransferase-Aktivität in Leberhomogenat mit [^{14}C] *p*-Nitrophenol als Substrat

Von *W. Lehnert, J. Limberg* und *W. Künzer*

Universitäts-Kinderklinik, Freiburg/Brsg. (Direktor: Prof. Dr. W. Künzer)

(Eingegangen am 20. November 1972/24. Oktober 1973)

Es wird eine neue Mikromethode zur Bestimmung der UDP-Glucuronyltransferase-Aktivität mit [^{14}C] *p*-Nitrophenol als Substrat beschrieben. Schon mit Leberhomogenaten, die 1–2 mg Leber enthalten, lassen sich Bestimmungen mit einer Standardabweichung von $\pm 3,3\%$ durchführen.

Die mit dieser Methode gemessene pH-Abhängigkeit der Glucuronyltransferase-Aktivität zeigt ein Minimum bei pH 7,3 und ein Maximum bei pH 7,4. Eine Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Homogenisierungsdauer läßt sich reproduzierbar nachweisen.

A sensitive microassay for UDP-Glucuronyltransferase in liver homogenates, using [^{14}C] p-nitrophenol as substrate

A new micromethod is described for determination of UDP-glucuronyltransferase with [^{14}C] *p*-nitrophenol as the substrate. Liver homogenates containing as little as 1 to 2 mg of liver tissue are sufficient for the enzyme determination, which has a standard deviation of $\pm 3.3\%$.

The pH-dependency of the glucuronyltransferase, measured by this method, showed a minimum at pH 7.3 and a maximum at pH 7.4.

The sensitivity of the method permitted the demonstration of a reproducible relationship between enzyme activity and time of homogenization.

Die UDP-Glucuronyltransferase (EC 2.4.1.17), ein membrangebundenes Enzym, befindet sich im endoplasmatischen Retikulum und ist verantwortlich für die Übertragung des Glucuronylrestes der UDP-Glucuronsäure auf verschiedene Akzeptoren, die entweder körpereigene Metaboliten oder Fremdstoffe sein können. Durch Kopplung mit Glucuronsäure werden diese Stoffe harn- bzw. gallengängig.

Größte Bedeutung wird der UDP-Glucuronyltransferase im Hinblick auf die Genese des physiologischen und pathologischen Neugeborenenikterus beigemessen. Daß die hiermit zusammenhängenden Probleme noch so wenig erschlossen werden konnten, liegt nicht zuletzt an der Schwierigkeit, eine verlässliche Methode zu finden, die eine hinreichend genaue Bestimmung der UDP-Glucuronyltransferase in Leberproben, wie sie durch Blindpunktion an Neugeborenen gewonnen werden können, gestattet. Aber auch rein biochemische Fragestellungen, wie die Verfolgung der Kinetik der UDP-Glucuronyltransferase-Aktivierung durch Detergentien konnten bisher nicht befriedigend bearbeitet werden, weil es an einer ausreichend empfindlichen Bestimmungsmethode fehlte (1,2).

In den letzten Jahren sind mehrere Bestimmungsmethoden der UDP-Glucuronyltransferase beschrieben worden (3,4,5,6,7)¹, von denen jedoch einige unbrauchbar bzw. für unser Problem nur bedingt geeignet sind. In der Konzeption bestechend ist die Methode von *Metge*

et al. (3), die nach Inkubation der Leberprobe mit Bilirubin und UDP-Glucuronsäure mit [^{35}S] Sulfanilsäure diazotieren und die radioaktiven Azopigmente nach Extraktion papierchromatographisch auftrennen. Leider konnten wir diese Methode trotz besten Bemühens nicht reproduzieren. Es scheint unmöglich, die beiden interessierenden Flecke vom großen Überschuß an [^{35}S] Sulfanilsäure, [^{35}S] Diazosulfanilsäure, der daraus entstehenden [^{35}S] *p*-Hydroxybenzolsulfonsäure und vielen anderen radioaktiven Verunreinigungen, die durch Diazotieren aromatischer Komponenten des Leberhomogenates entstehen, durch einfache Papierchromatographie abzutrennen. Durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie in verschiedenen Lösungsmitteln jedoch konnten wir dieses Problem inzwischen weitgehend lösen. Wir werden in Kürze darüber berichten.

Die Methode von *Menken* et al. (4) ist wegen der schweren Zugänglichkeit des verwendeten [^{14}C] Bilirubins nur beschränkt anwendungsfähig. Über die fluorimetrische Methode von *Wong* (5) mit Harmol als Substrat liegen unseres Wissens noch keine weiteren Erfahrungen vor. Erfolgversprechend und reproduzierbar scheint die Methode von *Heirwegh* et al. (6) zu sein, bei der zu-

¹) Während der Revision des Manuskripts dieser Arbeit ist eine weitere Bestimmungsmethode veröffentlicht worden: *Marniemi, J. & Hänninen, O. (1973) FEBS Lett. 32, 273–276*

dem Bilirubin als Substrat zur Anwendung kommt. Die notwendige Menge von 20 mg Leber ist jedoch durch Blindpunktion an Neugeborenen nicht zu gewinnen, zumal ein Teil des Gewebes für notwendige histologische Untersuchungen verwendet werden muß.

In der vorliegenden Arbeit wird eine neue Mikrobe-stimmungsmethode der UDP-Glucuronyltransferase beschrieben. Als Substrat haben wir, trotz gewisser Bedenken, [^{14}C] *p*-Nitrophenol gewählt, da die Handhabung dieser Verbindung und ihres Glucuronides weitgehend problemlos ist und damit die Voraussetzungen für eine exakt reproduzierbare Methode gegeben schie-nen.

Das radioaktive Aglucon wird mit Leberhomogenat aus 2 mg Leber und UDP-Glucuronsäure bei 37° C inkubiert, der Ansatz, um quantitative Extraktion und im UV-Licht sichtbare Mengen an Substanz zu gewährleisten, mit nichtradioaktivem *p*-Nitrophenol (*p*-NPh)² und *p*-Nitrophenylglucuronid (*p*-NPhG)² versetzt, eingedampft und der Rückstand mit absolutem Alkohol extrahiert. Durch Dünnschichtchromatographie an Cellulose lassen sich das *p*-NPh und sein Glucuronid in einfacher Weise trennen. Aus dem Radioaktivitätsverhältnis der beiden Verbindungen und der ursprünglich eingesetzten Menge an [^{14}C] *p*-NPh errechnet sich die Menge an entstandenem Glucuronid, die der Aktivität des Enzyms direkt proportional ist.

Material und Methoden

Chemikalien, Lösungen, Geräte

[2,6- ^{14}C] *p*-Nitrophenol, spez. Aktivität 8,06 mCi/mmol, 0,1 mCi in 25 ml bidest. Wasser = 496 $\mu\text{mol/l}$ (ICN Tracerlab, über Amersham-Buchler, Braunschweig).

p-Nitrophenol, 7,4 mg in 50 ml bidest. Wasser = 1,06 mmol/l (E. Merck, Darmstadt).

p-Nitrophenyl- β -*D*-glucuronid, 16,75 mg in 50 ml bidest. Wasser = 1,06 mmol/l (Serva, Heidelberg).

UDP-Glucuronat, di-Natriumsalz, 9,4 mg in 50 ml bidest. Wasser = 300 $\mu\text{mol/l}$ (Boehringer Mannheim, Mannheim).

Hyamin-10-X-hydroxid, 1 mol/l in Methanol (Packard Instr., Frankfurt/M).

2,2'-*p*-Phenyl-bis-(5-phenyloxazol) (POPOP), 2,5-Diphenyloxazol (PPO), Naphthalin für Szintillationszwecke, Methanol p. a., Dioxan p. a., Äthanol absol. p. a., Eisessig 99% p. a., Cellulose-F-Dünnschichtfertigplatten, 20 x 20 cm und andere Chemikalien (E. Merck, Darmstadt).

Flüssigszintillationszähler, Tricarb, Modell 3375 (Packard Instr., Frankfurt/M).

Motor mit konstanter und reproduzierbar einstellbarer Umdrehungszahl (Cole-Parmer Instr. Comp., Chicago, Ill. 60648).

Rotationsverdampfer mit „Spinnen“, 6- und 12armig (Büchi, Flawil, Schweiz).

Absol. Äthanol:

Man löst 7 g Natrium in 1 l käuflichen absol. Alkohol, gibt 27,5 g Phthalsäurediäthylester zu, kocht 1 h unter Rückfluß und destilliert den Alkohol ab. Er enthält weniger als 3 mmol/l Wasser.

Durchführung der Versuche

Einer mit Äther betäubten, dekapierten und entbluteten Maus entnimmt man etwa 10 mg Lebergewebe, wiegt auf einem Stückchen Parafilm genau aus und überführt schnell in einen kleinen eiskühlten Glashomogenisator (etwa 2–5 ml Inhalt), in den man pro mg Leber 40 μl einer eiskalten Inkubationslösung folgender Zusammensetzung gibt: 3 ml 0,2 mol/l Natriumphosphatpuffer, pH 7,4, 10 ml 66 mmol/l Kaliumchlorid-Lösung, 10 ml isotone alkalische Kaliumchlorid-Lösung (154 mmol/l Kaliumchlorid und 0,32 mmol/l Kaliumhydrogencarbonat), 1 ml 0,3 mol/l Magnesiumchlorid (kann auch fehlen). Es wird nun 5 min unter Eiskühlung bei 300 U/min homogenisiert. Der Homogenisator wird dabei in gleichmäßiger Bewegung gegen den sich drehenden Stempel auf und ab bewegt.

Vom Homogenat überführt man darauf eine 2 mg Gewebe entsprechende Menge in vorgekühlte Zentrifugengläser (etwa 10 ml Inhalt, NS 14,5, spitzer Boden) und pipettiert nacheinander dazu: 15 μl [^{14}C] *p*-NPh-Lösung/mg Leber, 25 μl UDP-Glucuronsäure-Lösung/mg Leber. Die Zugabe des radioaktiven Substrates muß präzise erfolgen und wurde mit einer 50- μl -Spritze (z. B. Hamilton) durchgeführt. Nach vorsichtigem Mischen wird bei 37° C 40 min inkubiert.

Man stoppt die Reaktion durch Kühlen mit Eiswasser und sofortige Zugabe von 2 ml absol. Äthanol (siehe oben) und pipettiert in jedes Röhrchen: 0,1 ml *p*-NPh-Lösung (nicht radioaktiv), 0,1 ml *p*-NPhG-Lösung, 0,1 ml HCl, 25 mmol/l³ und 0,5 ml bidest. Wasser. Die Gläschen werden auf eine Spinne gesteckt, 10 min im Eiswasserbad gekühlt und dann an den Rotationsverdampfer gehängt. Um ein Verspritzen der Proben zu verhindern, läßt man die Spinne so lange in der Luft rotieren, bis sich das volle Wasserstrahlvakuum eingestellt hat (etwa 5 min) und taucht dann in ein 30° C warmes Wasserbad. Nach dem Eindampfen bis zur völligen Trockene gibt man 0,5 ml absol. Äthanol hinzu, benetzt damit die ganze Innenwand der Röhrchen, zentrifugiert 5 min bei etwa 3000 U/min und pipettiert je 0,4 ml vom Überstand in ein zweites, gleiches Röhrchen, ohne jedoch den Bodensatz mit der Pipette zu berühren! Man dampft wie oben beschrieben am Rotationsverdampfer zur Trockene ein, nimmt mit je 40 μl absol. Äthanol auf, wobei die unteren Anteile der Innenwände wiederum benetzt werden und zentrifugiert 5 min bei etwa 3000 U/min.

Vom Überstand werden ohne den Bodensatz zu berühren, jeweils 20 μl auf Cellulose-F-Dünnschichtplatten aufgetragen. Es wird mit einem kalten Luftstrom getrocknet. Eine Platte kann 3–4 Proben aufnehmen. Man chromatographiert nun mit verdünnter Essigsäure (0,17 mol/l) so lange, bis die Front etwa 15 cm weit gelaufen ist (etwa 5,5 h). Die im UV-Licht sichtbaren Flecken bei R_F -Werten von etwa 0,6 (*p*-NPh) bzw. 0,9 (*p*-NPhG) werden mit einem Bleistift umfahren, mit einem Metallspatel zusammen mit der Cellulose auf Glanzpapier gebracht und in Szintillationsgläsern überführt.

In diese pipettiert man: 1 ml Hyamin-10-X-Hydroxid-Lösung, 0,1 ml Eisessig, 10 ml Diatol (65 mg POPOP, 3,25 g PPO, 65 g Naphthalin, 250 ml Toluol, 250 ml Dioxan, 150 ml Methanol), mischt gut durch und zählt die Radioaktivität im Flüssigszintillationszähler.

Ergebnisse

Radiochemische Reinheit des [^{14}C] *p*-NPh

Die Prüfung auf radiochemische Reinheit erfolgte durch Dünnschichtchromatographie an Cellulose-F-Platten mit verd. Essigsäure (0,17 mol/l) als Laufmittel. Anschließend Autoradiographie und Messung ergab, daß etwa 0,4% der Radioaktivität nicht vom *p*-NPh herrührte

³) Ist im Ansatz mehr Inkubationslösung vorhanden als angegeben, muß auch die zuzugebende Menge an Salzsäure entsprechend erhöht werden.

²) Nicht übliche Abkürzung

und mit der Lösungsmittelfront wanderte. Diese Verunreinigung wurde wegen ihrer Geringfügigkeit nicht berücksichtigt.

Stabilität des *p*-NPhG

Um zu prüfen, ob das *p*-NPhG nicht schon spontan zerfällt und dadurch die gemessenen Werte verfälscht werden, haben wir [¹⁴C] *p*-NPhG unter den angegebenen Versuchsbedingungen (10facher Ansatz) enzymatisch dargestellt, dünnschichtchromatographisch gereinigt, isoliert und mit dieser Substanz den Gang einer Doppelbestimmung ohne Leber und ohne Zugabe von [¹⁴C] *p*-NPh durchgeföhrt. Der Versuch ergab, daß das *p*-NPhG unter diesen Bedingungen absolut stabil ist.

Hydrolase-Aktivität im Leberhomogenat

Einem Bestimmungsansatz (Doppelbestimmung) wurde statt [¹⁴C] *p*-NPh [¹⁴C] *p*-NPhG zugegeben. Es zeigte sich, daß bei einer Inkubationszeit von 40 min 10% des Glucuronids gespalten werden.

Optimierung der Versuchsbedingungen

Abhängigkeit der Konjugation von der Inkubationszeit

8 Doppelproben (mit je 2 mg Leber) wurden wie oben beschrieben behandelt und verschieden lange inkubiert. Aus Abbildung 1 ergibt sich eine nichtlineare Beziehung zwischen Konjugation und Inkubationszeit. Für die nachfolgenden Versuche wurde eine Inkubationszeit von 40 min gewählt.

Abhängigkeit der Konjugation vom pH-Wert

Um vergleichbare Leberproben einsetzen zu können, wurden schnell nacheinander 7 Leberstücke (etwa 30 mg) genau ausgewogen und bei - 78° C eingefroren. Diese homogenisierten wir sodann nacheinander im gleichen Homogenisator und unter sonst gleichen Bedingungen in Inkubationslösungen (40 µl/mg Leber), in denen der Phosphatpuffer pH 7,4 durch Phosphatpuffer verschiedener pH-Werte ersetzt war. Pro Bestimmung wurden 80 µl Homogenat verwendet. Wie Abbildung 2 zu entnehmen ist, verändert sich die Enzymaktivität im Bereich zwischen pH 6,0 und 7,0 nur wenig. Bei pH 7,3 liegt ein eindeutiges Minimum und bei pH 7,4 tritt ein steiles Maximum auf. Mehrere Wiederholungen dieses Versuches erbrachten das gleiche Ergebnis.

Dauer des Homogenisierens

30 mg Leber wurden in 1,2 ml (40 µl/mg Leber) Inkubationslösung homogenisiert. Nach jeweils einer Minute entnahm man 2 × 80 µl und stellte sie in ein Eisbad. Dann wurden alle Proben wie oben beschrieben behandelt und 40 min inkubiert. Die Auswertung dreier sol-

cher Versuche zeigt Abbildung 3. Bei einer Homogenisierungsdauer von 2 min tritt ein eindeutiges Minimum auf.

Fehlerbreite

Um die Reproduzierbarkeit der Methode, inklusive der Behandlung der Leber von der Entnahme bis zur Inkubation zu überprüfen, wogen wir schnell hintereinander drei Leberproben zu je etwa 30 mg genau aus und froren sie für mehrere Stunden bei - 78° C ein. Das Aufarbeiten erfolgte sodann nacheinander unter identischen Bedingungen (2 mg Leber/Probe) wie oben angegeben. Es wurden von jeder Leberprobe Doppelbestimmungen durchgeföhrt. Die erhaltenen Werte lagen zwischen 1,65 und 1,70 nmol/mg Leber · 40 min. Auch Homogenat, das nur 1 mg Leber/Ansatz enthielt, ergab die gleichen Werte. Wurden kleinere Leberstücke (unter 10 mg) verwendet, so streuten die Werte stärker.

Inaktivierung der UDP-Glucuronyltransferase

Läßt man Leberhomogenat bei Raumtemperatur (etwa 22° C) stehen, so hat die Enzymaktivität nach 20 min um 22% abgenommen. Im Eiswasserbad beträgt die Inaktivierung etwa 10%/20 min.

Diskussion

Die Wahl des Substrates für die vorliegende Mikromethode zur Bestimmung der UDP-Glucuronyltransferase-Aktivität war problematisch. Für klinische Belange wäre einerseits eine vergleichbare Methode mit Bilirubin als Substrat wünschenswert gewesen, weil dann die Diskussion darüber, ob verschiedene Enzyme für verschiedene Substrate existieren, bei der Anwendung auf klinische Probleme hätte ausgeklammert werden können. Bilirubin und seine Ester, zu denen auch das Glucuronid gehört, sind andererseits sehr licht- und oxidationsempfindliche Verbindungen. Ihre Handhabung bringt große methodische Schwierigkeiten und entsprechende Fehlermöglichkeiten mit sich. Wir haben der Reproduzierbarkeit bei kleinstem Enzymbedarf den Vorrang gegeben.

Bei Anwendung auf klinische Probleme wird mit der Möglichkeit des Vorliegens mehrerer UDP-Glucuronyltransferasen zu rechnen sein. Wie Howland et al. zeigen konnten (8), läßt sich ein von ihnen hergestelltes stabiles, gelöstes UDP-Glucuronyltransferase-Präparat durch Zonenzentrifugation in Anteile zerlegen, die nur *o*-Aminophenol und in solche, die *p*-Nitrophenol besser als *o*-Aminophenol konjugieren, was sehr für eine partielle Trennung zweier verschiedener Enzyme spricht. Die Literatur zu diesem Problemkreis ist in der zitierten Arbeit referiert.

Auch die sorgfältigen kinetischen Untersuchungen von Zakim et al. (12) zeigen, daß sowohl Bilirubin als auch

p-Nitrophenol und *o*-Aminophenol von drei verschiedenen, nahe verwandten Enzymen konjugiert werden.

Hinweisen möchten wir in diesem Zusammenhang auch auf Arbeiten von *Kuenzle et al.* (9), die die Konjugate der menschlichen Galle in Form ihrer Phenylazo-Verbindungen durch Verteilungschromatographie mit umgekehrten Phasen getrennt haben und als Hauptbestandteile nicht das Bilirubinglucuronid, sondern bisher unbekannte Acylglycoside der Aldobiouron-, Pseudoaldobiouron- und Hexuronosylhexuronsäure isolieren und eindeutig identifizieren konnten. Andere Autoren (10) haben gezeigt, daß 30–40% des konjugierten Bilirubins in menschlicher Galle keine Glucuronide sind. Auf die mögliche Bedeutung dieser Befunde für die Genese des Neugeborenenikterus sei hingewiesen.

Die Reproduzierbarkeit der vorliegenden Methode ist außerordentlich gut. Auch bei Berücksichtigung der Fehler von der Entnahme der Leber bis zur Inkubation liegt die maximale Abweichung vom Mittelwert bei ± 2,3%. Allerdings wurde diese Genauigkeit nur dann erzielt, wenn größere Stücke derselben Leber unter identischen Bedingungen verarbeitet wurden. Unter 10 mg scheinen Leberinhomogenitäten (Wasser-, Bindegewebegehalt, Enzymverteilung) zunehmend Bedeutung zu gewinnen. Um eine allgemeinere Aussage über die Genauigkeit der Methode machen zu können, haben wir insgesamt 55 Doppelbestimmungen statistisch ausgewertet. Die nach logarithmischer Transformation errechnete Standardabweichung beträgt ± 3,3%⁴⁾.

Wie gezeigt werden konnte, ist bei der Bestimmung der Glucuronyltransferase-Aktivität in Homogenaten mit einer erheblichen Hydrolase-Aktivität zu rechnen. In unserem Versuch wurden innerhalb von 40 min 10% des eingesetzten Glucuronids gespalten. Legt man diese Hydrolase-Aktivität auch anderen Leberproben zugrunde, so läßt sich eine Rückspaltung von überschlagsmäßig 5% des entstandenen Glucuronides während der Inkubationszeit von 40 min errechnen. Mit der vorliegenden und wahrscheinlich auch mit anderen bekannten UDP-Glucuronyltransferase-Bestimmungsmethoden, die an Leberhomogenat durchgeführt werden, erfaßt man offenbar ein biochemisches Mittel zwischen Synthese und Spaltung. Für die Spaltung dürften unspezifische Hydrolasen verantwortlich zu machen sein.

Zur Optimierung der Versuchsbedingungen wurden verschiedene Parameter variiert und die Ergebnisse, falls nötig, bei den nachfolgenden Versuchen berücksichtigt.

Es fällt auf, daß zwischen der Konjugation und der Inkubationszeit keine lineare Beziehung besteht (Abb. 1). Die erhaltenen Meßwerte können daher nicht auf beliebige Inkubationszeiten extrapoliert werden. Eine

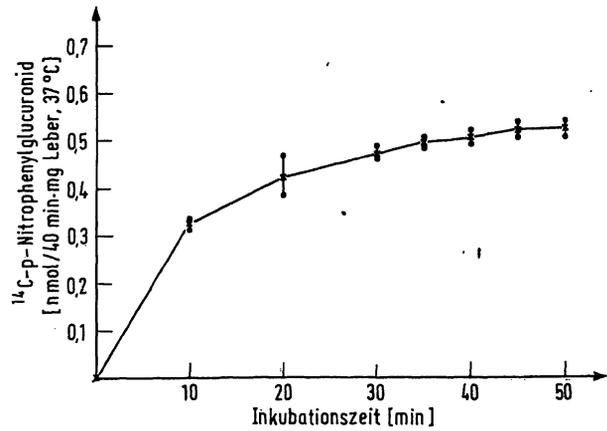


Abb. 1. Abhängigkeit der Konjugation von der Inkubationszeit. Die Inkubationsansätze (2 mg Leber in 80 µl Inkubationslösung) enthalten 25 µl = 7,5 nmol UDP-Glucuronsäure und 15 µl = 7,44 nmol [¹⁴C] *p*-Nitrophenol/mg Leber. Zwischen der gebildeten Glucuronidmenge und der Inkubationszeit ergibt sich keine lineare Beziehung.

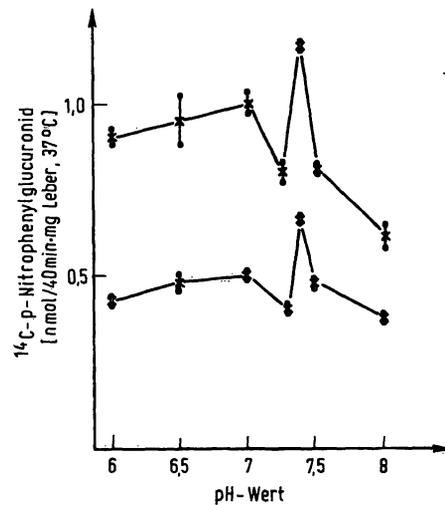


Abb. 2. Abhängigkeit der Konjugation vom pH-Wert. Die Inkubationsansätze (2 mg Leber in 80 µl Inkubationslösung) enthalten 25 µl = 7,5 nmol UDP-Glucuronsäure und 15 µl = 7,44 nmol [¹⁴C] *p*-Nitrophenol/mg Leber. Inkubiert wird 40 min bei 37° C. Die Abhängigkeit der Glucuronidbildung vom pH-Wert zeigt ein Minimum bei pH 7,3 und ein Maximum bei pH 7,4.

Beurteilung der Befunde muß aus diesem Grunde anhand von Normalwerten vorgenommen werden. Die Nichtlinearität ist als Ausdruck der gefundenen Hydrolase-Aktivität und der Instabilität des Enzyms im Homogenat zu werten.

Interessant ist die Abhängigkeit der gebildeten *p*-NPhG-Menge vom pH-Wert. Wie Abbildung 2 zeigt, verändert sich die Aktivität im Bereich zwischen pH 6,0 und 7,0 nur wenig. Bei pH 7,3 tritt dann ein eindeutiges Minimum und bei pH 7,4 ein steiles Maximum auf. Dieser Kurvenverlauf ist durch mehrere Versuche gesichert. Eine Deutung dieses Verhaltens haben wir bisher nicht gefunden.

Bei Variation der Homogenisierungsdauer ergibt sich die in Abbildung 3 dargestellte Abhängigkeit der Enzymaktivität mit einem Minimum bei 2 Minuten. Diesen

⁴⁾ Herrn Dr. H. Jesdinsky von Institut für Medizinische Statistik und Dokumentation der Univ. Freiburg danken wir für die Berechnung der Standardabweichung.

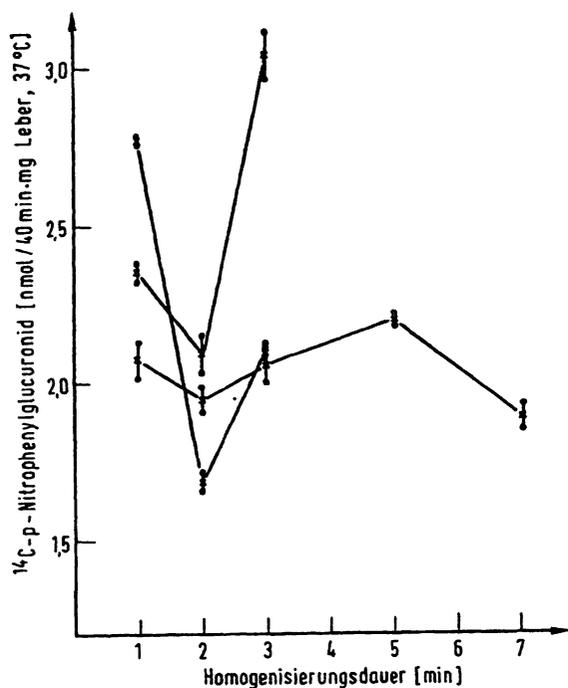


Abb. 3. Abhängigkeit der Konjugation von der Homogenisierungsdauer.
2 mg Leber in 80 μ l Inkubationslösung; 25 μ l = 7,5 nmol UDP-Glucuronsäure und 15 μ l = 7,44 nmol [14 C] *p*-Nitrophenol/mg Leber. Inkubiert wird 40 min bei 37°C. Das Homogenisieren erfolgt bei 0°C mit 300 U/min. Bei einer Homogenisierungsdauer von 2 min tritt ein deutliches Minimum der Enzymaktivität auf.

Kurvenverlauf konnten wir in mehreren Versuchen mit Leber verschiedener Mäuse bestätigen. Eine Abhängigkeit von Enzymaktivitäten vom Modus des Ho-

mogenisierens ist bekannt (11), für die UDP-Glucuronyltransferase in der Weise jedoch noch nicht gemessen worden. Das beobachtete Phänomen könnte wie folgt gedeutet werden: Zu Beginn des Homogenisierens wird das endoplasmatische Retikulum zunächst nur grob zerkleinert. Die Membranbruchstücke bilden eine relativ große Oberfläche. Mit zunehmender Zerkleinerung rollen sich diese zusammen: die aktive Oberfläche wird kleiner. Erst andauerndes Homogenisieren bewirkt durch weitere Zerkleinerung der Partikel eine Vergrößerung der aktiven Oberfläche.

Die Glucuronyltransferase-Aktivität nimmt im Leberhomogenat bei 22°C um etwa 20%/20 min ab. Bei 0°C ist der Aktivitätsabfall mit etwa 10%/20 min geringer. Es wird deutlich, daß für genaue Bestimmungen auch die Zeit zwischen dem Homogenisieren und der Inkubation konstant gehalten werden muß. Diese Ergebnisse stehen möglicherweise im Widerspruch zu Arbeiten von Lueders und Kuff (1), die eine Spontanaktivierung der Glucuronyltransferase an Leberhomogenaten und Mikrosomenpräparationen um ein Mehrfaches der Anfangsaktivität durch Aufbewahren bei 0°C festgestellt haben. Die Aktivierungszeit betrug allerdings 5–7 Tage und es wurde ein anderes Inkubationsmedium verwendet.

Mit der vorliegenden Methode wurde die UDP-Glucuronyltransferase-Aktivität der Leber zweier Erwachsener zu 0,29 bzw. 0,32 nmol *p*-NPhG/mg Leber · 40 min bei 37°C gemessen. Weitere Normalwerte von Erwachsenen, Kindern, Säuglingen und Neugeborenen werden von uns zur Zeit erstellt.

Literatur

- Lueders, K. & Kuff, E. L. (1967), Arch. Biochem. Biophys. 120, 198–203
- Mulder, G. J. (1970), Biochem. J. 117, 319–324
- Metge, W. R., Owen, C. A., Foulk, W. T. & Hoffmann, H. N. (1964), J. Lab. Clin. Med. 64, 335–341
- Menken, M., Baret, P. V. D. & Berlin, N. J. (1966), Clin. Chim. Acta 14, 777–785
- Wong, K. P. (1969), Clin. Chim. Acta 26, 119–126
- van Roy, F. P. & Heirwegh, K. P. M. (1968), Biochem. J. 107, 507–518
Black, M., Billing, B. H. & Heirwegh, K. P. M., (1970), Clin. Chim. Acta 29, 27–35
Black, M. & Billing, B. H. (1969), N. Engl. J. Med. 280, 1266–1271
- Odievre, M. & Luzeau, R. (1971), Eur. J. Clin. Biol. Res. 16, 84–85
- Howland, R. D., Burkhalter, A., Trevor, A. J., Hegeman, S. & Shirachi, D. Y. (1971), Biochem. J. 125, 991–997
- Kuenzle, C. C. (1970), Helv. Chim. Acta 53, 1838–1845
- Kuenzle, C. C. (1970), Biochem. J. 119, 387–394, 395–409, 411–435
- Heirwegh, K. P. M., van Hees, G. P., Campernolle, F. & Fervery, J. (1970), Biochem. J. 120, 17P
- Bucher, N. L. R. (1953), J. Amer. Chem. Soc. 75, 498
- Zakim, D., Goldenberg, J. & Vessey, D. A. (1973), Biochim. Biophys. Acta 309, 67–74
Vessey, D. A., Goldenberg, J. & Zakim, D. (1973), Biochim. Biophys. Acta 309, 75–82

Dr. W. Lehnert
Univ.-Kinderklinik
7800 Freiburg
Mathildenstr. 1