

tinins (Tab. 3) bzw. aller gelösten Urinbestandteile oder eine entsprechende aus der Regressionsgleichung abgeleitete Größe — der Unsicherheitsfaktor zu groß ist. Man darf darüber hinaus nicht übersehen, daß die Abhängigkeit der Ausscheidung von der Tageszeit, über die unsere Beobachtungen nichts aussagen, bei diesem Problem eine große Rolle spielt.

Daher hat es auch wenig Sinn, die Steroidausscheidung pro Gramm Kreatinin auszudrücken. Wie Tabelle 3 zeigt, sind die Schwankungsbreiten dieses Parameters durchaus nicht kleiner als die der 24-Stdn.-Mengen. Aus dem Gesagten geht hervor, daß die möglichst genaue Bestimmung der Sammelperiode sowie verlustloses Sammeln des Urins weiterhin als unerläßliche Voraussetzungen zum Erzielen sinnvoller Analysenergebnisse anzusehen sind.

Die geringfügige, wenn auch statistisch gesicherte Zunahme der Steroidausscheidung mit dem Urinvolumen konnte nur auf Grund der *extremen Versuchsbedingungen* erkannt werden. Diese Zunahme dürfte jedoch im *normalen Schwankungsbereich* der Flüssigkeitsmenge zu vernachlässigen sein. Aus diesen Gründen kommt dem Phänomen, trotz seiner statistischen Sicherung, keine praktische Bedeutung zu. Hier zeigt sich erneut, daß bei der Interpretation biologischer Erscheinungen die statistische Signifikanz sehr wohl von der Relevanz des beobachteten Effektes unterschieden werden muß. Diese Feststellung schließt jedoch keineswegs die Frage aus, ob der hier beobachtete Zusammenhang auf einem Stoffwechselphänomen oder auf einer erhöhten Sekretion beruht. Bei solchen Überlegungen wird die Rolle der Niere zu berücksichtigen sein.

Literatur

1. KASSENAAR, A., J. HUIS IN'T VELD, P. SIDERIUS, H. C. SELDENRATH und A. QUERIDO, *Acta endocr., K'hvn.* 4, 79 (1950). — 2. HOYT, R. E. und M. G. LEVINE, *J. Clin. Endocr., Springfield* 10, 101 (1950). — 3. LUGG, J. W. H. und J. M. BOWNESS, *Austral. J. exp. Biol. med. Sci.* 35, 395 (1957). — 4. HAMBURGER, C., *Acta endocr., K'hvn.* 17, 116 (1954). — 5. DEVIS, R., *Bruxelles-méd.* 29, 1568 (1949). — 6. HOLLANDER, F., B. KRIS, E. KLEMPNER und R. T. FRANK, *Endocrinology* 33, 217 (1943). — 7. MCHENRY, E. W., E. M. SEMMONS, R. PEARSE und E. G. MEYER, *Cancer Res.* 7, 534 (1947). — 8. LAROCHE, G., A. CORTEEL und J. DELOR, *Ann. endocr., Paris* 7, 191 (1946). — 9. NORZYMBERSKI, J. K., R. D. STUBBS und H. F. WEST, *Lancet, London* I, 1276 (1953). — 10. CALLOW, N. H., R. K. CALLOW und C. W. EMMENS, *Biochem. J.* 32, 1312 (1938). — 11. TALBOT, N. B., R. A. BERMAN und E. A. McLACHLAN, *J. biol. Chemistry* 143, 211 (1942). — 12. APPLEBY, J. I., G. GIBSON, J. K. NORZYMBERSKI und R. D. STUBBS, *Biochem. J.* 60, 453 (1955). — 13. POPPER, H., E. MANDEL und H. MAYER, *Biochem. Z.* 291, 354 (1937). — 14. LINDER, A., *Statistische Methoden*, 3. Aufl., Birkhäuser, Basel (1960). — 15. MEDGYESI, G. und K. KATONA, *Ärztl. Lab.* 7, 247 (1961).

Professor Dr. R. Borth
St. Michael's Hospital
Toronto 2, Ontario Canada
Professor Dr. H. Breuer
53 Bonn-Venusberg

Photometrische Bestimmung der „klassischen“ Leucinaminopeptidase im Blutplasma und -serum

VON R. J. HASCHEN, W. FARR und D. REICHEL

*Aus dem Institut für Klinische Biochemie der Martin-Luther-Universität, Halle/Saale
(Direktor: Prof. Dr. med. R. J. Haschen)*

(Eingegangen am 14. November 1966)

Es wird eine neue photometrische Methode zur Bestimmung der Leucinaminopeptidase („LAP“) im Serum beschrieben, die aufgrund ihrer Empfindlichkeit und Einfachheit für Routinezwecke geeignet ist. Als Substrat dient DL-Leucinhydrazid, das durch Serum-LAP bei pH 10,0 optimal zu Hydrazin und L-Leucin hydrolysiert wird. Das freigesetzte Hydrazin wird mit p-Dimethylaminobenzaldehyd in salzsaurem Lösung zu einem orangefarbenen Farbsalz umgesetzt, dessen Konzentration der enzymatischen Aktivität proportional ist und bei 455 nm photometriert wird. Die Bestimmung bei pH 9,25 mit optimaler Mg^{2+} -Aktivierung ist wegen des größeren Zeitaufwandes für Routinezwecke weniger geeignet. — Die Normalwerte der LAP-Aktivität wurden im Serum und Plasma von Blutspendern bestimmt.

A new photometric method is described for the determination of leucine amino peptidase („LAP“) in serum. It is sufficiently sensitive and simple for routine purposes. The substrate is DL-leucine hydrazide, which is hydrolysed by serum LAP optimally at pH 10.0 to hydrazine and L-leucine. The released hydrazine is reacted with p-dimethylamino-benzaldehyde in hydrochloric acid solution, to give an orange-red salt. The concentration of the salt is proportional to the enzymic activity, and it is measured photometrically by its absorption at 455 nm. At pH 9.25 with optimal Mg^{2+} -activation, longer time is required and the method is less suitable for routine measurements. The normal levels of LAP were determined in the serum and plasma from blood banks.

Die Leucinaminopeptidase „LAP“ (L-Leucylpeptidhydrolase, EC 3.4.1.1) des Serums scheint nach bisherigen Erfahrungen (1, 2, 3) ein empfindlicher Indikator von Leberparenchymschäden zu sein. Von dieser „klassischen“ LAP (4) ist die Aminosäure-Arylamidase (5–9) zu unterscheiden, die in vielen Arbeiten zu Unrecht als

LAP bezeichnet wurde. Sie wurde vor allem bei intra- und extrahepatischer Obstruktion erhöht gefunden (10). Als spezifisches Substrat der LAP gilt L-Leucinamid (4). Leucin- und vor allem Alanin-p-nitroanilid (11) und - β -naphthylamid (12) werden dagegen vorwiegend oder ausschließlich von der Aminosäure-Arylamidase hydro-

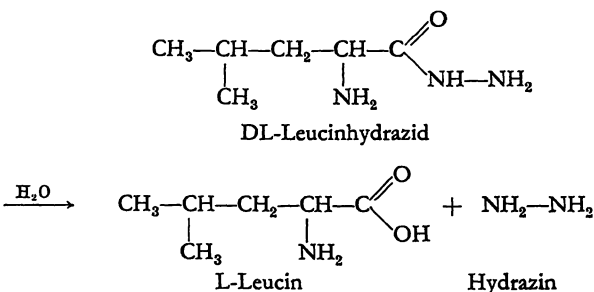
lysiert (9). Leucin-p-nitroanilid ist auch deshalb zur Bestimmung der LAP ungeeignet, weil es beim pH-Optimum dieses Enzyms eine beträchtliche Spontanhydrolyse erleidet (13). Die „klassische“ LAP kann prinzipiell mit folgenden Methoden bestimmt werden: Titration in Alkohol (14); Titration in Aceton (15); Quantitative Papierchromatographie (16—18); Mikrodiffraktion (19) und Bestimmung des freigesetzten Ammoniaks mittels des optischen Tests (20). Bei Verwendung des weniger spezifischen L-Leucylglycins als Substrat kann man auch den Zuwachs an Aminostickstoff mit der Ninhydrin-Methode messen (21).

Alle diese Methoden sind mehr oder weniger umständlich. Verwendet man dagegen anstelle von Leucinamid Leucinhydrazid, so läßt sich eine einfache und empfindliche photometrische Methode entwickeln, die an Spezifität den mit Leucinamid arbeitenden Verfahren nicht nachsteht.

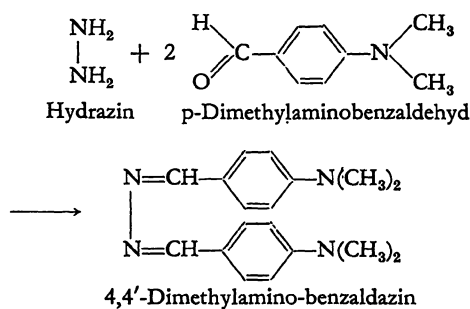
Methodik

Prinzip

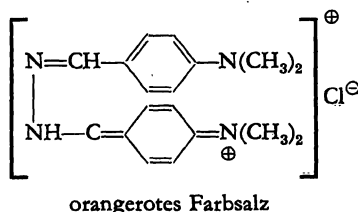
Die Leucinaminopeptidase der menschlichen Leber vermag die Hydrolyse von DL-Leucinhydrazid zu L-Leucin und Hydrazin zu katalysieren:



Das freigesetzte Hydrazin bildet mit p-Dimethylaminobenzaldehyd unter beidseitiger Kondensation einen gelben Farbstoff folgender Zusammensetzung (22):



Dieser Farbstoff wird durch Zugabe von Salzsäure, die gleichzeitig die enzymatische Reaktion unterbricht, in ein orangefarbenes Farbsalz chinoider Natur umgewandelt (23, 24):



Die der LAP-Aktivität proportionale Extinktion des Farbsalzes wird am Absorptionsmaximum von 455 nm gemessen (Abb. 1).

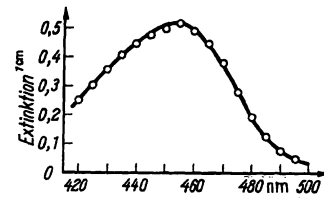


Abb. 1

Absorptionsspektrum des chinoiden Farbsalzes in 0,08N HCl
 $11,3 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ Hydrazin im Meßansatz, Schichtdicke 1 cm
 („Spekol“, VEB Carl Zeiss, Jena)

Chemikalien

Substrat

Darstellung von DL-Leucinhydrazid (26—28):

0,1 Mol DL-Leucinäthylester, frisch freigesetzt aus DL-Leucinäthylesterhydrochlorid mit Triäthylamin (29), wurde in absol. Äthanol mit 0,15 Mol Hydrazinhydrat (85proz.) 6 Stdn. am Rückfluß gekocht. Das Reaktionsprodukt wurde im Vakuum zur Trockne eingedampft, der Rückstand in absol. Äthanol aufgenommen und wiederholt eingedampft, bis das überschüssige Hydrazinhydrat beseitigt war. Der Rückstand wurde zuerst aus absol. Äthanol/absol. Äther, dann aus absol. Isopropanol/Cyclohexan umkristallisiert.

Ausbeute: 51% der Theorie. Fp.: 85—86°; Lit.-Fp.: 87° (28). $\text{C}_5\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}$ (Mol.-Gew.: 145,2); N, ber.: 28,94%, gef.: 28,89%. Das erhaltene DL-Leucinhydrazid war dünn-schichtchromatographisch rein (Kieselgel G „Merck“, Laufmittel: 96proz. Äthanol/ H_2O (63:37); Anfärbung mit 0,5proz. Ninhydrin in H_2O -gesättigtem n-Butanol mit 0,7% Eisessig).

Von diesem Substrat wurden folgende Stammlösungen hergestellt und bei -18° aufbewahrt:

Stammlösung A: 224 mM (325 mg/10 ml aqua bidest.),

Stammlösung B: 160 mM (232 mg/10 ml aqua bidest.) für Ansätze mit Mg^{2+} -Zusatz.

Auf eine Herstellung des L-Leucinhydrazids wurde aus folgenden Gründen verzichtet: Eine Hemmung durch die D-Komponente ist nicht anzunehmen, da sich die Michaelis-Konstanten für DL-Leucinhydrazid (bezogen auf die L-Komponente, s. u.) und L-Leucinamid (18, 30) weitgehend entsprechen. Weiter entfällt bei der Synthese der DL-Verbindung die Einführung einer Amino-Schutzgruppe und der Syntheseweg wird dadurch erheblich vereinfacht, d. h. man benötigt billigere Ausgangs- und Endprodukte.

Puffer

Es wurde ein 0,2M Monoäthanolaminpuffer (25) (final 0,114M) vom pH 10,15 (final pH 10,0) verwendet.

Herstellung: Lösung I: 0,4M Monoäthanolamin-HCl-Stammlösung (39,04 g/l);

Lösung II: 0,4N NaOH

50 ml Lösung I und 44 ml Lösung II werden gemischt und nach pH-Kontrolle mit aqua bidest. auf 100 ml aufgefüllt.

Für die pH-Kurven wurde ein 0,2M Monoäthanolamin/Triäthanolamin-Puffer (25) verwendet. Bei der Bestimmung der Serum-LAP unter Zusatz von Mg^{2+} -Ionen wurde ein 0,25M Monoäthanolaminpuffer (25) (final 0,125M) vom pH 9,25 (final pH 9,25) benutzt. Die Hydrochloride von Mono- und Triäthanolamin wurden aus den freien Basen nach deren Destillation hergestellt (25).

Substrat-Puffer-Lösung

Für eine Serie von Ansätzen wurden Puffer und Substrat-Stammlösung A vorher im Verhältnis 4+1 gemischt. Das Substrat läßt

sich sowohl in wäbr. Lösung als auch im Gemisch mit Puffer etwa 14 Tage im eingefrorenen Zustand aufbewahren, ohne daß eine erhebliche Eigenspaltung eintritt (s. Abb. 2).

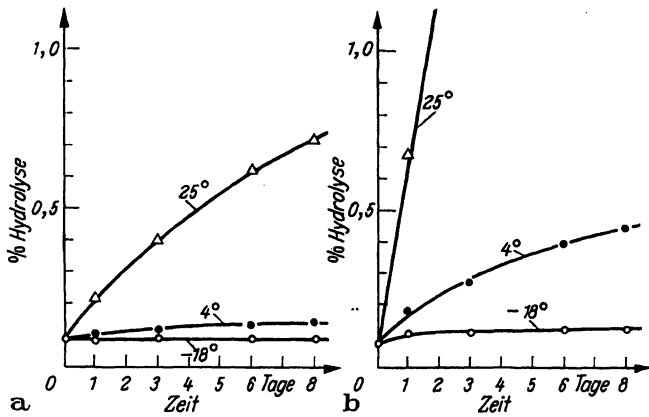


Abb. 2

Hydrolyse von 32 mM DL-Leucinhydrazid unter verschiedenen Aufbewahrungsbedingungen

a) in wässriger Lösung, b) in 0,2 M Monoäthanolaminpuffer pH 10,15

Puffer-Aktivator-Lösung

- I. 0,25M Monoäthanolamin-Puffer, pH 9,25
- II. 40 mM MgCl₂ · 6 H₂O-Lösung (0,8133 g/100 ml aqua bidest). Für die Bestimmung der Serum-LAP mit Zusatz von Mg²⁺-Ionen werden I und II vorher im Verhältnis 5+1 gemischt.

Reagenz

Die Herstellung des Reagenzes erfolgte in Anlehnung an eine Vorschrift von KALLOS und Mitarbeitern (31, 32).

- I. Lösung von 4 g p-Dimethylaminobenzaldehyd in 100 ml 96 proz Äthanol oder Methanol.
- II. 0,1N Salzsäure (s. Abb. 3).

Gebrauchslösung: I und II werden jeweils vor der Verwendung im Verhältnis 1+17 gemischt.

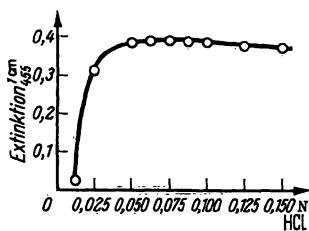


Abb. 3

Abhängigkeit der Extinktion des chinoiden Farbsalzes von der HCl-Konzentration

Die Messung erfolgte unter Ansatzbedingungen bei pH 10,0. Abszisse: Die Angaben beziehen sich auf die in den Meßansätzen vorliegenden Endkonzentrationen

Arbeitsvorschrift

Elektrophoretische Isolierung von LAP und Aminosäure-Arylamidase aus Leberhomogenat

Das aus menschlicher Leber hergestellte Homogenat wurde im Stärkeblock elektrophoretisch aufgetrennt. Der Stärkeblock wurde dann in Richtung zur Anode in 19 Fraktionen von 1 cm Breite zerschnitten und jeweils mit 1 ml aqua bidest. eluiert. Die Enzymaktivität dieser Eluate wurde gegenüber DL-Alanyl-β-naphthylamid (Aminosäure-Arylamidase) und DL-Leucinhydrazid (LAP) untersucht (9) (Abb. 4).

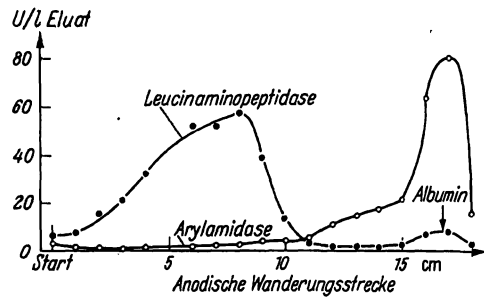


Abb. 4

Elektrophoretische Auftrennung von Arylamidase und Leucinaminopeptidase aus menschlicher Leber im Stärkeblock (Veronal-Na/HCl-Puffer pH 8,6, μ = 0,05, 6—7 V/cm, 16 Std. bei 4°)

Substrate: DL-Alanyl-β-naphthylamid (1 mM, bezogen auf L-Komponente) für Arylamidase; DL-Leucinhydrazid (1 mM, bezogen auf L-Komponente) für LAP

Gewinnung von Serum und Plasma

Die Blutproben wurden 15 Min. nach der Blutentnahme 15 Min. bei 4500 g in vorgekühlten Einsätzen zentrifugiert und das Serum vorsichtig abgehoben.

Für die Plasmagewinnung wurden die Röhren (10 ml) vor der Blutentnahme mit zwei Tropfen Heparin „Richter“ (Budapest) versetzt.

Als Modell für ein pathologisches Serum mit hoher LAP-Aktivität wurde Normalserum verwendet, das durch Zusatz von elektrophoretisch isolierter LAP auf eine hohe Enzymaktivität gebracht worden war.

Bestimmung ohne Mg²⁺-Zusatz

	Hauptwert	Leerwert
Substrat-Puffer-Lösung	0,5 ml/ auf 25° temperieren	0,5 ml
Serum	0,2 ml/ 60 Min. bei 25° inkubieren	—
Farbreagenz	5,0 ml mittels Fortuna-Pipette (gleichzeitige Durchmischung) hinzugeben	5,0 ml
Serum	—	0,2 ml

Mindestens 30 Min. zur Farbentwicklung bei 25° belassen (s. Tab. 1); dann beide Ansätze bei 455 nm und d = 1 cm gegen das Reagenz messen.

Bestimmung mit Mg²⁺-Aktivierung

	Hauptwert	Leerwert
Puffer-Aktivator-Lösung	0,3 ml/	0,3 ml/
Serum	0,1 ml/ 2 Std. bei 25° präinkubieren	—
Substrat-Stammlösung B	0,1 ml/ 30 Min. bei 25° inkubieren	0,1 ml/
Farbreagenz	4,5 ml/ wie oben zugeben	4,5 ml/
Serum	—	0,1 ml/

Farbentwicklung und Messung wie oben.

Tab. 1

Ermittlung der Zeitdauer bis zur vollständigen Entwicklung des Farbstoffes bei zwei Hydrazinsulfatlösungen unterschiedlicher Konzentration

Min. nach Reagenzzugabe	8,5 · 10 ⁻⁴ M Hydrazin	3,1 · 10 ⁻⁴ M Hydrazin
5	0,205	1,120
10	0,295	1,28
15	0,340	1,36
20	0,375	1,40
25	0,385	1,43
30	0,385	1,43
35	0,385	1,43

Anmerkungen

Nach Zugabe des Farbreagenzes nimmt die Farbintensität von Haupt- und Leerwert auch nach Ablauf von 30 Min. infolge nicht-enzymatischer Hydrolyse langsam zu. Der ΔE-Wert bleibt aber praktisch unverändert (s. Tab. 2).

Tab. 2

Extinktionszunahmen von Haupt- und Leerwert als Funktion der Zeit

Min. nach Reagenzzugabe	E ₄₅₅ ^{1cm}		ΔE ₄₅₅ ^{1cm}
	Hauptwert	Leerwert	
30	0,238	0,142	0,096
90	0,278	0,180	0,098
180	0,300	0,203	0,097
300	0,330	0,232	0,098

Bei Aktivitäten über 10 U/l wird die Inkubationsdauer auf 10 Min. verkürzt und evtl. bei 0,5 cm Schichtdicke gemessen. Eine Verdünnung des Serums mit aqua bidest. oder 0,9proz. NaCl-Lösung ist unbedingt zu vermeiden (s. Abb. 10e).

Eichung

Aus einer 0,2 mm Hydrazinsulfatlösung (26 mg/l aqua bidest.) wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt (Hydrazinsulfat von Fa. „VEB Berlin-Chemie“). Abbildung 5 zeigt die Gültigkeit des

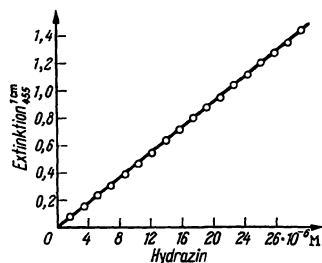


Abb. 5

Abhängigkeit der Farbintensität von der Hydrazinkonzentration („Spekol“, VEB Carl Zeiss, Jena)

LAMBERT-BEERSchen Gesetzes für den gemessenen Konzentrationsbereich. Der millimolare Extinktionskoeffizient (ε) des Farbstoffes in 0,08N HCl beträgt:

45,63 mm⁻¹ cm⁻¹ bei 455 nm (spektrale Halbwertsbreite 11 nm), 42,79 mm⁻¹ cm⁻¹ bei 436 nm (Hg-Linie), 40,7 mm⁻¹ cm⁻¹ bei 455 nm, 0,15 mm Spaltbreite.

Berechnung der Enzymkonzentration

Die LAP-Aktivität wird in Einheiten — Units (33) — angegeben. Die Enzymkonzentration errechnet sich unter Zugrundelegung einer Kinetik nullter Ordnung nach folgender Formel:

$$\text{Enzymkonzentration} = \frac{\Delta E \cdot V_G \cdot 10^3}{\epsilon \cdot t \cdot V_S} \text{ U/l.}$$

Dabei sind ΔE = Differenz von Haupt- und Leerwert; ε = millimolarer Extinktionskoeffizient; t = Inkubationszeit in Min.;

V_G = Gesamtvolumen nach Reagenzzugabe und V_S = Volumenanteil des Serums vom Inkubationsansatz in ml.

Für die oben beschriebene Arbeitsweise ergibt sich demnach:

Bei Messung ohne Mg²⁺-Zusatz: Enzymkonzentration = ΔE · 10,41 U/l;

bei optimaler Mg²⁺-Aktivierung: Enzymkonzentration = ΔE · 36,5 U/l.

Die Enzymaktivität sollte prinzipiell bei 25° bestimmt werden (33). Geschieht dies bei niedrigerer (Zimmer-) Temperatur, so lassen sich mit Hilfe von Q₁₀ = 2,3 (ohne Zusatz von Mg²⁺-Ionen) und Q₁₀ = 2,2 (bei optimaler Mg²⁺-Aktivierung) nach der Formel (34)

$$\log F = \frac{25 - t}{10} \cdot \log Q_{10}$$

die Umrechnungsfaktoren F₁ (ohne Zusatz von Mg²⁺-Ionen) und F₂ (bei optimaler Mg²⁺-Aktivierung) errechnen, mit denen man die bei t° ermittelten Aktivitäten auf 25° umrechnen kann (s. Tab. 3).

Tab. 3

Faktoren (F₁ und F₂) zur Umrechnung von bei Zimmertemperaturen (t°) gemessenen Aktivitäten auf 25°

t°	F ₁	F ₂
20	1,52	1,48
21	1,40	1,37
22	1,28	1,27
23	1,18	1,17
24	1,09	1,08
25	1,00	1,00

Ergebnisse

Normalwerte

Es wurde Serum und Plasma von Blutspendern in der beschriebenen Weise untersucht (Tab. 4). Wie aus der Abbildung 6 zu ersehen ist, weisen sowohl die Serum- als auch die Plasmawerte ohne und mit Aktivierung eine log-normale Verteilung auf. Die höhere Aktivität im Serum im Vergleich zum Plasma (ohne Mg²⁺-Zusatz)

Tab. 4

Normalwerte der LAP in Serum und Plasma von Blutspendern

	Anzahl der Blutspender		log \bar{x}	log s	Untere und obere Grenzwert (95% Vertrauensbereich) U/l
	Männer	Frauen			
Serum pH 10,0	48	47	0,9412—1	0,1657	0,417—1,87
Plasma pH 10,0	24	23	0,7553—1	0,2116	0,22 —1,51
Plasma pH 9,25 Mg ²⁺ -Akt.	24	25	0,2945	0,151	0 —3,95

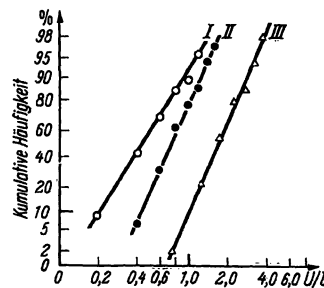


Abb. 6

Verteilung der Normalwerte der LAP-Aktivität im

I Plasma pH 10,0
II Serum pH 10,0
III Plasma pH 9,25, Aktivierung mit 4 mM Mg²⁺
Darstellung im Wahrscheinlichkeitsnetz mit logarithmischer Abszissen-
teilung

ist wahrscheinlich auf die Freisetzung von LAP aus den Thrombocyten bei der Gerinnung zurückzuführen. Die LAP-Aktivitäten von Thrombocyten und Serum verhalten sich nach früheren Untersuchungen (35) etwa wie 500:1. Die Unterschiede der Enzymaktivitäten bei Männern und Frauen sowie bei verschiedenen Altersgruppen waren nicht signifikant.

Experimentelles

Vergleich der Hydrolyse von L-Leucinamid und DL-Leucinhydrazid

Abbildung 7 stellt die Hydrolyse von L-Leucinamid und DL-Leucinhydrazid durch Normalserum und Modellserum als Funktion des pH dar. pH-Optima und Umsatzraten stimmen für beide Substrate nahezu überein (s. Tab. 5). In beiden Fällen wird das Enzym durch 4 mM Mg²⁺-Ionen um das 4fache aktiviert. Der bei pH 7,0–7,5 auftretende niedrigere Gipfel ist auf eine Beimengung von Arylamidase zurückzuführen.

Tab. 5
Vergleich der Umsatzraten von L-Leucinamid und DL-Leucinhydrazid unter gleichen Bedingungen

	L-Leucinamid U/l	DL-Leucinhydrazid U/l
ohne Mg ²⁺ -Zusatz pH 10,0	27,5	23,7
mit Mg ²⁺ -Zusatz pH 9,0 bzw. 9,25	56,7	50,5

Tab. 6
Hydrolyse von DL-Leucinhydrazid durch Modellserum bei pH 9,25 in Abhängigkeit vom Puffersystem

Puffersystem	Molarität der Stammlösung	% Hydrolyse (L-Verbindung)
Theorell-Stenhagen		0,76
Veronal/HCl	0,1	0,72
Glycin/NaOH	0,1	0,58
Tris/HCl	0,1	1,04
Triäthanolamin-HCl/NaOH	0,1	1,18
Monoäthanolamin-HCl/NaOH	0,1	1,20

LAP-Aktivität als Funktion des Puffersystems

Als günstigstes Puffersystem erwies sich Mono- bzw. Triäthanolaminhydrochlorid/NaOH (Tab. 6). Die Puf-

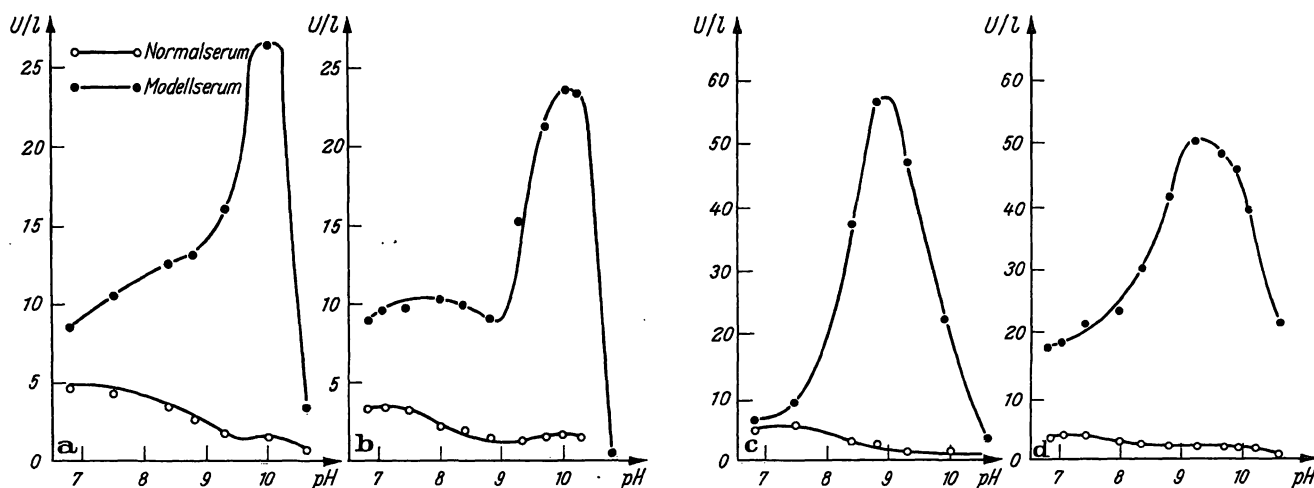


Abb. 7

Vergleichende Hydrolyse von L-Leucinamid und DL-Leucinhydrazid in Abhängigkeit vom pH

○—○ Normalserum, ●—● Modellserum (9,95 Tle. Serum + 0,05 Tle. LAP-Eluat)

a) und c) Substrat: L-Leucinamid (16 mM); b) und d) Substrat: DL-Leucinhydrazid (16 mM, bezogen auf L-Komponente); a) und b) ohne, c) und d) mit Aktivierung durch Mg²⁺-Ionen (4 mM). Puffer: Mono-/Triäthanolamin-HCl/NaOH (0,114 M). Inkubationstemperatur: 25°. Bei Verwendung von L-Leucinamid als Substrat erfolgte die Auswertung mittels quantitativer Papierchromatographie (16–18)

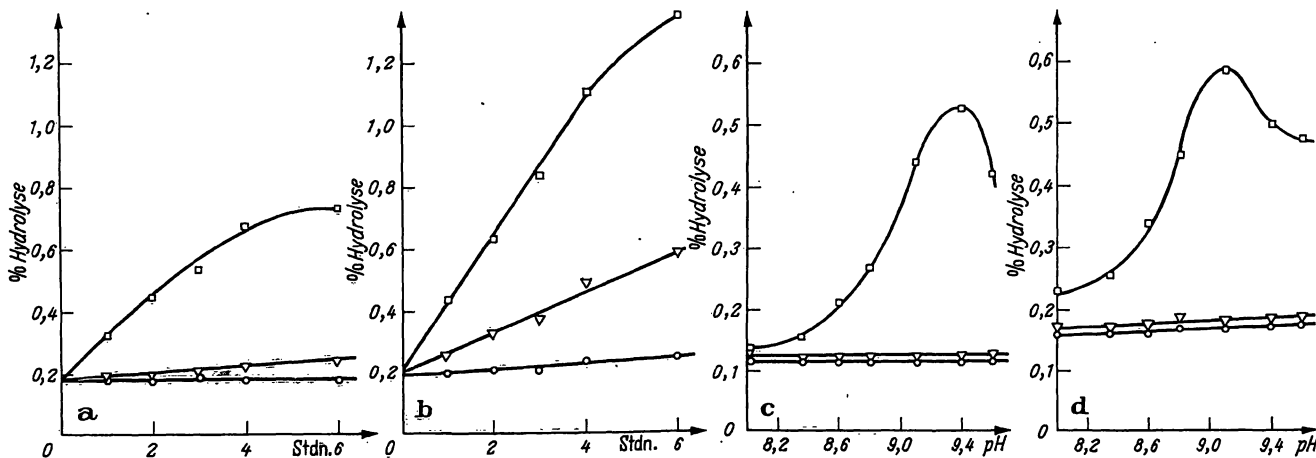


Abb. 8

Hydrolyse von 32 mM DL-Leucinhydrazid in wässriger Lösung in Gegenwart von Aktivatoren der LAP

□—□ 0,2 mM Mn²⁺; ▽—▽ 4 mM Mg²⁺; ○—○ ohne Aktivator

a) und b) als Funktion der Zeit; c) und d) als Funktion des pH; Inkubation: a) und c) bei 25°, b) und d) bei 37°

fersubstanzen wurden selbst hergestellt (s. o.). Ein zuerst verwendetes kommerzielles Produkt enthielt etwa 0,1% Mn. Geeignet sind die Produkte der Fa. Feinchemie K.-H. Kallies K. G., Sebnitz (Sachsen).

Nichtenzymatische Hydrolyse von Leucinhydrazid

Bei der Überprüfung der Aktivierbarkeit der LAP durch Mg^{2+} - bzw. Mn^{2+} -Ionen zeigte sich, daß Mn^{2+} für die

Aktivierung bei dieser Methode nicht geeignet ist. Die nichtenzymatische Hydrolyse von Leucinhydrazid wird durch pH-Änderungen im praktisch wichtigen Bereich kaum beeinflusst. Mit steigender Temperatur nimmt die Hydrolyse deutlich zu. Manganionen wirken sich unter allen Umständen nachteilig aus. Dagegen ist der Effekt von Magnesiumionen vergleichsweise gering (Abb. 8). Aus diesem Grunde wurde in weiteren Versuchen nur

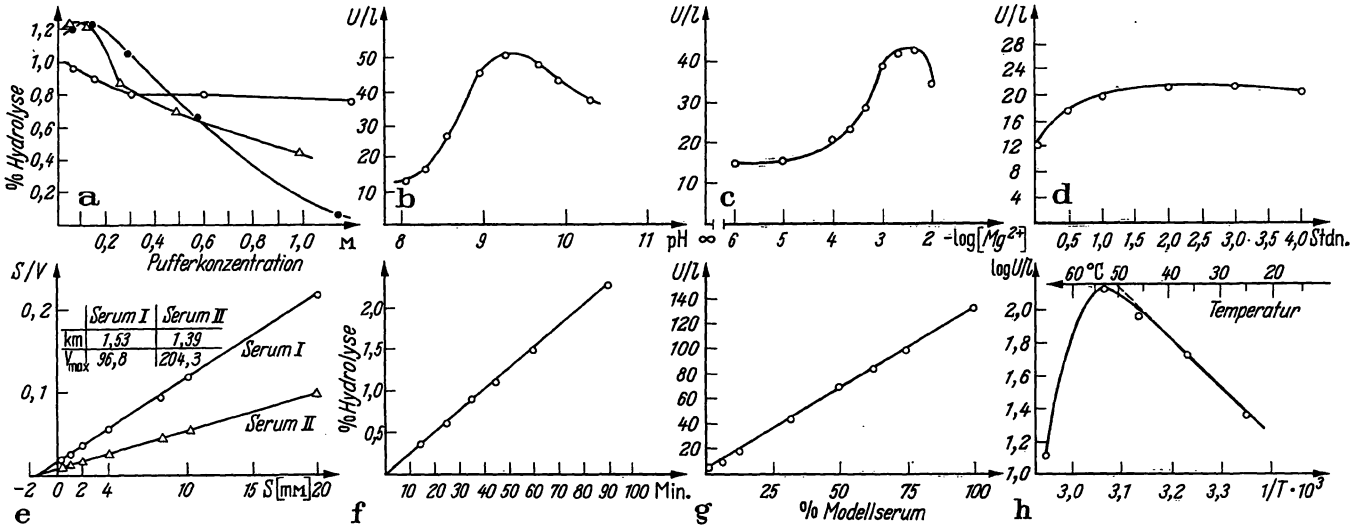


Abb. 9

LAP-Aktivität bei Mg^{2+} -Aktivierung in Abhängigkeit

a) von der Pufferkonzentration, $\bullet-\bullet$ Monoäthanolamin-HCl/NaOH; $\circ-\circ$ Tris/HCl; $\triangle-\triangle$ Triäthanolamin-HCl/NaOH; b) vom pH-Wert; c) von der Aktivatorkonzentration; d) von der Präinkubationsdauer; e) von der Substratkonzentration (Darstellung nach LINEWEAVER-BURK [36]) bei zwei verschiedenen Enzymkonzentrationen (80- und 160fache LAP-Aktivität vom Normalserum); f) von der Inkubationsdauer (Enzymaktivität in % Hydrolyse L-Leucinhydrazid, 1% Hydrolyse $\Delta \epsilon_{455}^{1\text{cm}}$ von 0,91); g) von der Enzymkonzentration (Verdünnung eines 170fach erhöhten Modellserums mit Normalserum, Abszisse: Vol. % Modellserum); h) von der Temperatur (Darstellung nach ARRHENIUS [37]).

Inkubationsbedingungen für alle Parameter außer dem jeweils variablen: Puffer: 0,125M Monoäthanolamin pH 9,25; Aktivierung: 4 mM Mg^{2+} , 2 Stdn. Präinkubation; Substrat: 32 mM DL-Leucinhydrazid; Inkubationstemperatur: 25°

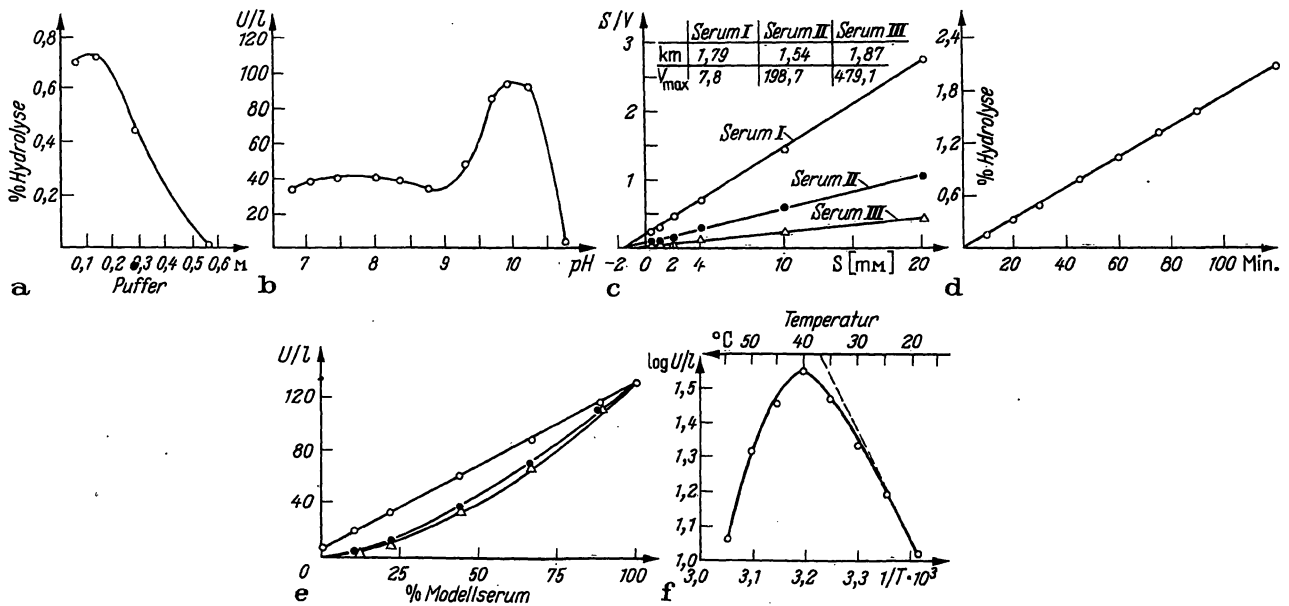


Abb. 10

LAP-Aktivität ohne Zusatz von Metallionen in Abhängigkeit

a) von der Pufferkonzentration (Monoäthanolamin-HCl/NaOH); b) vom pH-Wert; c) von der Substratkonzentration (Darstellung nach LINEWEAVER-BURK [36]) bei drei verschiedenen Enzymkonzentrationen (10-, 25- und 60fache LAP-Aktivität vom Normalserum); d) von der Inkubationsdauer (Enzymaktivität in % Hydrolyse L-Leucinhydrazid, 1% Hydrolyse $\Delta \epsilon_{455}^{1\text{cm}}$ von 1,0); e) von der Enzymkonzentration (Verdünnung eines 200-fach erhöhten Modellserums mit Normalserum $\circ-\circ$; mit 0,9-proz. NaCl-Lösung $\bullet-\bullet$; mit aqua bidest. $\triangle-\triangle$; Abszisse: Vol. % Modellserum); f) von der Inkubationstemperatur [Darstellung nach ARRHENIUS (37)].

Inkubationsbedingungen für alle Parameter außer dem jeweils variablen: Puffer: 0,114M Monoäthanolamin pH 10,0; Substrat: 32 mM DL-Leucinhydrazid; Inkubationstemperatur: 25°

Magnesium als Aktivator verwandt. Über die Aufspaltung von Peptidbindungen durch Schwermetallionen, wie z. B. Ce^{3+} , Ce^{4+} - und Th^{4+} -Ionen wurde früher von BAMANN und Mitarbeitern (36) berichtet.

Enzymstabilität

Die Enzymaktivität ist im Serum bei Aufbewahrung desselben im Kühlschrank mindestens bis 48 Stdn. konstant.

Optimierung der Bestimmung mit Mg^{2+} -Aktivierung

Die bei der Untersuchung der einzelnen Parameter erhaltenen Ergebnisse zeigt Abbildung 9. Danach ergeben sich für eine Bestimmung der LAP-Aktivität im Serum mit Mg^{2+} -Zusatz folgende optimale Bedingungen: Monoäthanolamin-HCl/NaOH-Puffer, 0,125M (final), pH 9,25; 4mm Mg^{2+} , 2 Stdn. Präinkubation bei 25°; Substratkonzentration: 16 mM ($K_m = 1,5$ mM, Mittel aus zwei Bestimmungen); Maximale Spaltung bei 56°, Temperatur-Optimum zwischen 30° und 40°, $Q_{10} = 2,2$. Die Bestimmung der Serum-LAP mit Mg^{2+} -Aktivierung erschien für Routinezwecke weniger geeignet, da die notwendige Präinkubation einen größeren Zeitaufwand bedingt. Deshalb wurde auch eine Methode zur Bestimmung der Serum-LAP ohne Aktivierung ausgearbeitet.

Optimierung der Bestimmung ohne Mg^{2+} -Zusatz

In Abbildung 10 sind die wichtigsten Parameter zusammengestellt. Danach ergeben sich folgende optimale Bedingungen: Monoäthanolamin-HCl/NaOH-Puffer 0,114M, pH 10,0; Substratkonzentration: 16 mM ($K_m = 1,7$ mM, Mittel von 3 Bestimmungen); Maximale Spaltung bei 40°, Temperatur-Optimum bei 25°, $Q_{10} = 2,3$. Das auf der Abbildung 10b im pH-Bereich 7,5 auftretende flache Optimum ist wiederum der Arylamidase zuzuschreiben. Abbildung 10d zeigt im gemessenen Bereich (bis 1,8% Hydrolyse) einen linearen Verlauf der Zeit-Umsatz-Kurve.

Zur Ermittlung der Beziehungen zwischen Meßgröße und Enzymkonzentration wurde ein mit Leber-LAP an-

gereichertes Serum mit Normalserum verdünnt. Es ergab sich eine lineare Korrelation. Bei Verdünnung des LAP-reichen Serums mit bidest. Wasser oder 0,9proz. NaCl-Lösung weichen die Kurven von der Geraden ab (Abb. 10e). Daraus folgt, daß bei dieser Bestimmungsmethode das Serum nicht mit Wasser oder physiolog. NaCl-Lösung verdünnt werden darf, da bei pH 10,0 mit zunehmender Verdünnung auch die Denaturierung stärker wird.

Zuverlässigkeit der Methode (39, 40)

Spezifität: Die spezifische Bestimmung der Serum-LAP setzt eine deutliche Abgrenzung von der gleichfalls im Serum vorhandenen Arylamidase voraus. Diese vermag auch Substrate wie Leucinamid und Leucinhydrazid zu hydrolysieren (9). Durch ein abweichendes pH-Optimum (7,0) und die fehlende Aktivierbarkeit bzw. eine Hemmung durch Mn^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen läßt sie sich aber weitgehend von der LAP abgrenzen (s. Abb. 7).

Richtigkeit: Bei Mischversuchen mit Modell-Seren von hoher Aktivität und Normalserum ergab sich ein Korrelationskoeffizient von 0,998 bzw. 0,999 (Abb. 9g und 10e).

Wiederholbarkeit: Bei jeweils 10 Bestimmungen wurden an der oberen Normgrenze (1,9 U/l bzw. 4,0 U/l) folgende Variationskoeffizienten gefunden: Bestimmung im Serum *ohne* Zusatz von Mg^{2+} -Ionen: $V_k = 1,9\%$; Bestimmung im Plasma *mit* optimaler Mg^{2+} -Aktivierung $V_k = 2,1\%$.

Empfindlichkeit: Da der Variationskoeffizient an der oberen Grenze der Norm niedrig ist, ist die Empfindlichkeit der Methode entsprechend hoch.

Für die Überlassung der elektrophoretisch isolierten LAP sowie der Abbildung 4 sind wir Herrn Dipl.-Chem. N. REHFELD zu besonderem Dank verpflichtet.

Wir danken dem Bezirksinstitut für Blutspende- und Transfusionswesen (Direktor: Dr. med. W. SCHUBERT) für die Bereitstellung der Blutproben und den Herren Dr. H. JESCHKEIT (Institut für organische Chemie) und Dr. R. MASTHOFF (Institut für anorganische Chemie) für die Anfertigung von Elementar- und spektrographischen Analysen.

Für technische Assistenz danken wir Frau G. HENNING.

Literatur

1. HASCHEN, R. J., Proteolytische Enzyme bei Leberkrankheiten, Symposium über enzymologische Diagnostik der Leberkrankheiten, 27.—28. 11. 1964, Warschau. — 2. FLEISHER, G. A., M. PANKOW und C. WARMKA, *Clin. chim. Acta* (Amsterdam) 9, 259 (1964). — 3. HASCHEN, R. J., W. FARR, H. GIESECKE und D. REICHELT, in Vorbereitung. — 4. SMITH, E. L. und D. H. SPACKMANN, *J. biol. Chemistry* 212, 271 (1955). — 5. PATTERSON, E. K., A. KEPPEL und S. H. HSIAO, *J. Histochem. Cytochem.* 9, 609 (1961). — 6. PATTERSON, E. K., S. H. HSIAO und A. KEPPEL, *J. biol. Chemistry* 238, 3611 (1963). — 7. PFLEIDERER, G., P. G. CELLIERS, M. STANULOVIC, E. D. WACHSMUTH, H. DETERMANN und G. BRAUNITZER, *Biochem. Z.* 340, 552 (1964). — 8. MANNSFELDT, H.-G., H.-J. HÜTTER und H. HANSON, Zur Darstellung einer Aminopeptidase aus Mikrosomen und Mitochondrien von Schweinenieren, 3. Jahrestagung der Biochemi-

schen Gesellschaft der DDR, 18.—20. 9. 1966, Suhl/Thür. — 9. HASCHEN, R. J., N. REHFELD und H. GIESECKE, *Naturwissenschaften* 53, 434 (1966). — 10. GÖGGELE, K. H., W. CREUTZFELDT und J. MURUCAS, *Dtsch. med. Wschr.* 85, 1756, 1808 (1960). — 11. TUPPY, H., U. WIESBAUER und E. WINTERSBERGER, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 329, 278 (1962). — 12. GOLDBERG, J. A., E. P. PINEDA und A. M. RUTENBURG, *Amer. J. clin. Pathol.* 32, 571 (1959). — 13. NAGEL, W., F. WILLIG, W. PESCHKE und F. H. SCHMIDT, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 340, 1 (1965). — 14. GRASSMANN, E. und W. HEYDE, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 183, 32 (1929). — 15. LINDERSTRÖM-LANG, K., *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 173, 32 (1928). — 16. HASCHEN, R. J., *Clin. chim. Acta* (Amsterdam) 1, 242 (1956). — 17. HASCHEN, R. J., *Clin. chim. Acta* (Amsterdam) 6, 322 (1961). — 18. HASCHEN, R. J., *Biochem. Z.* 334, 569 (1961). — 19.

- HANSON, H. und R. J. HASCHEN, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 310, 213 (1958). — 20. NAGEL, W., F. WILLIG und F. H. SCHMIDT, Klin. Wschr. 42, 447 (1964). — 21. FLEISHER, G. A., M. PANKOW und C. WARMKA, Clin. chim. Acta (Amsterdam) 9, 254 (1964). — 22. KNÖPFER, M., Mh. Chem. 30, 31 (1909). — 23. PESEZ, M. und A. PETIT, Bull. soc. chim. France 1947, 122. — 24. WATT, G. W. und J. D. CHRISP, Analytic. Chem. 24, 2006 (1952). — 25. THIES, H. und G. KALLINICH, Biochem. Z. 324, 485 (1953). — 26. YALE, H. L., K. LOSEE, J. MARTIUS, H. HOLSING, F. M. PERRY und J. BERNSTEIN, J. Amer. chem. Soc. 75, 1933 (1953). — 27. LOSSE, G., H.-J. Hebel und CH. KÄSTNER, J. prakt. Chem. 8, 339 (1959). — 28. KÄSTNER, CH., Diplomarbeit, Mat.-Nat. Fak., Halle/Saale, 1959. — 29. CHAMBERS, R. A. und F. H. CARPENTER, J. Amer. chem. Soc. 77, 1522 (1955). — 30. WERGIN, A., Naturwissenschaften 52, 34 (1965). — 31. KALLOS, J., D. KAHN und D. RIZOK, Canad. J. Biochem. 42, 235 (1965). — 32. KALLOS, J., E. L. ARTHUR, D. RIZOK und D. KAHN, Canad. J. Biochem. 43, 135 (1965). — 33. Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry, Pergamon Press, Oxford 1961. — 34. AEBI, H., in: RAUEN, H. M. (Hrsg.): „Biochemisches Taschenbuch“, 2. Teil, S. 167, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg-New York 1964. — 35. BEESE, J., W. FARR, E. GRÜNER und R. J. HASCHEN, Klin. Wschr. 44, 1049 (1966). — 36. BAMANN, E., J. G. HAAS und H. TRAPPMANN, Naturwissenschaften 46, 73 (1959). — 37. LINEWEAVER, H. und D. BURK, J. Amer. chem. Soc. 56, 658 (1934). — 38. NETTER, H., Theoretische Biochemie, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1959. — 39. HUGHES, H. K., Analytic. Chem. 24, 1349 (1952). — 40. RICHTERICH, R., Klinische Chemie, S. 52, S. Karger, Basel-New York 1965.

Prof. Dr. med. habil. R. J. Haschen
X 402 Halle (Saale), Leninallee 2

Zur Immunochemischen Bestimmung von Enzymproteinen der Alkoholdehydrogenase mit Hilfe der Nephelometrie¹⁾

Von T. O. KLEINE

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Hamburg (Direktor: Prof. Dr. J. Kühnau)

(Eingegangen am 4. März 1967)

Mit Hilfe von präzipitierenden, auf Alkoholdehydrogenase aus Hefe und Pferdeleber spezifischen Antikörpern wird ein Mikrottest beschrieben, worin die Enzymprotein-Antikörper-Trübung nephelometrisch serienmäßig bestimmt wird. Im Hefehomogenat sowie im Überschuß an Fremdprotein (menschliches Blutserum) kann mit dieser Methode in einem Gesamtvolumen von 0,40 ml 0,3–0,6 µg und mehr Enzymprotein mit einem mittleren Fehler von ± 4% gemessen werden.

Precipitating antibodies to alcoholdehydrogenase (Alcohol: NAD oxidoreductase E. C. 1.1.1.1) from yeast and horse liver were used in a microtest for serial measurement of the turbidity caused by the enzyme-protein-antibody-reaction in vitro. With this method and a mean error of ± 4%, 0,3 to 0,6 µg of enzyme protein and more per 0,40 ml can be measured in yeast homogenate as well as in the presence of excess foreign protein (human blood serum).

Enzyme werden im allgemeinen mit Hilfe ihrer Reaktionsgeschwindigkeit (Aktivität) unter definierten Standardbedingungen gemessen. Hierbei wird die Enzymquantität nur insofern berücksichtigt, als diejenige Enzymmenge bestimmt wird, die 1 µMol Substrat pro Min. unter jenen Bedingungen umsetzt (1). Für die heutige Enzymchemie sind jene Meßbedingungen bei der Bestimmung von allosterisch oder induktiv beeinflusster Enzymaktivität ungenügend: Eine z. B. in einem Gewebehomogenat erhöhte oder verminderte Enzymaktivität kann auf eine quantitative Vermehrung oder Verminderung des Enzymproteins oder aber auf eine allosterische Steigerung oder Hemmung der Enzymaktivität zurückgeführt werden. Beide Phänomene lassen sich durch die Messung der Reaktionsgeschwindigkeit unter Standardbedingungen nicht voneinander unterscheiden.

Mit Hilfe des nephelometrisch gemessenen Antigen-Antikörperkomplexes, einer für quantitative Messungen von Proteinen des Blutes (2–9) bereits bewährten

Methode haben wir versucht, einen Test zur quantitativen Messung des Enzymproteins aufzubauen, mit dem Enzymprotein im Homogenat oder in Gegenwart hoher Fremdproteinkonzentrationen gemessen werden kann. Durch die simultane Messung von Menge und Aktivität eines Enzyms ist es u. E. möglich, genauere Aussagen über dieses Enzym zu machen als es die bisherigen Methoden erlaubten.

Methodik

Erzeugung von Antikörpern auf Alkoholdehydrogenase²⁾ aus Hefe und Pferdeleber

2 kg schweren, männlichen Kaninchen (Neuseeländer Albinos) werden mit eintägigem Intervall aufeinanderfolgend 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 und 4,0 mg Enzymprotein Hefe-Alkoholdehydrogenase (HADH) bzw. Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber (LADH)^{2,3)}

¹⁾ Der Trivialname Alkoholdehydrogenase wird hier gebraucht für das Enzym Alkohol: NAD oxidoreductase EC 1.1.1.1.

²⁾ Bezogen von C. F. Boehringer, Mannheim.

³⁾ Abkürzungen: HADH = Hefe-Alkoholdehydrogenase; LADH = Leber-Alkoholdehydrogenase; EDTA = Äthylendiamintetraessigsäure.

¹⁾ Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.