

Die Spaltung von Dipeptiden in Geweben der Ratte am Beispiel von Glycyl-L-Tyrosin. Entwicklung einer Methode zur Messung von Dipeptidase-Aktivitäten und kinetischen Eigenschaften

L. D. Berthold*

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Mainz

Zusammenfassung: Glycyl-L-Tyrosin wird *in vitro* durch Gewebehomogenate von Niere, Lunge, Leber, Muskulatur und im Blut der Ratte hydrolysiert. Die Methodik der Peptidasemessung wird kritisch überprüft, und kinetische Daten für die Gewebe werden angegeben.

Summary: Glycyl-L-tyrosine is hydrolysed by tissue homogenates of rat kidney, lung, liver, muscle and by blood. Methods of peptidase assay are critically examined and kinetic data are given for the tissues.

Schlüsselwörter: Glycyl-L-Tyrosin, Peptidase-Messung, kinetische Daten, Rattengewebe

Einleitung

Aufgrund der geringen Löslichkeit von L-Tyrosin (TYR) (2,76 mMol/l oder 0,5 g/l) wird seit kurzem der Zusatz des gut löslichen Dipeptids Glycyl-L-Tyrosin (GLY-TYR) als TYR-Quelle in Aminosäurelösungen für die parenterale Ernährung diskutiert. Bisher ist die nichtessentielle Aminosäure TYR in solchen Lösungen nicht enthalten, da man davon ausgeht, daß bei intakter Leberfunktion und ausreichender Phenylalaninzufuhr etwa 50–70 % des Phenylalanins über die Phenylalaninhydroxylase der Leber in TYR umgewandelt wird.

Die klinische Erfahrung hat gezeigt, daß unter bestimmten Bedingungen, bei denen eine Umwandlung von Phenylalanin zu TYR nur beschränkt oder gar nicht abläuft, eine direkte TYR-Zufuhr insbesondere bei langfristiger parenteraler Ernährung erforderlich ist. Eine solche Situation besteht bei Früh- und Neugeborenen, Phenylketonurikern, Patienten mit Niereninsuffizienz, Trauma oder Sepsis sowie bei längerfristiger parenteraler Ernährung überhaupt (1, 2, 3, 4, 5, 6).

Darum enthalten einige Infusionslösungen TYR in Form eines acetylierten Derivates, dem N-Acetyl-Tyrosin (N-AC-TYR). Daneben gibt es die Möglichkeit der Infusion von GLY-TYR als Tyrosinquelle. Es besitzt eine

* Diese Arbeit ist Teil einer Dissertation, die dem Fachbereich Medizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz vorgelegt wird.

Löslichkeit von 24 g/l (7), entsprechend rund 18 g Tyrosin/l. Beide Substanzen sind in wässriger Lösung über längere Zeit stabil und überstehen die Prozedur der Sterilisation.

Neuhäuser und Mitarbeiter (8) zeigten an einem Modell langfristig parenteral ernährter Sprague-Dawley-Ratten, daß beide Substanzen in etwa gleiche Effizienz bezüglich Wachstum und Stickstoffbilanz aufweisen. GLY-TYR wird zu etwa 10 %, N-AC-TYR zu unter 1 % im Urin ausgeschieden.

Es erhebt sich die Frage, ob eine der beiden Substanzen Vorteile gegenüber der anderen bietet, wenn im Stoffwechsel des parenteral ernährten Patienten Störungen bestehen. Dazu ist es wichtig, Informationen über das metabolische Schicksal der beiden Substanzen zu erhalten. In diesem Zusammenhang interessiert es besonders, in welchen Organen und in welchem Ausmaß die fragliche Substanz in Tyrosin und Acetat bzw. Glycin gespalten werden kann. In einer Arbeit von Neuhäuser und Mitarbeitern (9) wurde bereits die Freisetzung von TYR aus N-AC-TYR in Gewebeextrakten der Ratte gemessen. In der vorliegenden Arbeit sollten daher Daten zum Glycyl-L-Tyrosin gesammelt werden.

Reagenzien, Material, Hilfsmethoden

Reagenzien: Alle Reagenzien, falls nicht anders angegeben, von Fa. Merck

Phosphatpuffer nach Sörensen mit 0,2 Mol/l Phosphat (pH 7,4). 0,9%ige (physiologische) Kochsalzlösung, mit etwas Phosphatpuffer auf etwa pH 7 stabilisiert. Ninhydrin in Methylcellosolve 3%ig gelöst (w/v). Die Lösung ist mindestens zwei Tage bei Zimmertemperatur haltbar. Natrium-Citratpuffer von 0,2 Mol/l, pH 5 mit NaOH eingestellt und $5 \cdot 10^{-5}$ Mol/l NaCN zugesetzt. GLY-TYR von Serva. Lösungen von $65 \cdot 10^{-3}$ bis $5 \cdot 10^{-3}$ Mol/l wurden angesetzt. Sie sind gefroren über mehrere Monate beständig. Isopropanol-Wasser-Lösung im Volumenverhältnis von 1:1. EDTA als Dinatrium-Salz (Titriplex III) und als Magnesiumsalz (Magnesium-Tritriplex). Rinderserumalbumin von Sigma-Chemicals mit 16,5 g N/100 g in gefriergetrockneter Form wurde in Wasser 10%ig gelöst. Biuret-Reagenz wurde aus 0,375 g CuSO₄, 1,5 g Kaliumnatriumtartrat, 75 ml 10%iger NaOH-Lösung und Wasser ad 250 ml hergestellt.

Alle Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

Tiere und Homogenate

Untersucht wurden Leber, Nieren, Muskulatur vom Glutealbereich, Lungen, Herz, Blut und Plasma von männlichen Sprague-Dawley-Ratten. Die Tiere wurden getötet, die Organe wurden sofort nach der Entnahme in flüssigen Stickstoff getaut und bis zur Verwertung bei -80 °C gelagert. Blut wurde aus der Vena cava inferior in Narkose entnommen. Zur Gewinnung der Homogenate wurden die aufgetauten Organe von anhängendem Fett befreit, gewogen und zerkleinert. Leber und Nieren wurden im Potter-Homogenisator homogenisiert und mit 0,9%iger Kochsalzlösung auf 10 bzw. 5 % verdünnt (w/v). Muskel- und Lungenhomogenate wurden mit Seesand im eisgekühlten Mörser zerrieben und mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt (25 bzw. 10%). Herz wurde in einem Mikro-Fleischwolf zerkleinert, Verdünnung erfolgte auf 25 %. Blut wurde durch dreimaliges Auftauen und Wiedereinfrieren hämolysiert, oder es wurde durch Zentrifugieren Plasma gewonnen.

Die so gewonnenen Homogenate wurden (außer Blut und Plasma) bei etwa 33 000 g für 20 Minuten zentrifugiert, um einen Überstand zu erhalten, der von Partikeln und eingesetztem Seesand befreit ist und sich leicht pipettieren läßt.

Inkubation der Homogenat-Überstände

Die Überstände (im folgenden einfach Homogenate genannt) wurden zur Messung der Reaktionsgeschwindigkeit bei einer bestimmten Dipeptidkonzentration unter konstanten Versuchsbedingungen inkubiert. Die Temperatur betrug dabei 37 °C. Der pH-Wert von 7,4 wurde von einem $4 \cdot 10^{-2}$ molaren Phosphatpuffer gehalten. Die Dipeptidkonzentrationen betrugen zwischen 0,5 und $20 \cdot 10^{-3}$ Mol/l. Wenn mehr als zwei Milliliter Homogenat vorhanden waren, wurden drei bis sechs Eppendorf-Mikroreaktionsgefäße mit Puffer und Dipeptidlösung angesetzt, im Thermostat auf Reaktionstemperatur gebracht und die Reaktion mit ebenfalls kurz erwärmtem Homogenat gestartet. Die Gewebehomogenate wurden dadurch 1:5 verdünnt. Der inkubierte Ansatz hatte ein Volumen von 1,0 ml. In den Null-Minuten-Gläschen waren 0,5 ml 1molare Perchlorsäure vorgelegt. In den anderen Gläschen wurde nach aufeinanderfolgenden Zeitpunkten die Reaktion durch 0,5 ml der Perchlorsäure gestoppt. Die Zeitintervalle wurden nach der in Vorversuchen festgestellten Aktivität gewählt.

Wenn weniger Gewebehomogenat vorhanden war (zum Beispiel von Herzmuskelhomogenat), wurde nur ein Reaktionsgefäß angesetzt, aus dem nach den gewählten Zeitabständen 0,2 ml in ein Gläschen mit 0,1 ml Perchlorsäure pipettiert wurden.

Alle Gläschen wurden durch Zentrifugation vom Eiweißpräzipitat befreit. 0,75 ml Überstand wurde durch 0,25 ml einer 0,6molaren K_3PO_4 -Lösung auf einen pH von etwa 6 gebracht. Es fiel im Eisbad Kaliumperchlorat aus, das ebenfalls abzentrifugiert wurde.

Bestimmung der Dipeptidspaltung mit Ninhydrin

Zur Ninhydrinbestimmung wurden 0,25 ml Überstand der K_3PO_4 -Fällung je nach der Dipeptidkonzentration entweder unverdünnt oder 1:2,5 verdünnt in ein Reaktionsgefäß gegeben. Dazu kamen 0,25 ml des 0,2molaren Citratpuffers (pH 5) mit NaCN und 0,25 ml einer 3%igen Ninhydrinlösung. Für 7,5 Minuten wurde auf 96 °C erhitzt und im Eisbad 5 Minuten gekühlt. Danach erfolgte eine photometrische Doppelbestimmung des gebildeten Farbstoffes bei 578 nm in Isopropanol-Wasser-Verdünnung am Eppendorf-Photometer.

Die Leerwerte enthielten nur gepufferte Gewebehomogenate, die für eine entsprechende Zeit inkubiert worden waren. DE bezeichnet im folgenden die Differenz zwischen der Extinktion eines mit Dipeptid inkubierten Gewebehomogenates und dem dazugehörigen Leerwert. Standards für die Extinktion von GLY-TYR und der Aminosäuren (AS) wurden gegen Wasser als Leerwert gemessen.

Die Bestimmung des Proteingehaltes mit der Biuretmethode

Rinderserumalbumin diente als Standard. Es wurden Dreifachmessungen durchgeführt. Zu 0,05 ml Wasser (für den Leerwert), Gewebeprobe oder Standard wurden 0,05 ml Detergens (Triton 10 %) und 2,5 ml Biuretreagenz gegeben. Nach 20 Minuten bei Raumtemperatur wurde gegen Leerwert photometriert (546 nm). Die Bestimmung des Eiweißgehaltes im Blut ist auf diese Weise nicht sinnvoll, da das Hämoglobin stört.

Entwicklung der Meßmethode

Die bei der enzymatischen Hydrolyse des GLY-TYR entstehenden AS Glycin und TYR haben in der photometrisch quantifizierten Ninhydrinreaktion eine Farbausbeute, die zusammen mehr als doppelt so hoch ist wie die des Dipeptides allein. Infolgedessen steigt die gemessene Extinktion im Verlauf der Spaltung an. Der Extinktionsanstieg ist proportional zur Menge des gespaltenen Dipeptides. Dadurch lässt sich die Geschwindigkeit der Hydrolyse bestimmen.

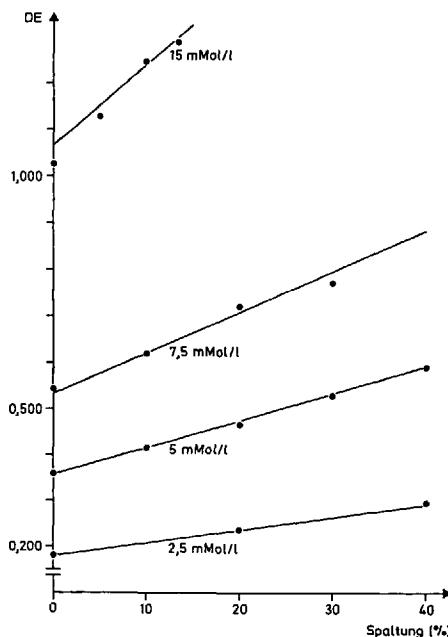


Abb. 1. Bei verschiedenen Dipeptidkonzentrationen simulierte Spaltungen. Die Geraden entsprechen den vorhergesagten, die Punkte den gemessenen Extinktionen. $1 \text{ mMol/l} = 10^{-3} \text{ Mol/l}$.

Eine solche Peptidasebestimmung wurde von Matheson und Tattie (10) erarbeitet. Eine Arbeit zur Bestimmung von Dipeptidaseaktivitäten bei der Ratte liegt von Krzysik und Adibi (11) vor. Dabei wurde ebenfalls mit einem Ninhydrinreagens gearbeitet. Es wurde die Spaltung von Glycyl-glycin und Glycyl-L-Leucin untersucht.

Abbildung 1 zeigt eine Reihe von Versuchsergebnissen, bei denen die Spaltung von GLY-TYR in die AS im Reagenzglas simuliert wurde: Es wurden jeweils entsprechende Mengen von Dipeptid- und den AS-Lösungen gemischt und die Extinktion in der Ninhydrinreaktion gemessen. Die Punkte geben die Meßwerte, die Geraden die berechneten Werte wieder. Es wird deutlich, daß die Methode geeignet ist, um solche Spaltungen in den hier untersuchten Konzentrationen nachzuweisen.

Anfangsgeschwindigkeiten

Die Geschwindigkeit der hydrolytischen Dipeptidspaltung bei der eingesetzten Anfangskonzentration c_0 wird als Anfangsgeschwindigkeit v_0 bezeichnet. Man ermittelt sie im Falle einer monomolekularen Reaktion, wie sie bei der Spaltung des Dipeptides im Prinzip vorliegt, indem man die abnehmenden Dipeptidkonzentrationen halblogarithmisch gegen die Zeit in einem Diagramm aufträgt. Es resultiert eine Gerade, deren Steigung die Geschwindigkeitskonstante der Dipeptidspaltung angibt. Multipliziert man diese mit der Anfangskonzentration, so erhält man die Geschwindigkeit zum Zeitpunkt $t = 0$ Minuten.

Da in der vorliegenden Ninhydrinbestimmung der Anstieg der Extinktion proportional zum Abfall der Dipeptidkonzentration ist, läßt sich

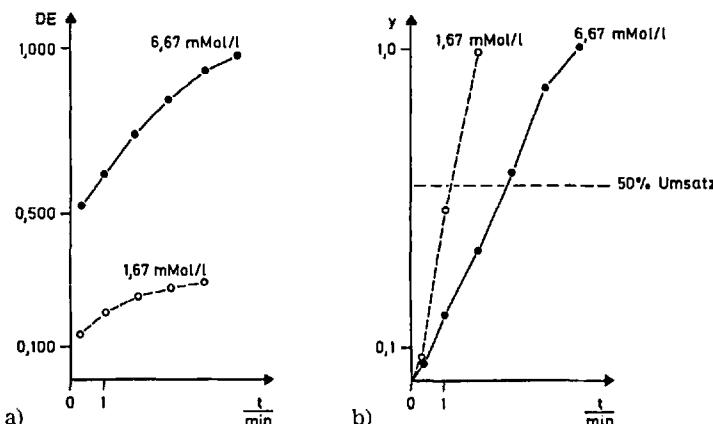


Abb. 2a. DE als Funktion von t . Messung in Nierenhomogenat (Konzentration im Inkubationsansatz: 1 %). Zwei verschiedene Dipeptidkonzentrationen sind angegeben.

Abb. 2b. y als Funktion von t für dieselben Werte wie in 2a. Die Punkte liegen in guter Annäherung auf einer Geraden, wenn man nicht wesentlich über 50 % Umsatz des eingesetzten Dipeptides reagieren läßt.

durch eine geeignete Darstellung die Geschwindigkeitskonstante auch aus den Extinktionsänderungen errechnen. Abbildung 2a zeigt den Verlauf der DE-Zeit-Funktion bei einer Messung in Rattennierengewebe bei zwei verschiedenen Dipeptidkonzentrationen. Man kann die Extinktionsänderungen halblogarithmisch auftragen, indem man den Ausdruck

$$y = -\ln((E_{AS} * c_0 - DE)) / ((E_{AS} - E_d) * c_0)$$

bildet. Die Konstante E_d bezeichnet die molare Extinktion von GLY-TYR und E_{AS} die Extinktion von einer Lösung aus je 1 Mol/l Glycin und 1 Mol/l TYR. Trägt man nun y als Funktion der Zeit auf, so erhält man im Falle der vorliegenden Untersuchung eine gute Annäherung an eine Gerade, deren Steigung die Geschwindigkeitskonstante der Dipeptidspaltung angibt und die durch den Nullpunkt geht. Aus der Geschwindigkeitskonstante kann durch Multiplikation mit der Anfangskonzentration die Anfangsgeschwindigkeit ausgerechnet werden. Abbildung 2b gibt das y - t -Diagramm für die Meßwerte aus Abbildung 2a wieder.

Dieses rechnerische Verfahren berücksichtigt nicht, daß eine enzymatisch katalysierte Reaktion nicht über den ganzen Konzentrationsbereich des Substrates eine Reaktion erster Ordnung darstellt, sondern bei hohen Konzentrationen unabhängig von der Substratkonzentration wird. Dann handelt es sich um eine Reaktion nullter Ordnung, bei der der Zusammenhang von Konzentration und Zeit linear ist. Bei der vorliegenden Untersuchung und den hier gewählten Konzentrationen und Zeitintervallen hat es sich als am zweckmäßigsten herausgestellt, bei jeder Anfangskonzentration eine logarithmierte Auswertung heranzuziehen. Dabei sollen nicht über 50 % Substratspaltung gemessen werden. Die Werte für die Steigung der Geraden wurden mit linearer Regression berechnet. Die Regressionskoeffizienten lagen etwa zwischen 0,95 und 0,99.

Enzymkinetische Daten

Für die hydrolytische Aktivität der untersuchten Gewebe sind als kennzeichnende Meßwerte angegeben

- die maximale Hydrolysegeschwindigkeit v_{\max}
- die scheinbare Michaelis-Konstante des Gewebes K_m .

In diesem Zusammenhang muß von einer scheinbaren Michaelis-Konstante gesprochen werden, da die Gleichung für Enzyme von Michaelis und Menten (13, 14) nur bei Enzymen in reiner Form angewendet werden darf. Die Enzymaktivität der hier untersuchten Gewebehomogenate zeigt in ihrer Abhängigkeit von Reaktionsgeschwindigkeit und Substratkonzentration einen Zusammenhang, der sehr an eine Michaelis-Kinetik erinnert. Man darf aber nicht aus dem Auge verlieren, daß die hier gemessene und mit Bedacht „scheinbar“ genannte Michaelis-Konstante eine Größe ist, die sich als Resultierende aller eventuell beteiligten Enzyme und Hemmfaktoren auffassen läßt. Nehmen wir einmal an, es sind zwei Enzyme beteiligt, die etwa gleiche Aktivität haben, aber von denen eines eine höhere Affinität zum Substrat hat (und damit eine kleinere Michaelis-Konstante). Dann kann man mit einigen Meßwerten bei verschiedenen Substratkonzentrationen eine scheinbare K_m berechnen, die irgendwo zwischen den beiden K_m der beteiligten Enzyme liegt. Ein errechnetes Beispiel für ein derartiges Vorgehen und den dabei eingegangenen Fehler gibt Abbildung 3a und 3b. Auch wenn die Befunde dafür sprechen, daß die Reaktionskinetik etwa einer Michaelis-Kinetik entspricht, muß bei der Extrapolierung von Reaktionsgeschwindigkeiten auf Konzentrationen, die höher oder niedriger liegen als die Meßkonzentrationen, kritisch vorgegangen werden.

Berechnung der kinetischen Daten

Die Maximalgeschwindigkeit und die scheinbare Michaelis-Konstante der Hydrolyse wurden bei der vorliegenden Arbeit durch Auftragung der

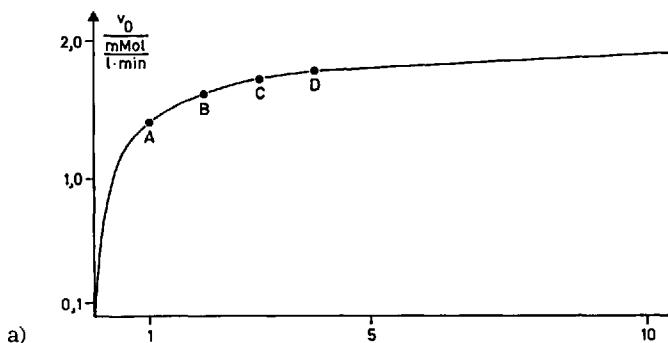


Abb. 3a. Anfangsgeschwindigkeit v_0 als Funktion der Konzentration c_0 unter der Annahme, daß zwei Enzyme wirksam sind (13). Nach eigenen Berechnungen wurden hier für die Enzyme je eine Maximalgeschwindigkeit von $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ Mol/l} \cdot \text{min}$ und K_m -Werte von 10^{-4} Mol/l beziehungsweise 10^{-3} Mol/l angenommen. Auf den ersten Blick scheint eine Michaelis-Kinetik vorzuliegen. Die Punkte A bis D entsprechen den Meßwerten für 1, 2, 3 und $4 \cdot 10^{-3} \text{ Mol/l}$. Sie liegen im Bereich oberhalb % der Maximalgeschwindigkeit.

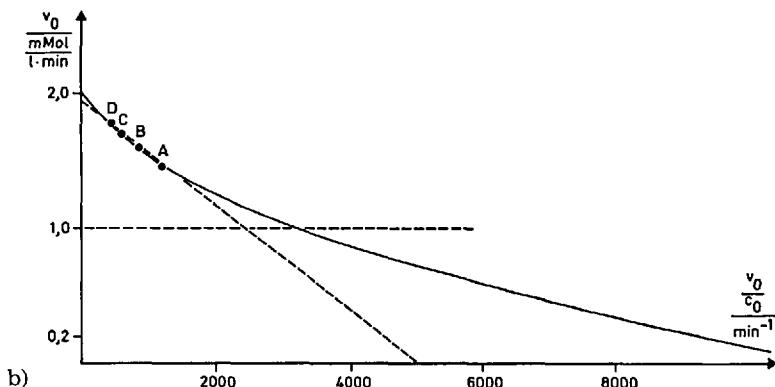


Abb. 3b. v_0 als Funktion von v_0/c_0 (Hofstee-Darstellung, siehe Text) unter der Zwei-Enzyme-Annahme. Es liegt keine Gerade vor. $v_{max}/2$ ist gestrichelt eingezeichnet. Eine Gerade durch die vier Punkte A bis D ist gestrichelt eingezeichnet. Diese Gerade wäre bei unserer Untersuchung berechnet worden, und daraus würde ein K_m von etwa $4 \cdot 10^{-4}$ Mol/l hervorgehen, was zwischen den tatsächlich gewählten Werten liegt. Bei niedrigen Konzentrationsbereichen weichen die aus dem v_{max} und K_m berechneten v_0 immer weiter von den tatsächlich vorliegenden ab.

Meßwerte für die Reaktionsgeschwindigkeiten v_0 gegen den Quotienten v_0/c_0 nach Hofstee berechnet. In dieser Darstellung muß eine Gerade resultieren, wenn die Werte einer Michaelis-Kinetik gehorchen (15). Die Auftragung nach Hofstee ist der nach Lineweaver und Burke überlegen, denn bei der letzteren werden die Werte bei niedrigerer Substratkonzentration überbewertet (15). Bei der Hofstee-Auftragung ist dieser Fehler

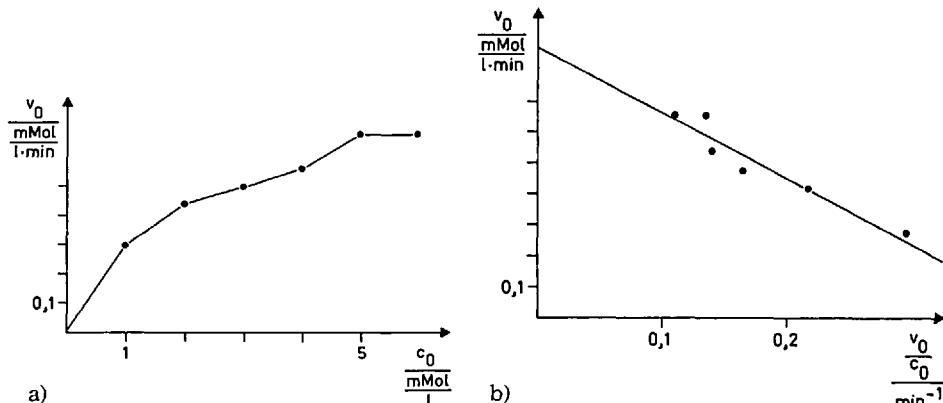


Abb. 4a. Ergebnisse der Messung in einem 2%ig inkubierten Lungenhomogenat. Der Zusammenhang von Anfangsgeschwindigkeit und Anfangskonzentration an GLY-TYR ist dargestellt. Die Kurve gleicht der einer Michaelis-Kinetik.

Abb. 4b. Messung in 2%igem Lungenhomogenat. Die Auftragung nach Hofstee gibt v_0 als Funktion von v_0/c_0 wieder. Die Punkte liegen in guter Näherung auf einer Geraden, die durch lineare Regression errechnet wurde (Korrelationskoeffizient $r = 0,95$).

nicht so groß. Bei den Versuchen wurden je nach Homogenatmenge zwischen vier und sieben verschiedene Substratkonzentrationen gemessen. In der Darstellung nach Hofstee gibt der Ordinatenabschnitt v_{\max} und der Betrag der Steigerung der Geraden K_m wieder. Diese Werte wurden durch lineare Regression berechnet. Für das Lungenhomogenat in Abbildung 4a und b ist $v_{\max} = 0,89 \cdot 10^{-3}$ Mol/l · min und $K_m = 2,1 \cdot 10^{-3}$ Mol/l · min.

Die Regressionskoeffizienten liegen bei den vorliegenden Messungen zwischen 0,56 und 0,97. Das erklärt sich aus der Streuung der Meßwerte (siehe unter Meßgenauigkeit). Der Verlauf der Kurven kommt dem einer Michaelis-Kinetik nahe.

Eigenschaften der Gewebehomogenate

In einigen Versuchen wurden hemmende und fördernde Einflüsse auf Leberhomogenat untersucht. Dabei ergab sich, daß Glycin in Konzentrationen bis 10^{-2} Mol/l keine Hemmwirkung auf die Reaktion hat. Zweiwertige Metallionen können Peptidasen beeinflussen, daher wurde der Einfluß von EDTA als Komplexbildner geprüft. Die Reaktionsgeschwindigkeit verringert sich unter $3 \cdot 10^{-3}$ Mol/l EDTA auf 30 % des Ausgangswertes. Die Zugabe von 10^{-3} Mol/l Mangan und Zink als Sulfate und Kobalt als Chlorid setzte die v_0 herab, besonders deutlich beim Kobalt auf 10 % der Kontrollaktivität. Magnesiumsulfat hat keine hemmende Wirkung auf die Reaktion. Da die Zugabe von Magnesium-EDTA die Reaktionsgeschwindigkeit nur um 50 % reduziert, ist wahrscheinlich noch ein weiteres zweiwertiges Metallion bei der Katalyse beteiligt, und es aktiviert die Reaktion noch stärker als Magnesium.

Um festzustellen, ob niedermolekulare, hitzestabile Hemmstoffe der Reaktion im Gewebe vorhanden sind, wurden Leber- und Nierenhomogenate durch kurzes Aufkochen enteiweißt und die Überstände aktivem Homogenat zugesetzt. Dabei konnte gegenüber einer Kontrolle kein Unterschied in der Aktivität gefunden werden. In Leberhomogenat konnte nachgewiesen werden, daß ein 1%ig im Ansatz für 5 Minuten inkubiertes Gewebe eine um etwa ein Viertel höhere Spaltung katalysiert als ein 5%iges Gewebe, das eine Minute inkubiert war. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß Gewebe bei höheren Konzentrationen einen

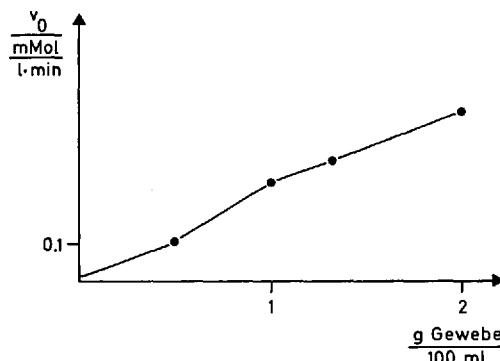


Abb. 5. Anfangsgeschwindigkeit als Funktion der Homogenatkonzentration in Leberhomogenat. Es wurde mit $7,5 \cdot 10^{-3}$ Mol/l Dipeptid gemessen.

nicht proportionalen Anstieg in der Reaktionsgeschwindigkeit zeigen. Es könnte aber auch eine gewisse Latenzphase bei Reaktionsbeginn die Ursache des beobachteten Phänomens sein, wenn nämlich das inkubierte Gewebe einige Zeit benötigt, um die volle Reaktionsgeschwindigkeit zu erreichen. Eine nicht optimale Durchmischung zum Beispiel könnte dafür verantwortlich sein.

In Lebergewebe, das zwischen 0,4 und 2 % im Reaktionsansatz bei gleicher Dipeptidkonzentration inkubiert wurde, zeigte sich eine annähernde Linearität des Homogenatkonzentrations- v_o -Zusammenhanges (Abb. 5).

Trotzdem sollte man bei der Hochrechnung der v_o -Werte für eine Gewebekonzentration von einigen Prozent auf das 100%ige Gewebe des Tieres an die Möglichkeit eines Einflusses der Gewebekonzentration denken.

Meßgenauigkeit, Besonderheiten der Bestimmungen

Bei sechs Messungen eines $3 \cdot 10^{-3}$ Mol/l Dipeptid enthaltenden 2%igen Leberhomogenates, das für drei Minuten inkubiert wurde, ergab sich ein Mittelwert für DE von 0,2828 Extinktionseinheiten, eine Standardabweichung von 0,0102, ein Variationskoeffizient von 0,0362 entsprechend 3,62 % bei einem Median von 0,2900 und einer Spannweite der Meßwerte von 0,273 bis 0,295 Extinktionseinheiten.

Bei einer Sechsfachbestimmung der v_o bei $3 \cdot 10^{-3}$ Mol/l GLY-TYR im Leberhomogenat ergaben sich ein Mittelwert von 0,2184, ein Median von $0,2110 \cdot 10^{-3}$ Mol/l·min und eine Standardabweichung von $0,0362 \cdot 10^{-3}$ Mol/l·min. Der Variationskoeffizient betrug damit 0,1658 entsprechend 16,6 %. Die Spannweite reichte von 0,1834 bis $0,2763 \cdot 10^{-3}$ Mol/l·min.

Bei der Hydrolyse von höheren Anfangskonzentrationen an GLY-TYR entstanden im Reaktionsansatz TYR-Konzentrationen von bis zu 10^{-2} Mol/l, die die angegebene Löslichkeit von $2,76 \cdot 10^{-3}$ Mol/l deutlich übersteigen. Diese hohen Konzentrationen konnten mit einer ionenaustauschchromatographischen Methode (Biotronik-Aminosäureanalysator) verifiziert werden. Es scheint also so zu sein, daß Tyrosin, wenn es aus GLY-TYR freigesetzt wird, im Ansatz mit Gewebe besser löslich ist.

Die Hydrolyse des GLY-TYR scheint nach den Befunden dieser Untersuchung bereits bei einer Spaltung von etwa 75 % beendet zu sein. Dies steht im Widerspruch zu der Tatsache, daß das Gleichgewicht der Hydrolyse von Peptidbindungen weit auf der Seite der Spaltprodukte liegt. Alanylglycin ist im Gleichgewichtszustand zu 96,7 % hydrolysiert (16). Vorerst gibt es für die Diskrepanz noch keine schlüssige Erklärung.

Ergebnisse

Die Maximalgeschwindigkeiten wurden bisher in der Einheit Mol/l·min angegeben, denn es handelt sich um eine Konzentrationsänderung in einer bestimmten Zeit. Anschaulicher ist es, die gemessenen Reaktionsgeschwindigkeiten in den 1 ml fassenden Reaktionsansätzen als Mengenänderung in Mol/min anzugeben. Die in dieser Einheit angegebene v_{max} bezieht sich auf 1 ml inkubierte Flüssigkeit. Da die Homogenate nach Gewichtsprozenten verdünnt wurden, kann man diese Reaktionsge-

Tab. 1. Spaltung von GLY-TYR in Geweben der Ratte. Mittelwerte (x) und Standardabweichungen (s).

Organ	Zahl der Mess.	Protein pro g Gewebe	K_m $\cdot 10^{-3}$ Mol/l	V _{max} (Aktivität)			
				organspez. $\mu\text{Mol}/\text{min} \cdot \text{g}$	Gesamtorgan $\mu\text{Mol}/\text{min}$	relative $\mu\text{Mol}/\text{min} \cdot \text{g}$	proteinbez. $\mu\text{Mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$
	x	s	x	x	x	s	x
Leber	4	135	9	1,5	0,4	23	0,196
Niere	4	73	22	4,4	1,8	256	0,17
Lunge	2	93		1,5	38	658	0,537
Muskel	4	62	9	2,1	1,1	46	3,95
Blut	3	n.g.		0,6	0,5	440	0,40
					0,2	162	0,07
					11	4	0,014
							n. g.

n. g. = nicht gemessen

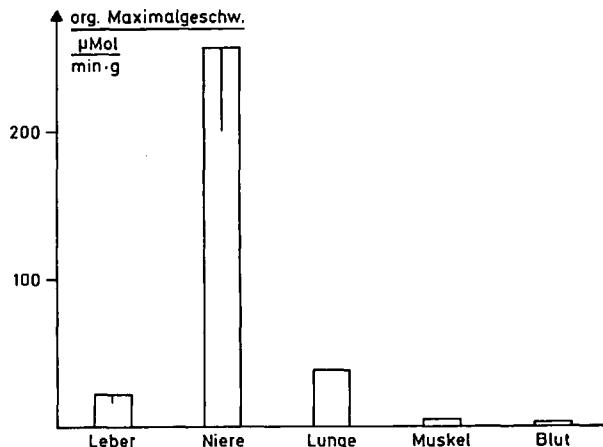


Abb. 6. Maximalgeschwindigkeiten der Hydrolyse von GLY-TYR, bezogen auf 1 g Gewebe (organspezifisch). Für Leber und Niere sind die Standardabweichungen eingezeichnet.

schwindigkeit auf eine bestimmte Gewebemasse beziehen. Zum Beispiel bei 2%igem Homogenat enthält 1 ml 20 mg Gewebe. So lässt sich auf die Aktivität von 1 g Gewebe hochrechnen.

Die Ergebnisse der Messungen sollen der Übersicht halber tabellarisch und graphisch wiedergegeben werden. In Tabelle 1 finden sich die Mittelwerte und Standardabweichungen, für Lungengewebe (nur 2 Meßwerte) ohne Standardabweichung. Die Aktivität wird in verschiedenen Umrechnungen angegeben. Organspezifische Aktivität bedeutet v_{\max}/g Gewebe, Gesamtorganaktivität v_{\max}/g Gewebe multipliziert mit der Gesamtmasse des Organes. Die Masse der Muskulatur wurde mit 1/6 des Körpergewichtes der Ratte geschätzt, die von Blut mit 6 % des Körpergewichtes. Da die Versuchstiere unterschiedliche Körpergewichte hatten, wurde die Organaktivität durch das Körpergewicht dividiert und diese Größe als relative Maximalgeschwindigkeit angegeben. Die v_{\max} wurde auch auf 1 mg Gewebeprotein bezogen.

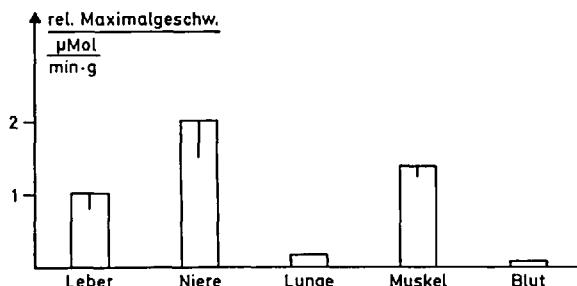


Abb. 7. Maximalgeschwindigkeiten, bezogen auf den Anteil des Organes am Körpergewicht (relativ). Für Leber, Niere und Muskel sind die Standardabweichungen eingezeichnet.

Im Homogenat vom Rattenherzen wurde bei einer einzelnen Messung eine spezifische Aktivität von $8,6 \cdot 10^{-6}$ Mol/min oder $8,6 \mu\text{Mol}/\text{min} \cdot \text{g}$ gemessen, also etwa doppelt so hoch wie in der Muskulatur. K_m wurde zu $3,34 \cdot 10^{-3}$ Mol/l bestimmt, der Proteingehalt lag bei 125 mg/ml und die proteinbezogene v_{max} bei $0,07 \mu\text{Mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$. Die Aktivität von Plasma ist sehr gering, sie liegt unter 50 % der Vollblutaktivität. In Abbildung 6 sind die organspezifischen Maximalgeschwindigkeiten im Säulendiagramm wiedergegeben, in Abbildung 7 die relativen v_{max} . Die höchste Geschwindigkeit erreicht die Hydrolyse im Nierengewebe. Das wird aus der Funktion der Niere verständlich, denn sie filtert kurzkettige Peptide in den Primärharn ab, aus dem sie dann im Tubulusapparat resorbiert und in Form der freien Aminosäuren in das Blut abgegeben werden (17). Im Lebergewebe sind hohe Aktivitäten nachzuweisen. Muskulatur hat eine geringere Aktivität im Gramm. Am wenigsten Aktivität findet sich im Vollblut.

In Abbildung 7 finden sich die relativen Aktivitäten aufgrund des höheren Gewichtsanteiles der Muskulatur und der Leber am Körpermengewicht gleichmäßiger verteilt. Die Lunge spielt wegen ihrer geringen Masse keine so große Rolle.

Um die Aktivitäten der Spaltung von GLY-TYR vergleichen zu können, gibt Tabelle 2 Ergebnisse von Neuhäuser u. Mitarb. (9) über die Spaltung des N-AC-TYR in Geweben der Sprague-Dawley-Ratten an.

In Tabelle 3 sind die Aktivitäten der GLY-TYR-Spaltung in bezug auf den Proteingehalt der Homogenatüberstände mit den Ergebnissen von Krzysik und Adibi (11) verglichen. Die Versuchstiere in dieser Arbeit waren ebenfalls männliche Sprague-Dawley-Ratten.

Tab. 2. Vergleich der Werte für die GLY-TYR-Spaltung mit den Aktivitäten der N-AC-Spaltung nach Neuhäuser und Mitarbeiter.

Organ	V_{max} (spezifisch) $\mu\text{Mol}/\text{min} \cdot \text{g}$		K_m 10^{-3} Mol/l	
	N-AC-TYR	GLY-TYR	N-AC-TYR	GLY-TYR
Leber	0,4	23	0,36	1,5
Niere	4,4	256	0,36	4,4
Muskel	nicht meßbar	4	nicht meßbar	2,1

Tab. 3. Vergleich der Aktivität der GLY-TYR-Spaltung mit den Ergebnissen für Glycylglycin (GLY-GLY) und Glycyl-L-Leucin (GLY-LEU) nach Krzysik.

Organ	V_{max} pro mg Protein $\mu\text{Mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$				K_m $\cdot 10^{-3}$ Mol/l	
	GLY-TYR	GLY-GLY	GLY-LEU	GLY-TYR	GLY-GLY	GLY-LEU
Leber	0,17	1,01	4,40	1,5	6,56	14,10
Niere	3,95	6,94	18,79	4,4	4,99	5,23
Muskel	0,07	0,16	0,41	2,1	2,96	11,89

Diskussion

Die Untersuchung zeigt, daß sich Peptidaseaktivitäten in Geweben mit der Ninhydrinreaktion messen lassen. Es ist allerdings wichtig, daß bestimmte Versuchsbedingungen eingehalten werden, damit solche Messungen nicht zu Fehlinterpretationen führen. Sie sind ausführlich dargestellt worden. Ein Versuch, die Aktivität der Spaltung von GLY-TYR einer bestimmten Peptidase zuzuordnen und dieses Enzym zu charakterisieren, ist bewußt nicht gemacht worden.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Spaltung von GLY-TYR in zahlreichen Geweben möglich ist, wobei die Niere eine besonders hohe Aktivität aufweist. Zieht man allerdings das Organgewicht in Betracht und berechnet den gesamten Umsatz, der in einem Organ möglich ist, so haben außer den Nieren auch die Muskulatur und die Leber einen beachtlichen Anteil an der Dipeptidspaltung. Die Lunge als sehr stoffwechselaktives Organ hat eine der Leber vergleichbare organspezifische v_{max} , aber sie besitzt ein geringes Gesamtgewicht. Zu bedenken ist jedoch, daß die Lunge vom gesamten Herzminutenvolumen durchströmt wird und venös zugeführte Substanzen vor der Passage anderer Organe zunächst den kleinen Kreislauf erreichen.

Diese Befunde machen die *in vivo* (8) gefundene gute Verwertbarkeit von Tyrosin aus GLY-TYR bei intravenöser Zufuhr verständlich. Aus diesen Daten können quantitative Angaben über die Gesamtverwertung bei der intravenösen Infusion nicht ohne weiteres gemacht werden, weil man dazu die Verteilung des Substrates im Organismus und die intrazellulären Konzentrationen kennen müßte. Aus dem Konzentrationsgradienten über die Zellmembran und der errechneten Spaltungsgeschwindigkeit wäre es möglich, den Transport über diese Membran zu bestimmen.

Im Vergleich der Hydrolyseaktivitäten der Gewebe mit anderen Dipeptiden fällt auf, daß vor allem bei der Maximalgeschwindigkeit deutliche Unterschiede zwischen den Substraten vorhanden sind. Auch bei den scheinbaren Michaelis-Konstanten bestehen Differenzen zwischen GLY-TYR, Glycylglycin und Glycylleucin, die eine unterschiedliche Affinität der Substrate zum Enzymsystem anzeigen. Das kann von Bedeutung sein, wenn man mehrere Dipeptide auf einmal anbieten will.

Im Vergleich mit den Ergebnissen für das N-AC-TYR fallen die niedrigeren Maximalgeschwindigkeiten der Deacetylierung auf. Vor allem die Niere ist an der Spaltung des N-AC-TYR beteiligt, die Muskulatur überhaupt nicht. Die um etwa eine Größenordnung kleinere scheinbare K_m zeigt eine höhere Affinität des N-AC-TYR zu seinem Enzymsystem an. Damit kann schon bei niedrigen Konzentrationen eine ausreichende Spaltung stattfinden. Die niedrigere scheinbare K_m kann einen Grund dafür darstellen, daß im Urin ein niedrigerer Anteil der infundierten Substanz als beim GLY-TYR ausgeschieden wird.

Die ubiquitäre Verwertbarkeit des Peptides GLY-TYR kann bei parenteraler Gabe durchaus ein Vorteil gegenüber dem N-AC-TYR sein, wenn im Falle eines niereninsuffizienten Patienten der Anteil dieses Organes an der Spaltung ausfällt.

Die praktische Bedeutung der hier beschriebenen Messung von Dipeptidase-Aktivitäten besteht darin, daß der Vergleich von Aktivitäten in

tierischen und menschlichen Geweben eine Aussage darüber zuläßt, ob Ergebnisse, die im Infusionsversuch an Versuchstieren erhalten werden, auf den Menschen übertragbar sind oder nicht.

Literatur

1. Panteliadis C, Jürgens P, Dolif D (1975) Aminosäurebedarf Frühgeborener unter den Bedingungen der parenteralen Ernährung. *Infusionstherapie klin Ernährung* 2:65–72
2. Kretchmer N, Levine SZ, McNamara H, Barnett HL (1956) Certain aspects of tyrosine metabolism in the young. I. The development of the tyrosine oxidizing system in human liver. *J Clin Invest* 35:236–244
3. Kretchmer H, McNamara H (1956) Certain aspects of tyrosine metabolism in the young. II. The tyrosine oxidizing system of fetal rat liver. *J Clin Invest* 35:1089–1093
4. Giordano C, De Pascale C, de Santo NG, Esposito R, Cirillo D, Stangherlin P (1970) Disorders in the metabolism of some amino acids in uremia. In: *Proceedings of the Fourth International Congress of Nephrology*; Karger-Verlag, New York, Vol. 2, pp 196–202
5. Wannemacher RW Jr, Klainer AS, Dinterman RE, Beisel WR (1976) The significance and mechanism of an increased serum phenylalanin-tyrosine ratio during infection. *Am J Clin Nutr* 29:997–1006
6. Dale G, Young G, Latner AL, Goode A, Tweedle D, Johnston J (1977) The effect of surgical operation on venous plasma free amino acids. *Surgery* 81:295
7. Daabees TT, Stegink LS (1978) L-alanyl-L-tyrosine as a tyrosine source during intravenous nutrition of the rat. *J Nutr* 108:1104–1113
8. Neuhauser M, Wandira JA, Göttmann U, Bäßler KH, Langer K (1985) Utilisation of N-acetyl-L-tyrosine and glycyl-L-tyrosine during long-term parenteral nutrition in the growing rat. *Am J Clin Nutr* 42:585–596
9. Neuhauser M, Welsch B, Bäßler B (1981) Zur Frage der Verwertung von N-acetylierten Aminosäuren in Infusionslösungen. Die Spaltung von N-Acetyltyrosin und N-Acetyl cystein in Rattengeweben. *Z Ernährungswiss* 21:21–26
10. Matheson AT, Tattrie BL (1964) A modified Yemm and Cocking ninhydrin reagent for peptidase assay. *Can J Biochem* 42:95–103
11. Krzysik BA, Adibi SA (1977) Cytoplasmic dipeptidase activities of kidney, ileum, jejunum, liver, muscle, and blood. *Am J Physiol* 233(6):E450–456
12. Christensen HN, Palmer GA (1974) Lehrprogramm Enzymkinetik. Verlag Chemie, Weinheim
13. Dixon M, Webb EC (1964) Enzymes. Longman, London
14. Michaelis L, Menten ML (1913) Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem Z* 49:333–369
15. Bisswanger H (1979) Theorie und Methoden der Enzymkinetik. Verlag Chemie, Weinheim, S 82
16. Klotz IM (1971) Energetik biochemischer Reaktionen. Thieme-Verlag, Stuttgart, S 22
17. Adibi SA, Krzysik BA (1976) Effect of nephrectomy and enterectomy on plasma clearance of intravenously administered dipeptides in rats. *Clin Science Molec Med* 52:205–213

Eingegangen 13. Oktober 1986

Anschrift des Verfassers:

Lars Daniel Berthold, Physiologisch-Chemisches Institut, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, Saarstr. 21, D-6500 Mainz