

# Prolidazın Mutlak Aktivitesini Değerlendirmede Fotometrik Enzim Aktivitesi Ölçüm Metodunun Optimizasyonu

[Optimization of the Photometric Enzyme Activity Assay For Evaluating Real Activity of Prolidase]

Ömer Özcan,  
Mustafa Gültepe,  
Osman Metin İpçioğlu,  
Burhanettin Bolat,  
Hüseyin Kayadibi

GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Biyokimya ve Klinik Biyokimya Bölümü, Üsküdar, İSTANBUL

Yazışma Adresi  
[Correspondence Address]

Dr. Ömer Özcan

GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi,  
Biyokimya ve Klinik Biyokimya Bölümü,  
81327, Üsküdar, İSTANBUL  
Tel: 0216 542 2832  
Fax: 0216 542 2112  
e-mail: ozcanmd@yahoo.com

Kayıt tarihi : 7 Ağustos 2006, kabul tarihi: 13 Ocak 2007

[Received: 07 August 2006, Accepted: 13 January 2007]

## ÖZET

Prolidaz, prolin içeren dipeptidlerin (X-Pro) peptid bağını koparan ve kollajen metabolizmasında yer alan önemli bir enzimdir. Prolidaz aktivitesi genellikle prolidaz tarafından açığa çıkarılan prolinin miktarının fotometrik olarak ölçüldüğü yöntemlerle belirlenir. Çalışmada amacımız, bu prolidaz aktivitesi ölçüm yönteminin mutlak aktiviteyi yansıtmadığını araştırmaktır. Yöntemdeki mangan iyonlarıyla yapılan aktivasyon işlemi, proteinlerin çöktürülmesi ve okuma basamakları incelenmiştir. Analiz içi ve analizler arası % varyasyon katsayısı % 10'un üzerinde olan yöntem ile bir test için 6-8 saat zaman harcanmaktadır. Mangan içeren aktive edici reaktif inkübasyon süresince stabil kalmamaktadır ve derişimi enzim aktivasyonu için uygun değildir. Bu nedenlerle, fotometrik yöntemin, mangan derişimleri, ön inkübasyon solüsyonunun pH'sı değiştirilmiş, proteinlerin çöktürüldüğü basamak kaldırılmış ve substratla inkübasyon süresi kısaltılıp ninhidrin tepkimesi pH'sı en uygun hale getirilmiştir. Ortamda var olan ve prolidaz enzimi ile serbestleştirilen prolinin prolidaz enzimini inhibe edebileceği ve yöntemin analitik performansının etkilenebileceği gösterilmiştir. Sonuç olarak prolinin inhibisyonundan en az etkilenecek hale getirilen modifiye (optimize) prolidaz ölçüm metodunun mutlak aktiviteyi daha iyi yansıtabilecek bir yöntem olabileceği düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Prolidaz; fotometrik yöntem; prolin inhibisyonu

## ABSTRACT

Prolidase cleaves the bonds of dipeptides containing proline (X-Pro) and an important enzyme in collagen metabolism. Prolidase activity is generally determined by photometric methods based on the measurement of proline levels produced by prolidase. We aimed to investigate the measured prolidase activity is suitable for the assessment of its physiological activity. Effects of manganese on the enzyme activation, protein precipitation and reading steps of the photometric method, and inhibitory effect of proline on the enzyme were analyzed. The intra- and inter-assay CVs % were higher than 10 % for photometric method and turnaround time was 6-8 hours/test. The activation reagent containing manganese was not stable and its concentration was not optimal for enzyme activation. Thus we modified the photometric method by changing manganese concentrations and pH of activating solution, eliminating protein-precipitating step, arranging the pH of color reagent to the pH optimum for ninhidrin reaction and shortened incubation time with substrate. The inhibitory effect of proline on the prolidase activity even in the physiological and produced proline concentrations during enzymatic analysis may limit the analytical performance of prolidase assays. In conclusion, the modified photometric method presented in this study seems to be more reliable than the classical photometric method and measured prolidase activity may not reflect the true physiological activity of enzyme due to proline inhibition.

**Key Words:** Prolidase; photometric method, proline inhibition

## GİRİŞ

Prolidaz enzimi (EC 3.4.13.9) protein katabolizmasında son basamakta oluşan prolin ve hidroksiprolini C-terminalinde bulunduran dipeptidlerin (X-Prolin veya X-Hidroksiprolin) yıkımında görevlidir (1,2). Bu enzimin aktivitesinin eksikliği durumu, oldukça nadir karşılaşılan otozomal resesif geçişli kalıtsal bir hastalığa yol açmaktadır. Hastalığın semptomları çok değişken olup kronik tekrarlayan enfeksiyonlar, mental retardasyon, splenomegali ve cilt lezyonları görülebilmektedir (3).

Prolidaz enzimi ile açığa çıkan prolin ve hidroksi prolin amino asitleri, kollajen dokusunun yaklaşık % 25'ini oluşturmakta ve bağ dokusunun devamlılığının sağlanması için ise gereklidirler (4). Prolidaz enzimi; intestinal mukoza (5), böbrek (6), karaciğer (7,8), beyin (9,10,11), kalp (12), uterus (12), timus (13), eritrositler (14), lökositler (15,16), fibroblastlar (17) ve plazma (18,19) gibi pekçok dokuda bulunmaktadır. Geniş doku dağılımı olması prolidaz enzim aktivitesindeki değişimlerin pekçok hastalığın gelişiminde ve sonucunda önem kazanabileceğini düşündürmektedir.

Prolidaz enzim aktivitesi ölçümü yöntemi için en sık olarak Chinard tarafından tanımlanan ninhidrin tepkimesi kullanılmaktadır (20). Bu tepkime daha sonradan Myara ve ark. tarafından bazı değişiklikler yapılarak optimize edilmiştir (18). Bu yöntemde  $MnCl_2$  ile 24 saat ön inkübasyon yapıp aktive edilen enzim, Gly-Pro substratı ile ( $K_m = 2.9$  mM) (21) 30 dakika inkübe edilip, açığa çıkan prolin miktarı ölçülerek enzim aktivitesi hesaplanmaktadır.

Prolidaz enzimi aktivitesi ölçümlerinde gözden kaçan, ortamda var olan ve substratın parçalanması ile de açığa çıkan prolin amino asidinin enzimi inhibe etme riskinin varlığıdır. Çünkü prolinin prolidaz enzimini serumda fizyolojik olarak bulunduğu konsantrasyonlarda güçlü bir şekilde inhibe ettiği kanıtlanmıştır (22). Bu çalışmada hem spektrofotometrik ölçüm yöntemini optimize etmek hem de prolin kaynaklı inhibisyonu azaltmak amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Çalışma grubu

55 adet rastgele seçilmiş serumda prolin düzeyi ölçüldü. Ayrıca 108 adet sağlıklı veya çeşitli derecelerde karaciğer fibrozisi olan 30-50 yaş aralığındaki 60 erkek ve 48 bayandan 12 saatlik açlık sonrası alınan kan örneklerinde prolidaz enzim aktivitesi ölçüldü.

### Prolidaz enzim aktivitesi ölçüm yöntemi

Myara ve arkadaşlarının tanımladığı yöntem küçük değişiklikler yapılarak kullanıldı. Kısaca; 100  $\mu$ L serum ile 500  $\mu$ L ön inkübasyon solüsyonu (1 mmol/L GSH, 5 mmol/L  $MnCl_2$ , % 0.1 Triton-X100 içeren 50 mmol/L Tris HCl tamponu pH 7.8) ile 37 °C'de 3 saat inkübe

edildi. Karışımın 100  $\mu$ L'si alınıp üzerine 144 mmol/L Gly-Pro içeren ön inkübasyon çözeltisinden 100  $\mu$ L konup 30 dakika 37 °C'de inkübe edildi. Karışıma 0.45 mol/L TCA'dan 1 mL eklenerek reaksiyon durduruldu. Karışım 10 dk 1500 x g'de santrifüj edilip süpernatantları ayırdı. Berrak 0.5 mL süpernatanın üzerine 1 mL glasiyal asetik asit ve 1 mL modifiye Chinard çözeltisi (glasiyal asetik asit/6 mol/L ortofosforik asit, % 55 / % 45; v/v içersinde 3 g/dL ninhidrin eritilip hazırlanır) eklendi. Karışım 90 °C'de 20 dakika inkübe edildikten sonra buz ile soğutulup beklemeden örneklerin 515 nm'deki absorbansları substratın bulunmadığı örnek körüne karşı spektrofotometrede (Beckman Coulter DU 530 UV/VIS Spektrofotometre, USA) okutuldu. Ölçülen prolin konsantrasyonları standart olarak kullanılan 5 mg/dL'lik L-prolin ile karşılaştırılarak hesaplandı. Prolidaz enzim aktivitesi birimi olarak, enzimin Gly-Pro substratını parçalayarak prolin oluşturduğu basamaktaki 1 dakikada oluşan  $\mu$ mol/L cinsinden prolin olarak tanımlandı. Ninhidrin tepkimesindeki prolinin soğurma katsayısı 27.2'dir (23).

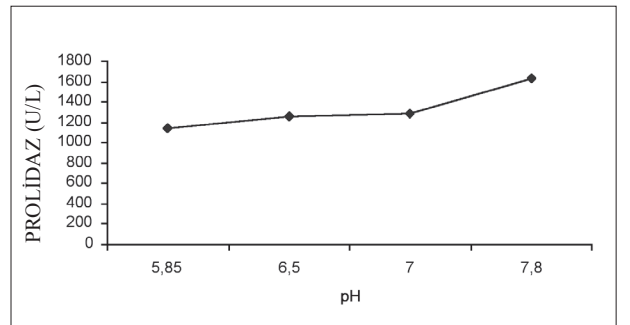
## İstatistiksel analizler

Tüm istatistiksel analizler SPSS for Windows (versiyon 11.0) kullanılarak yapıldı. Metod karşılaştırmaları için lineer regresyon analizi ve korelasyon analizi kullanıldı.

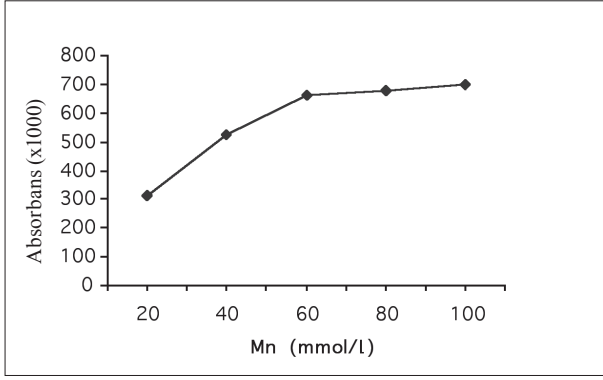
## BULGULAR

### Ön inkübasyon basamağının optimizasyonu

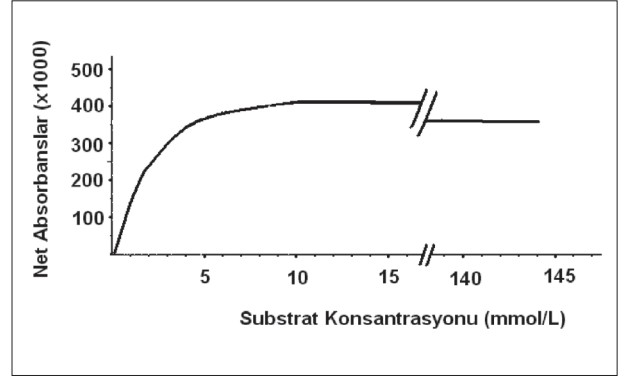
$MnCl_2$  ile uzun süreli ön inkübasyon hem pratik olarak güç olup hem de  $MnCl_2$ 'nin çökmesine yol açmaktadır. Bu problemi çözmek amacıyla  $MnCl_2$ 'nin bulunduğu Tris tamponun pH'sını düşürülüp tepkimenin performansı incelendiğinde, pH 7'de  $MnCl_2$ 'nin çökmediği ve tepkimenin performansının etkilenmediği görülmüştür (Şekil 1). Bu sayede  $MnCl_2$ 'nin derişimi daha yüksek tutularak inkübasyon zamanının kısaltılabileceği düşünülmüştür. Değişik derişimlerdeki  $MnCl_2$  ile 30 dakikalık ön inkübasyonun tepkime absorbansı üzerine etkisi Şekil 2'de görülmektedir. En uygun ortam için 50-



Şekil 1.  $MnCl_2$  derişimi 50 mmol/L olan pre-inkübasyon çözeltisinin pH'sının prolidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi



**Şekil 2.** 20-100 mM derişimi aralığındaki Mn ile 30 dakika süresince ön inkübasyonun prolidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi. 50 mM'dan fazla MnCl<sub>2</sub> derişimi prolidaz enzim aktivitesini fazla değiştirmemektedir.



**Şekil 3.** Prolidaz enzim aktivitesi üzerine substrat derişiminin etkisini görmek için yapılan Michaelis-Menten grafiği

100 mmol/L aralığındaki Mn derişimi ile 30 dakikalık inkübasyonun yeterli olduğu görülmüştür. Hangi MnCl<sub>2</sub> konsantrasyonunun uygun olduğunu anlamak için yapılan tekrarlanabilirlik ve doğrusallık çalışmasında en iyi analitik doğruluğun 50 mmol/L'lik MnCl<sub>2</sub> derişimi ile sağlandığı görülmüştür.

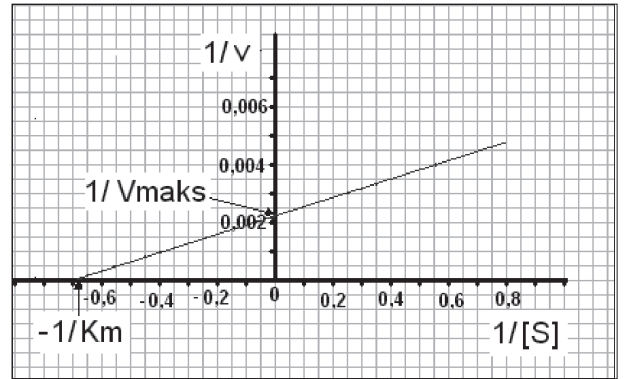
### Çöktürme basamağının ortadan kaldırılması

Klasik yöntemde bulunan prolidaz enzimi aktivitesini sonlandırmak için kullanılan TCA ile deproteinizasyon yapılması işleminin, hem dilüsyona hem de ortamda ölçülecek olan prolinlerin de çökmesine yol açtığı için tepkimeyi durdurmak amacıyla ortam pH'sını 1'e getirecek kadar asetik asit konulmuştur. Daha sonra aynı pH'daki ninhidrin çözeltisi eklenmiştir. 90 °C'de 30 dk. bekletildikten sonra spektrofotometrede absorbanslar okutulmuştur. Böylece hem deproteinizasyona bağlı problem ortadan kalkmış hem de yöntem tek bir deney tüpü içersine tamamlanmıştır.

Ninhidrin reaksiyonu için optimal pH 1, 2,5 ve 4,7'dir (24). pH'yı 1'e getirdiğimizde tepkime şiddetinin çok daha fazla olduğu ve aynı serumdan daha fazla absorbans alındığı tespit edilmiştir.

### Substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi

Prolidaz enziminin substratı olan glisin-L-prolin derişiminin enzim aktivitesi üzerine olan etkisini görmek ve en uygun derişimi tespit etmek amacıyla; prolidaz enzim aktivitesinin yüksek olduğunu bildiğimiz bir hastanın serumu kullanılarak farklı substrat derişimleri denenmiştir. Bu çalışma sonucunda Michaelis-Menten grafiği ile uyumlu hiperbolik bir eğri elde edilmiştir (Şekil 3). Km ve Vm değerlerini tespit etmek amacıyla bu eğri Lineweaver-Burk grafiğine dönüştürülmüştür (Şekil 4). Sonuçta kullanılan substrat derişiminin Km değerinin yaklaşık 100 katı olan 144 mmol/L'ye eşit olduğu ve bu düzeyde reaksiyonun substrat miktarından bağımsız hareket edeceği görülmüştür.



**Şekil 4.** Km değerini elde etmek için Michaelis-Menten grafiğinden elde edilen Lineweaver-Burk eğrisi. Km değeri 1.49 mmol/L olarak bulunmuştur.

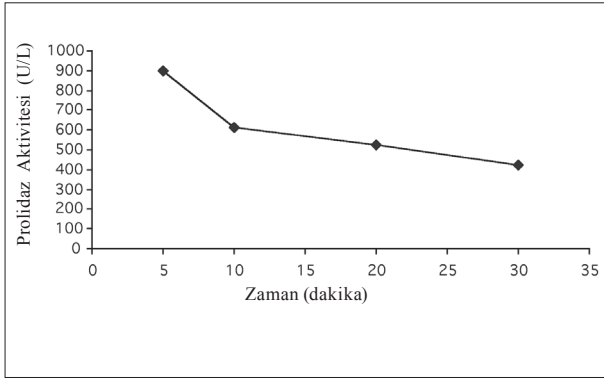
### Analiz ortamındaki prolinin inhibisyonunun incelenmesi

Serumda bulunan prolin düzeyi rastgele seçilmiş 55 kan örneğinde ölçülebilen ortalama değeri 270 µmol/L (100-700 µmol/L aralığında) olarak bulunmuş ve dağılımının normal dağılıma uymadığı görülmüştür. Bu değerler prolinin prolidaz enzimini inhibisyon sabiti (Ki) değeri olan 400 µmol/L'ye yakın bazen de üzerinde olduğu için inhibe edebileceği düşündürmektedir.

Enzim tarafından Gly-Pro substratının parçalanması ile açığa çıkan prolinin inhibitör etkisini anlamak için serum havuzu örneğinde prolidaz enzim aktivitesi 5-30 dakika aralığındaki reaksiyon sürelerine göre ölçülmüştür (Şekil 5). Süre uzadıkaça aktivitenin azalması açığa çıkan prolinin aktivitede düşüşe neden olduğunu göstermektedir.

### Yeni optimize prolidaz ölçüm metodu

Yöntemde, 100 µL serum ile 100 µL serum fizyolojik karıştırılıp bu karışımdan 25 µL alınıp 75 µL ön inkübasyon solüsyonu (1 mmol/L GSH, 50 mmol/L MnCl<sub>2</sub> içeren pH:7'de 50 mmol/L Tris HCl tampon) ile 37 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Karışım üzerine 144 mmol/L Gly-Pro içeren ön inkübasyon çözeltisinden

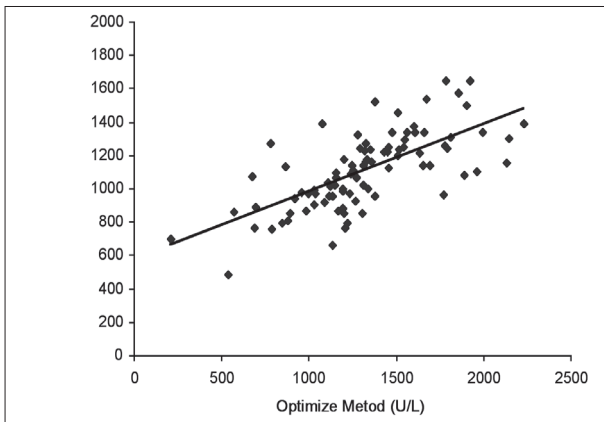


Şekil 5. Prolidaz aktivitesinin tepkime süresine göre değişimi

(pH 7.8) 100 µL eklenip 37 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Tepkimeyi durdurmak için 1 mL glasiyal asetik asit eklenmiştir. Karışım üzerine 300 µL Tris HCl tamponu (pH 7.8) ve 1 mL ninhidrin solüsyonu (0.5 mol/L'lik ortofosforik asit içersinde 3 g/dL olacak şekilde ninhidrin eritilir) eklenmiş ve karışım 90 °C'de 20 dakika bekletilmiştir. Buz ile soğutulup beklemezsiz spektrofotometrede 515 nm'deki absorpsanlar substratın katılmadığı örnek körüne karşı okutulmuştur. Ölçülen prolin derişimleri standart olarak kullanılan 5 mg/dL'lik L-prolin ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır. Prolidaz enzim aktivitesi, 1 dakikada oluşturan µmol/L cinsinden prolin olarak tanımlanmıştır. Yöntemin gün içi ve günlerarası % varyasyon katsayıları yüksek ve düşük değerlerdeki serumlar için % 10'un altında bulunmuştur.

### Metod karşılaştırması

Modifiye (optimize) metod ile klasik metodun karşılaştırmasında modifiye (optimize) metodun klasik yöntemle göre prolidaz aktivitesini anlamlı oranda yüksek olarak ölçtüğü (1303 ± 373 U/L ve 1172 U/L; p <0.001) tespit edilmiştir. Metodlar arasında ise pozitif yönde anlamlı bir korelasyon olduğu gösterilmiştir (r = 0.544 ve p <0.001) (Şekil 6). Optimize (modifiye) metodun klasik metoda göre prolidaz aktivitesini daha yüksek olarak ölçmesi, yöntemin prolin inhibisyonu etkisinden daha az etkilendiğini göstermektedir.



Şekil 6. Klasik prolidaz metodu ile modifiye (optimize) prolidaz metodunun karşılaştırılması (r=0.544 ve p<0.001)

## TARTIŞMA

Bu çalışma ile prolidaz enzim aktivitesi ölçüm yönteminin analitik olarak yeterli olmadığı gösterilmiş ve tüm basamakları optimize edilerek yeni ve daha duyarlı bir metod tanımlanmıştır. Ayrıca ortamda var olan prolin ve prolidaz tarafından açığa çıkarılan prolinin inhibisyona yol açabileceği gösterilmiştir.

Günümüzde birçok hastalığın teşhis ve takibinde kullanılabilir bir belirteç olan prolidaz enzimi için rutin laboratuvarlara uyarlanabilecek pratik bir yöntem bulunmamaktadır. Optimize edilen ve analiz süresi kısaltılan bu yöntemin kullanılması ile prolidaz enzim aktivitesinin doğru olarak ölçülmesinin başta karaciğer fibrozisi olmak üzere birçok hastalıkta hekimlere oldukça yararlı bilgiler sağlayacağı düşünülmektedir. Zaman alıcı ve prolin inhibisyonuna açık klasik yöntemle göre analitik gücü daha iyi olan yeni yöntem ile sağlıklı bireyler ile hasta grupları sonuçları arasında bulunacak fark yada farksızlıklar daha anlamlı olabilir. Bu fark analitik iyileştirmeden kaynaklanmanın yanı sıra, klasik yöntemin uzun inkübasyon süresi boyunca enzimde oluşacak yapısal değişikliklerden de kaynaklanabilir. İnkübasyon süresini kısaltarak bu etkiyi daha az indirmek mümkün olabilir.

Mangan belli bir derişime kadar enzim aktivitesini arttırmaktadır (25). Bu derişimden sonra enzim aktivitesinin baskılandığı görülmüştür. Hatta literatürde uzun süreli inkübasyonda 100 mmol/L Mn derişiminde inhibisyon olduğu gösterilmiştir (26). Bu nedenle Mn enzim üzerinde uzun sürede gelişen yapısal bir değişikliğe neden olabilir. Ayrıca, kısa süreli inkübasyonda sağlıklı serumlarda daha az aktivasyon olurken patolojik serumlarda bu aktivasyon daha fazla olabilir. Belki de, patolojik serumlarda prolidaz enzimi yapısında olabilecek bir değişiklik, Mn ile kısa süreli inkübasyonda enzimin daha fazla aktive olmasına neden olmaktadır. Bu nedenlerle kısa süreli yöntem daha iyi bir ayırım gücü sağlayabilmektedir. Yöntemin süresinin kısaltılması, sonuçları 2-3 saat içinde verebilme imkanı da sağlamıştır.

Prolidaz üzerine olan inhibitör etkisi iyi bilinen L-prolinin enzim aktivitesi ile analiz ortamına serbestleşmesi ile aktiviteyi azaltması reaksiyon süresinin en az indirilmesi gerektiğini göstermektedir. Manuel koşullarda en az 5 dakikaya indirdiğimiz tepkime süresi, eğer otomatize bir yöntem geliştirilebilirse daha da kısaltılabilir. Böylece prolinin inhibisyonu en az indirmek mümkün olacaktır. Yeni yöntemle yapılan ölçümlerin eski yöntemle ölçülen enzim aktivitelerine göre belirgin olarak yüksek çıkması prolinin inhibisyon etkisinin oldukça önemli olduğunu yansıtmaktadır.

Klasik yöntemde var olan çöktürme basamağının kaldırılmış olması yöntemin tekrarlanabilirliğini artırmış ve daha pratik bir hale getirmiştir. Son basamak olan ninhidrin tepkimesinin optimum pH değeri olan 1'e ayarlanması ise daha doğru ölçüm yapılmasına olanak sağlamıştır.

Sonuç olarak, bu çalışma ile şimdiye kadar kullanılan fotometrik prolidaz ölçüm yöntemlerinin pek çok prob-

lemli basamağının bulunduğu, fazlaca vakit aldığı ve tekrarlanabilirliğinin iyi olmadığı gösterilmiştir. Ayrıca enzim aktivitesi ölçülürken tepkime süresinin çok kısa tutulmasının oluşan ve ortamda var olan prolinin inhibitör etkisini en aza indireceği ve böylece enzimin mutlak aktivitesini daha iyi yansıtabileceği anlaşılmıştır. Yeni tanımlanan bu prolidaz enzim aktivitesi ölçüm yönteminin kollajen metabolizması ve diğer pekçok ilgili hastalığın incelenmesinde daha doğru yaklaşımlar yapılmasına yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

## Kaynaklar

- [1] Endo FA, Matsuda I. (1991) Molecular basis of prolidase (peptidase D) deficiency. *Mol Biol and Med.* 8: 117-127.
- [2] Myara I, Cosson C, Moatti N, Lemonnier A. (1994) Human kidney prolidase-purification, preincubation properties and immunological reactivity. *Int J Biochem.* 26: 207-214.
- [3] Whang SH, Zhi QW, Sun MJ. (2006) Dual activities of human prolidase. *Toxicol In Vitro.* 20: 71-77.
- [4] Kurien BT, Patel NC, Porter AC, D'Souza A, Miller D, Matsumoto H, Wang H, Scofield RH. (2005) Prolidase deficiency and the biochemical assays used in its diagnosis. *Anal Biochem.* 349 (2): 165-75.
- [5] Rubino A, Pierro M, La Torretta G, Vetrella M, Di Martino D and Auricchio S. (1969) Studies on intestinal hydrolysis of peptides: II. Dipeptidase activity toward l-glutamyl-l proline and glycyl-l-proline in the small intestine of the human fetus. *Pediatr Res.* 3: 313-319.
- [6] Davis NC. and Smith EL. (1957) Purification and some properties of prolidase of swine kidney. *J Biol Chem.* 224: 261-275.
- [7] Noren O, Dabelsteen E, Sjostrom H and Josefsson L. (1977) Histological localization of two dipeptidases in the pig small intestine and liver, using immunofluorescence. *Gastroenterology.* 72: 87-92.
- [8] Kurien BT, Porter AC, Patel NC, Kurono S, Matsumoto H and Scofield RH. (2004) Mechanized syringe homogenization of human and animal tissues. *Assay Drug Dev Technol.* 2: 308-312.
- [9] Hui KS and Lajtha A. (1978) Prolidase activity in brain: Comparison with other organs. *J Neurochem.* 30: 321-327.
- [10] Hui KS, Weiss B, Hui M, Lajtha A. (1977) Covalent coupling of calf brain prolidase. *J Neurosci Res.* 3: 231-239.
- [11] Hui KS, Lajtha A. (1978) Prolidase activity in rat brain: Developmental, regional, and subcellular distribution. *Brain Res.* 153: 79-85.
- [12] Smith EL. (1948) The peptidases of skeletal, heart, and uterine muscle. *J Biol Chem.* 173: 553-569.
- [13] Fruten JS, Smith VA, Driscoll PE. (1948) *J Biol Chem.* 173: 457-469.
- [14] Adams E, Davis NC, Smith EL. (1954) Specificity of prolidase: Effect of alterations in the pyrrolidine ring of glycyl-l-proline. *J Biol Chem.* 208: 573-578.
- [15] Powell GF, Rasco MA, Maniscalco RM. (1974) A prolidase deficiency in man with iminopeptiduria. *Metabolism.* 23: 505-513.
- [16] Powell GF, Kurosky A, Maniscalco RM. (1977) Prolidase deficiency: Report of a second case with quantitation of the excessively excreted amino acids. *J Pediatr.* 91: 242-246.
- [17] Sheffield LJ, Schlesinger P, Faull K, Halpern BJ, Schier GM, Cotton RG, Hammond J, Danks DM. (1977) Iminopeptiduria, skin ulcerations, and edema in a boy with prolidase deficiency. *J Pediatr.* 91: 578-583.
- [18] Myara I, Charpentier C, Lemonnier A. (1982) Optimal conditions for prolidase assay by proline colorimetric determination: Application to iminodipeptiduria. *Clin Chim Acta.* 125: 193-205.
- [19] Endo F, Matsuda I. (1981) Screening method for prolidase deficiency. *Hum Genet.* 56: 349-351.
- [20] Chinard P. (1952) Photometric determination of proline and ornithine. *J Biol Chem.* 199: 61-65.
- [21] Ohhashi T, Ohno T, Arata J, Sugahara K, Kodama H. (1990). Characterisation of prolidase I and II from erythrocytes of a control, a patient with prolidase deficiency and her mother. *Clin Chim Acta.* 187 (1): 1-9.
- [22] Mock WL, Green PC. (1990) Mechanism and inhibition of prolidase. *J Biol Chem.* 265 (32): 19606-19610.
- [23] Trol W, Lindsley J. (1954) A photometric method for the determination of proline. *J Biol Chem.* 655-660.
- [24] Hamilton PB, Ortiz PJ. (1950). Proline and hydroxyproline: purification, reaction with ninhydrine, and some properties of their N-nitrosoderivatives. *J Biol Chem.* 184 (2): 607-615.
- [25] Wilce MCJ, Bond CS, Dixon NE, Freeman HC, Guss JM, Lilley PE, Wilce JA. (1998) Structure and mechanism of a proline-specific aminopeptidase from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95: 3472-2477.
- [26] Davis NC, Smith EL. (1956) Purification and some properties of prolidase of swine kidney. *J Biol Chem.* 224: 261-275.