

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 14, 1976, pp. 83–92

Über Kathepsin, Phosphoprotein-Phosphatase und Saure Phosphatase in der löslichen Fraktion aus Rinderhirn-Cortex; Reinigung und Eigenschaften¹⁾

Von *Elfriede Albert*

Aus dem Biochemischen Institut der Universität Uppsala/Schweden und dem Physiologisch-chemischen Institut (Lehrstuhl II) der Universität zu Köln

(Eingegangen am 1. April/1. Juli/27. Oktober 1975)

Herrn Professor Dr. Karl Leonhard zum 70. Geburtstag gewidmet

Zusammenfassung: Aus der Großhirnrinde des Rindes wurde die lösliche Fraktion in 0,29 mol/l Saccharoselösung bereitet. Daraus konnten durch Separation auf Sephadex G 200 in neutralem Puffer drei am Proteinumsatz beteiligte Enzyme abgetrennt werden: Kathepsin (EC 3.4.4.23) Phosphoprotein-Phosphatase (EC 3.1.3.16) und Saure Phosphatase (EC 3.1.3.2). Das Kathepsin wurde durch Gelfiltration auf Sephadex G 100 und Säulenelektrophorese bis 380-fach gereinigt. Das pH-Optimum lag um pH 5,7. Bei 37°C trat binnen 30 min keine Aktivitätsabnahme ein. Die K_m betrug 2,75 mg/ml Casein *Hammarsten*. Das Molekulargewicht des Kathepsins aus dem Elutionsvolumen nach Gelfiltration und Exclusions-Gel-Elektrophorese lag bei 45 000, was dem des Kathepsins aus menschlicher Leber entspricht (Barrett, A. J. (1970) *Biochem. J.* 117, 601–607). Die Sedimentationskonstante $3,9 s_{20,w}$ ist vergleichbar mit den Größen von Proteinase anderer Herkunft, ebenso der Aufbau aus vorwiegend sauren Aminosäuren. Für die Phosphoprotein-Phosphatase und Saure Phosphatase wurden weitere Reinigungsmöglichkeiten auf Säulenelektrophorese und Hydroxylapatit aufgezeigt. Die Phosphoprotein-Phosphatase war gekennzeichnet durch ein pH-Optimum um pH 5,5. Bei 45°C war binnen 20 min keine Aktivitätsabnahme meßbar. Die K_m betrug 1,43 mg/ml Casein isoelectric. Die Saure Phosphatase war ausgezeichnet durch ein pH-Optimum von 5,6. Bei 54°C war binnen 30 min keine Aktivitätsabnahme zu messen. Die K_m für Na-Phenolphthaleindiphosphat betrug 2 $\mu\text{mol/l}$. Alle drei Enzyme verloren langsam nach einigen Wochen bei -4°C ihre Aktivität, offenbar durch Selbstverdauung in der Kälte.

Cathepsin, phosphoprotein-phosphatase and acid phosphatase in the soluble fraction of the cattle brain cortex: purification and properties

Summary: Cattle brain cortex was homogenised in 0,29 mol/l sucrose and centrifuged at 101 000 $\times g$. The supernatant contains the majority of 3 enzymes participating in protein turnover: cathepsin (EC 3.4.4.23), phosphoprotein phosphatase (EC 3.1.3.16) and acid phosphatase (EC 3.1.3.2). They were separated by chromatography on Sephadex G 200 in neutral buffer. The cathepsin was purified up to 380 fold by gel filtration on Sephadex and column electrophoresis. The pH optimum of cathepsin was 5.7. At 37°C no decrease of activity was measurable during 30 min. The K_m was found to be 2.75 mg/ml Casein *Hammarsten*. The molecular weight by gel filtration and exclusion-gel electrophoresis was about 45 000, corresponding to the cathepsin from human liver (Barrett, A. J. (1970) *Biochem. J.* 117, 601–607). The sedimentation constant $3.9 s_{20,w}$ is comparable with the values of proteinase of different origin, and the composition is similar with respect to the high proportion of acidic amino acids. The phosphoprotein phosphatase can be further purified by chromatography on hydroxyapatite and by column electrophoresis. The pH optimum of phosphoprotein phosphatase was about pH 5.5. At 45°C no decrease of activity was measurable during 20 min; the K_m was 1.43 mg/ml casein isoelectric. The pH optimum of acid phosphatase was about 5.6. At 54°C no decrease of activity was measurable during 30 min; the K_m was 2 $\mu\text{mol/l}$ for Sodium phenolphthalein diphosphate. All three enzymes slowly lost their activity during several weeks at -4°C , apparently by self digestion in the cold.

¹⁾ Gefördert durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Einleitung

Die intrazellulären Proteinasen²⁾ sind in den meisten Zellen vorhanden. Sie wirken mit am Abbau und Umbau von Zell- und Strukturproteinen (2, 3, 4, 5), sowie an der Aktivierung oder Zerstörung von Enzymen (6, 7). Mehrere proteolytische Enzyme finden sich in den Lysosomen von Leber und Milz als membranumschlossene Funktionseinheiten angeordnet, was den Abbau der Proteine in konzertierter Aktion ermöglichen soll, die unter Wechsel des pH in immer kleinere Bruchstücke zerlegt werden (8, 9). Kathepsin E (pH 2,5) und Kathepsin D (pH 3,8) greifen große Proteinmoleküle an, während die Kathepsine A, B und C, die im schwach sauren Bereich wirken (pH 5,3) eigentliche Peptidasen sind (1, 2, 9, 10, 11, 12), wobei aber Kathepsin C auch Transamidierungen katalysieren (13) und Kathepsin B auch einige Eiweißkörper aufspalten kann (14). Außer den eigentlichen Proteinasen finden sich in den Lysosomen auch die Phosphoprotein-Phosphatase (pH unter 5,8) (15) und die Saure Phosphatase (15). Letztere Aktivität dürfte ebenfalls mit dem Eiweißumsatz verknüpft sein, da sie in Zellen mit gesteigerter Proteinsynthese vermehrt vorhanden ist.

Aus Bakterien und Hefe wurden saure Proteinasen isoliert vom Molekulargewicht 32 000–38 000 und einer Sedimentationskonstanten von 3,35 $s_{20,w}$ (16, 17). In ihrer Aminosäure-Zusammensetzung zeichneten sie sich, ähnlich wie Pepsin, durch hohen Gehalt an sauren Aminosäuren, Hydroxy-Aminosäuren und Prolin und extrem niedrigen Gehalt an basischen Aminosäuren, Tryptophan und schwefelhaltigen Aminosäuren (17, 18) aus. Die meisten Proteinasen von Säugern, Streptokokken, *Aspergillus* und die Proteinasen B und C aus Hefezellen liegen in einer inaktiven Proform als Zymogen vor (16, 19a, 19b). In der Hefe sind diese aktivierbar unter Abspaltung eines Hemmproteins durch saures pH (pH 5) oder denaturierende Mittel wie Harnstoff, Aceton und gewisse Alkohole.

Im Säugerhirn sind 3 Kathepsine beschrieben von saurem (pH 3,5–3,8), schwach saurem (pH 5,4) und neutralem (pH 7,7–8,0) Wirkungsoptimum, außerdem eine Phosphoprotein-Phosphatase, die im schwach sauren Bereich (pH 5,5) wirkt. Allen ist gemeinsam, daß sie von zahlreichen angebotenen Substraten wie Dipeptiden, Modellpeptiden, löslichen Hirnproteinen und physiologisch wichtigen Phosphatverbindungen nur selten eines in geringem Ausmaß angegriffen, aber regelmäßig Phosphoproteide, meistens geprüft an Casein, aufgespalten haben (6, 20). Im Hirngewebe kommt Casein zwar nicht vor,

²⁾ Der Trivialname Saure Phosphatase wird hier gebraucht für das Enzym Orthophosphoric monoester phosphohydrolase EC 3.1.3.2, Phosphoprotein-Phosphatase für Phosphoprotein phosphohydrolase EC 3.1.3.16 und Kathepsin für Peptide peptidohydrolase EC 3.4.4.23. Enzymaktivitäten werden in mmol/min Tyrosinäquivalente bzw. nmol/min Phosphat angegeben. Spezifische Aktivitäten sind auf mg Protein bezogen.

aber native Phosphoproteide vom gleichen Polyphosphoryl-Seryltyp wie Casein, die alternierend phosphoryliert und dephosphoryliert werden (21, 22, 23) und mit dem Kationentransport unter der Erregungsleitung verknüpft gedacht werden (5, 21, 22). Die saure Proteinase wurde wie die neutrale Proteinase in der löslichen Fraktion aufgefunden (6, 24, 25, 26), die im schwach sauren Bereich wirksame, sehr aktive Proteinase in den Lysosomen (27). Die neutrale Proteinase, von *Guroff* (6) aus der löslichen Fraktion von Rattenhirn 50–100-fach gereinigt, war Ca^{++} abhängig, spaltete linear der Zeit für 40 min, wurde gehemmt durch höhere Caseinkonzentrationen und war über 30 °C labil. Die Phosphoprotein-Phosphatase aus Rinderhirn wurde 100-fach gereinigt (20), fand sich zu 60% im Cytoplasma, war aktivierbar durch Mg^{++} und Mn^{++} , empfindlich gegen Ammoniumsulfat und wurde durch höhere Substratkonzentrationen von Casein gehemmt.

In früheren Untersuchungen (28) haben wir die einzelnen Partikelfractionen und den Überstand aus Rinderhirnhomogenat auf ihre Aktivität gegen Na-Phenolphthaleindiphosphat (pH 5,6 und 9,7) geprüft als Maß für die saure und die alkalische Phosphatase. Je nach Hirnregion fand sich bis zu 61% der Aktivität des Homogenats an saurer Phosphatase im partikelfreien Überstand, während sich die alkalische Phosphatase vorwiegend in den Mikrosomen fand. Die Fähigkeit der Mikrosomen und der löslichen Fraktion, organische Phosphatverbindungen anzugreifen, wurde gegenüber 14 biologisch wichtigen Phosphatverbindungen geprüft. Das einzige hochmolekulare Substrat, Casein, wurde als einzige Substanz von der löslichen Fraktion aufgespalten. In späteren Untersuchungen (29) an Ratten- und Mäusehirnen wurde direkt von der löslichen Fraktion ausgegangen und geprüft, ob die Casein-spaltende Aktivität an den Peptidbindungen oder an den Phosphatbindungen angreift. Es fanden sich beide Aktivitäten nebeneinander im Sinne einer Proteinase (pH 5,4) und einer Phosphoprotein-Phosphatase (pH 5,6). Die Enzyme entwickelten sich im Mäusehirn unabhängig voneinander je nach Lokalisation und Reifegrad des Gewebes.

In den nachfolgend dargestellten Untersuchungen wurde versucht, diese von uns früher in der löslichen Fraktion des Säugerhirns aufgefundenen Enzyme zu reinigen und zu charakterisieren.

Material und Methoden

Bereitung von Homogenat und löslicher Fraktion

109 Rinderhirne wurden insgesamt verarbeitet in 26 einzelnen Separationsperioden. Die Großhirnrinde wurde in flachem Tangentialschnitt abgetragen. Es wurden Feuchtgewichte zwischen 90 und 760 g homogenisiert. Von 5 Rinderhirnen wurden im Mittel 660 g Feuchtgewicht an Rindengewebe gewonnen und mit sterilisierter 0,29 mol/l Saccharoselösung mit einem Porzellanpistill durch ein feines Drahtsieb gestrichen. Diese Suspension wurde homogenisiert in einem Glashomogenisator nach *Potter-Elvehjem* mit Teflonpistill und koliert durch doppelten Mull. Das Homogenat, im Mittel 1250 ml, wurde zuerst bei niedrigerer Geschwindigkeit von groben Partikeln befreit (30 min 34 000 \times g, Servall) und dann in der Spinco-Ultrazentrifuge, Modell L, mit

Rotor 40,2 bei 101 000 × g in 60 min die feineren Partikel entfernt. Der Überstand wurde als lösliche Fraktion und Enzympräparat benützt (\bar{x} 620 ml). Alle Glasgefäße, Plastikgeräte und Lösungen waren zuvor sterilisiert worden. Den Puffern wurde als Bakterizid 3 mmol/l NaN_3 zugesetzt, das in der verwendeten Konzentration die Enzyme nicht hemmte. Alle Arbeitsgänge wurden im Kühlraum bei + 4 °C durchgeführt. Die benützten Zentrifugen waren automatisch gekühlt.

Konzentrierung der löslichen Gewebsproteine

Die Proteinlösungen wurden durch Ultrafiltration in Dialysesläuchen (Visking) im Vakuum konzentriert. Andere Konzentrierungsmethoden brachten nicht den gewünschten Erfolg. Nach Konzentrierung der in Dialysesläuchen befindlichen Proteinlösung in fester Saccharose wurden zwar die Enzyme hochaktiv bewahrt, doch blieben inaktive Proteine störend beigemischt bis in späte Reinigungsschritte. Konzentrierung durch Fällung mit Ammoniumsulfat (25–60% Sättigung) beeinträchtigte die Enzymaktivität, am stärksten die der Sauren Phosphatase, aber auch die der beiden Proteinasen.

Auftrennung der Proteine

Gelfiltration

a) Sephadex (Pharmacia, Uppsala/Schweden) G 200: Säule 3,4 × 160 cm, Vo 580 ml, Vt 1760 ml, Vi 1180 ml, äquilibriert mit 0,02 mol/l Tris-HCl, pH 7,2, 0,1 mol/l an NaCl. Die Lösung des Proteins wurde von unten in die Säule eingebracht. Die Elutionsgeschwindigkeit lag bei 25 ml/h, LKB Pumpe.
b) Sephadex G 100: Säule 3,2 × 220 cm, Vo 500 ml, Vt 1710 ml, Vi 1210 ml, äquilibriert mit 0,02 mol/l Tris-HCl, pH 7,2, 0,1 mol/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Die meisten Kathepsinpräparate wurden nur einmal separiert, manche aber mehrmals bis zu 8 maliger Rezyklisierung. Es wurde auch auf dünneren Säulen (2 × 200 cm) mit Sephadex G 100 und G 75 separiert, um schärfere Gipfel zu erhalten.

Elektrophorese

Erste Versuche, Kathepsin auf Cellulose (Schleicher und Schüll) als Träger zu separieren, mußten aufgegeben werden wegen Inaktivierung des Enzyms. Als Träger wurde Sephadex G 25-Gel verwendet in Säulen 1 × 50 und 2 × 50 cm, äquilibriert mit 20–50 mmol/l Tris-HCl-Puffer, pH 7,2–8,5, später mit 20 mmol/l Natriumphosphatpuffer von pH 5,7/6,0/6,2 bis 6,5 wegen etwas besserer Beweglichkeit des Kathepsinproteins im schwach sauren Milieu. Phosphoprotein-Phosphatase und Saure Phosphatase wurden in Tris-HCl Puffer pH 7,2, 20 mmol/l separiert. Elektrisches Feld 400 bis 1000 V, 15–50 mA, 7–77 Stunden. Die Elutionsgeschwindigkeit lag zwischen 2,2 und 8,5 ml/h.

Hydroxylapatit-Gel

Die Säule, gefüllt mit Hydroxylapatit nach *Tiselius* (33) war äquilibriert mit 0,01 mol/l Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0. Bei jedem der drei Enzyme wurde zunächst schrittweise eluiert mit 0,02/0,04/0,06/0,08/0,10/0,15/0,4/0,5/1,0 mol/l Kaliumphosphatpuffer pH 7,0. Die Phosphoprotein-Phosphatase eluierte bereits mit 10 mmol/l Kaliumphosphatpuffer in einer Front inaktiven Proteins. Hier war die Bestimmung der phosphatabspaltenden Aktivität erst möglich nach Wiederabtrennung des Phosphatpuffers von der Proteinfraction auf Sephadex G 25. Kathepsin und Saure Phosphatase eluierten mit 60 mmol/l Kaliumphosphatpuffer.

Ionen austauscher

Die mit CM-Cellulose (Serva, Heidelberg) gefüllte Säule war äquilibriert mit Na-Phosphatpuffer pH 6,5, 10 mmol/l. Es wurde eluiert mit 0,01/0,02/0,05/0,10/0,5 mol/l Na-Phosphatpuffer pH 6,5. Kathepsin trat bereits mit 10 mmol/l Na-Phosphatpuffer aus.

DEAE-Cellulose (Serva, Heidelberg):

Aus der mit 50 mmol/l Tris-HCl Puffer pH 8,0 äquilibrierten Säule eluierte das Kathepsin-Protein nach Einrichtung eines NaCl-Gradienten (0,05 mol/l Tris-HCl gegen 1,0 mol/l NaCl im gleichen Puffer) mit 0,04 mol/l NaCl. Die Phosphoprotein-Phosphatase ließ sich mit 20 mmol/l Tris-HCl, pH 7,2, 5 mmol/l an NaCl nicht von der Säule lösen. Das gelang erst nach Äquilibrieren der Säule mit 2 mmol/l Acetatpuffer pH 6,0 und Einrichtung eines Gradienten gegen 1,0 mol/l NaCl im gleichen Puffer (nach H. R. Revel).

Agar-Gel-Elektrophorese

Das Agarose-Gel in 0,05 mol/l Tris-Acetatpuffer pH 7,2, war freundlichst von Prof. *Stellan Hjertén*, Uppsala, zur Verfügung gestellt worden. Die Wanderung der Kathepsinfraktion wurde nach 23 h (5 mA, 800 V) geprüft. Dazu wurden gemäß der Stricheinteilung fortlaufend Proben aus der Gelsäule entnommen, das enthaltene Gel abzentrifugiert und im Überstand die Aktivität bestimmt. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt, das Protein rekonzentriert und auf Sephadex G 75 in Tris-HCl Puffer separiert, um Gelreste zu entfernen, die die anschließende Aufnahme der Proteinkurve bei 280 nm störten.

Bestimmung der Enzymaktivität

Saure Phosphatase

Die Aktivität wurde bestimmt an der Aufspaltung des Substrates Phenolphthalein-diphosphat (Serva, Heidelberg). Die Farbintensität von freigesetztem Phenolphthalein wurde in alkalischem Milieu bei 540 nm gemessen. Die Methode von *Huggins & Talalay* (34) wurde für das Inkubationsvolumen von 0,8 ml modifiziert. Der Inkubationsansatz enthielt 0,1 ml Eluat. Als Phosphatase-Einheit gilt das kolorimetrische Äquivalent für 1 µg Phenolphthalein, freigesetzt unter Inkubationen von 60 min bei 38 °C und pH 5,6. Meßvolumen 1,8 ml.

Phosphoprotein-Phosphatase

Substrat 50 g/l Lösung von Casein isoelectric (Difco Laboratories, Detroit/USA, P-Gehalt 8,2 g/l) wurde durch Lösen unter Alkalizusatz (pH 6,9) hergestellt. Hieraus wurde eine 20 g/l Caseinlösung von pH 5,4 bereitet, indem 10 ml der 50 g/l-Stammlösung mit Acetat-Veronalpuffer pH 4,6 nach *Michaelis* (35) auf 25 ml aufgefüllt wurden. Der Inkubationsansatz von 1,0 ml enthielt bis zu 0,5 ml des Eluates (Enzym) und 0,4 ml (8 mg) Casein isoelectric, ad 1,0 mit 0,1 mol/l Acetatpuffer pH 5,2 und wurde 20–30 min inkubiert. Im säurelöslichen Überstand nach Trichloroessigsäurefällung wurde das anorganische Phosphat nach *Kuttner & Lichtenstein* (36) bestimmt und die Extinktion abgelesen bei 700 nm. Die aus Enzym bzw. Substrat einzeln während der Inkubation freigesetzte Phosphatmenge wurde in Leerwerten ermittelt. Ebenso wurden Proben von P-Standard im gleichen Volumen des Puffergemisches parallel bestimmt.

Kathepsin

Das Kathepsin wurde nach *Duspiva* (37) bestimmt. Der Ansatz von 0,3 ml enthielt 0,1 ml einer 30 g/l Lösung von Casein nach *Hammarsten* (Merck) in 8 mol/l Harnstofflösung und wurde 30–60 min inkubiert. Das säurelösliche, Tyrosin-positive Material wurde im Überstand nach Trichloroessigsäurefällung durch UV-Absorption bei 280 nm in 0,5 cm Quarzküvetten bestimmt. In Leerwerten wurde die Menge Tyrosin-positiven Materials bestimmt, das während der Inkubation aus dem Enzym bzw. dem Substrat freigesetzt wurde. Proben von Tyrosin-Standard wurden parallel nach derselben Methode bestimmt. Wegen der Empfindlichkeit des Nachweises gegenüber Detergentien mußten die Röhrchen für jeden Versuch mit Chromschwefelsäure gereinigt werden.

Proteinbestimmung

Protein wurde mit der *Folin*-Reaktion bestimmt in der Modifikation nach *Lowry et al* (38) mit kristallinem Rinder-Serumalbumin (Behring Werke Marburg) als Standard.

Ergebnisse

Reinigung der Enzyme

Die Konzentrierung der löslichen Gewebsproteine durch Ultrafiltration erbrachte unter mehreren Methoden die höchste Enzymausbeute. Gleichzeitig fiel dabei auch ein Teil der störenden hochmolekularen Proteine, die in der Gelfiltration mit der ersten Proteinfront eluieren, schon vorweg aus.

Auch der Verdünnungsgrad der löslichen Fraktion war von Einfluß auf den Ertrag an Enzymaktivität. Das Verhältnis Hirnfeuchtgewicht zum Volumen der löslichen Fraktion lag in den verschiedenen Präparaten zwischen 1:0,8 und 1:3. Alle drei Enzyme waren in den verdünnten Präparaten stärker aktiv.

Die *Auftrennung* der drei Enzymproteine erfolgte durch Gelchromatographie auf Sephadex G 200 (Abb. 1). Die drei aktiven Fraktionen wurden einzeln weiteren Reinigungsschritten unterworfen:

Die Kathepsinfraktion ergab auf Sephadex G 100 einen breiten, zweigipfligen Proteinpeak, in dessen Rückflanke die Enzymaktivität lokalisiert war (Abb. 2). Bei einigen Präparaten wurde versucht, durch 6–8 malige Rezyklisierung auf Sephadex G 100 Begleitproteine abzutrennen, was nicht gelang.

Bei der anschließend durchgeführten Elektrophorese (Abb. 3) wanderten die meisten der begleitenden Proteine zur Anode. Das Kathepsin bewegte sich im pH-Bereich zwischen 6,2 und 8,0 nur ganz gering in Richtung

zur Kathode, zwischen pH 5,7 und 6,0 etwas rascher, ohne daß es sich ganz aus der Vorderflanke des Proteinipfels abgelöst hätte. Eine Abspaltung kam einzig zustande nach wiederholten mechanischen Einwirkungen auf das Protein unter den Konzentrierungsschritten (Abb. 4). Unter der Elektrophorese gelang es, die durch alle Gel-Passagen unverändert dem Kathepsin anhaftende rotgefärbte Proteinfraction abzutrennen, da sie rascher zur Kathode wanderte. Der rote Farbstoff absorbierte maximal bei 420 nm.

Weniger geeignet zur Reinigung erwiesen sich Ionenaustausch- und Adsorptionsverfahren (CM-Cellulose, DEAE-Cellulose, Hydroxylapatit) wegen hoher Aktivitätsverluste.

Zur weiteren Reinigung der Phosphoprotein-Phosphatase erschien die Elektrophorese günstig. Die Saure Phosphatase ließ sich weiter reinigen auf Hydroxylapatit, von dem sie in 60 mmol/l Kaliumphosphatpuffer eluierte mit 75% Ausbeute, während sie unter Elektrophorese zwar Begleitproteine, aber auch stark an Aktivität verlor.

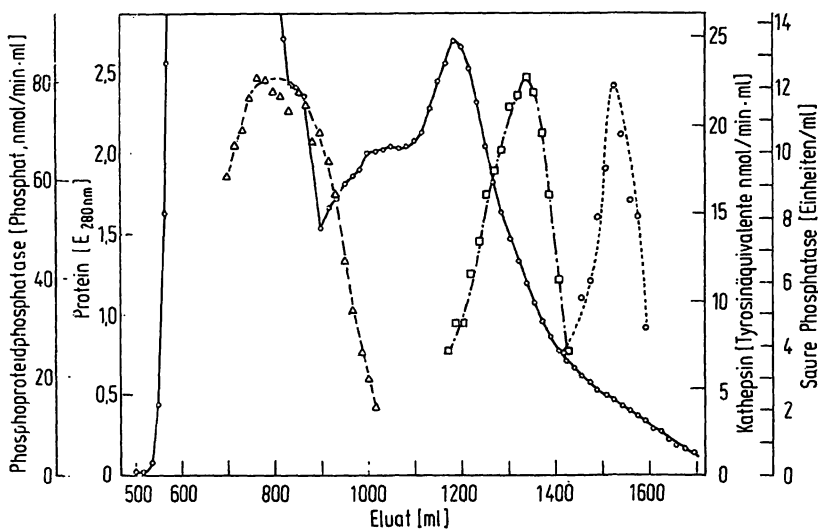


Abb. 1. Trennung auf Sephadex G 200. Lösliche Fraktion, 645 ml, Sediment nach Ammoniumsulfatzugabe 600 g/l, resuspendiert in 114 ml 0,02 mol/l Tris-HCl, 0,1 mol/l an NaCl, pH 7,2. 2,78 g Protein. Von unten in die Säule (3,4 × 160 cm), mit dem gleichen Puffer äquilibriert, aufgetragen. Elution 25 ml/h.
 ○—○ Protein
 △---△ Phosphoproteinphosphatase
 □---□ Kathepsin
 ○---○ Saure Phosphatase

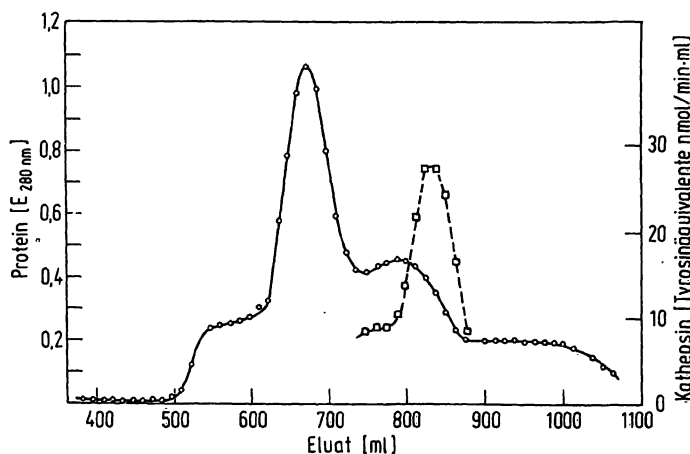


Abb. 2. Separation auf Sephadex G 100. Kathepsinfraktion aus Sephadex G 200 (s. Abb. 1), durch Ultrafiltration eingeengt auf 40 ml. Auftrag von unten auf die Säule (3,2 × 220 cm), gefüllt mit Sephadex-Gel G 100, äquilibriert mit 0,02 mol/l Tris-HCl, 0,1 mol/l an $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7,2. Elution 19 ml/h, LKB-Pumpe.
 ○—○ Protein
 □---□ Kathepsin

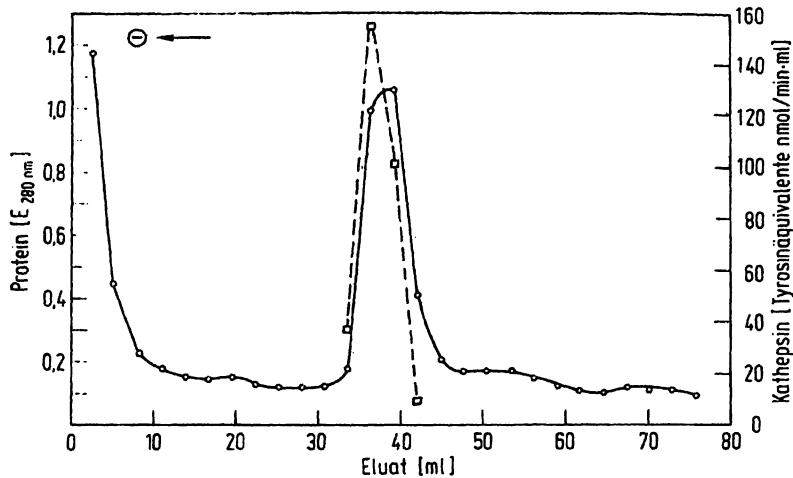


Abb. 3. Elektrophorese der Kathepsinfraktion. Kathepsinfraktion nach Passage von Sephadex G 200, 3maliger Rezyklisierung auf Sephadex G 100 (Abb. 2), 3maliger Elektrophorese auf Sephadex G 25 als Träger in 0,02 mol/l Natriumphosphatpuffer pH 6,0, Säule 2×50 cm, 35 mA, 1300 V, 54 Stunden $\rightarrow K^-$. Elution 8,4 ml/h. Fraktion 20 min. Nach allen Separierungsschritten Präparat durch Ultrafiltration eingengt. Spezifische Aktivität (Tyrosinäquivalente) 162 nmol/min \cdot mg Protein.

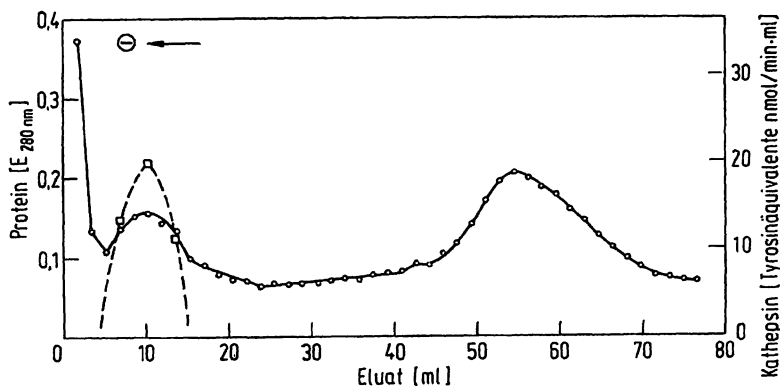


Abb. 4. Aufspaltung einer bereits zweimal elektrophoretisch gereinigten Kathepsinfraktion bei 3. Elektrophorese unter Absinken der Aktivität auf 23% und Erhöhung der Wanderungsgeschwindigkeit in Richtung auf die Kathode. Ein höherer, inaktiver Proteingipfel ist entstanden und in Richtung der Anode gewandert. Kathepsinfraktion nach Passage von Sephadex G 200, 3. Elektrophorese. Aktive Fraktionen jeweils durch Ultrafiltration eingengt, bei $-5^\circ C$ aufbewahrt und vor Auftrag zentrifugiert (10 min 25 000 rpm). Elektrophorese auf Sephadex G 25 als Träger in 0,02 mol/l Natriumphosphatpuffer pH 6,5, Säule 2×50 cm. 22 mA, 420 V, 50 Stunden, $\rightarrow K^-$.

Der Erfolg der verschiedenen Separationsmethoden ist in Tabelle 1 dargestellt, wobei der Reinigungseffekt erfaßt wurde mit der Änderung des Proteingehaltes. Vier Kathepsinpräparate, die 3–7 Separierungsschritte ($\bar{x} = 5$) durchlaufen hatten, zeigten am Ende im Mittel eine spezifische Aktivität von $\bar{x} = 163$; eine Ausbeute von $\bar{x} = 12\%$ und einen Reinigungseffekt von $\bar{x} 210$ fach. Bei einigen Präparaten wurde ein höherer Reinigungseffekt bis zum 380 fachen erreicht.

Die Haltbarkeit der Enzympräparate ist in der folgenden Übersicht dargestellt (Tab. 2).

Eigenschaften der Enzyme

An den gereinigten Kathepsinpräparaten und den aktiven Fraktionen von Phosphoprotein-Phosphatase und Saurer Phosphatase, gewonnen auf Sephadex G 200, wurden folgende Meßergebnisse erzielt:

Molekulargewicht

Aus Sephadex-Gel G 100, geeicht mit 6 bekannten Proteinen, eluierte die Kathepsinfraktion mit dem Distri-

butionskoeffizienten 0,312, was sich fast völlig deckte mit Ovalbumin. Daraus ergibt sich ein Molekulargewicht von etwa 45 000.

Die Bestimmung des *Einstein-Stokes* Radius, die Prof. *Felgenhauer* (30) von der Universitäts-Nervenlinik Köln freundlichst für uns durchführte, ergab an einem auf Sephadex G 200, G 100 und G 75 gereinigten Präparat (Spezifische Aktivität 52,3) mit der Polyacrylamidgel-Elektrophorese 4 Banden, von denen die beiden mittleren die intensivsten waren, während die schnell wandernde nur in ganz geringer Menge vorhanden war. Es ergab sich für alle vier Fraktionen ein identischer *Einstein-Stokes* Radius von 2,9 nm. Unterstellt man, daß es sich um globuläre Proteine handelt, entspräche das einem Molekulargewicht von 46 000.

Die *Phosphoprotein-Phosphatase* eluierte von Dextrangel G 200 mit dem Distributionskoeffizienten 0,198, was ein Molekulargewicht von etwa 180 000 anzeigt.

Die *Saure Phosphatase* eluierte von Sephadex G 200 mit dem Distributionskoeffizienten 0,819, was ein Molekulargewicht von etwa 23 000 anzeigt.

Tab. 1. Verteilung von Kathepsin aus der löslichen Fraktion aus Rinderhirn-Cortex unter aufeinanderfolgenden Reinigungsschritten. Konzentrierung mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung.

| Reinigungsschritt | Protein [g] | Aktivität | | Spezif. Aktivität Tyrosin-Äquivalente [nmol/min · mg Protein] | Ausbeute [%] | Reinigung |
|-----------------------|----------------|---------------------------------|-----------------------------------|--|-----------------|-----------|
| | | Tyrosin-Äquivalente [μmol/h] | Tyrosin-Äquivalente [μmol/min] | | | |
| Lösliche Fraktion | 4,870 | 274 | 4,57 | 0,94 | | |
| Ammoniumsulfatfällung | 2,780 | 256 | 4,27 | 1,54 | 93,4 | 1,6 |
| Sephadex G 200 | 0,261 | 240 | 4,0 | 15,3 | 87,4 | 16,2 |
| Sephadex G 100 | 0,039 | 202 | 3,37 | 86,4 | 73,7 | 91,9 |
| Elektrophorese | 0,019 | 98,8 | 1,65 | 86,9 | 36 | 92,4 |
| Sephadex G 100 | 0,003 | 64,2 | 1,07 | 357 | 23,4 | 380 |

Tab. 2. Haltbarkeit der Enzympräparate

| | Proteinkonz. [g/l] | τ 1/2 [d] |
|----------------------------|-----------------------|-------------------|
| Kathepsin | ca. 0,5–10 | 20 |
| Phosphoprotein-Phosphatase | ca. 2–15 | 30 |
| Saure Phosphatase | ca. 1,5 | 1,5 |
| | ca. 10 | 6 |

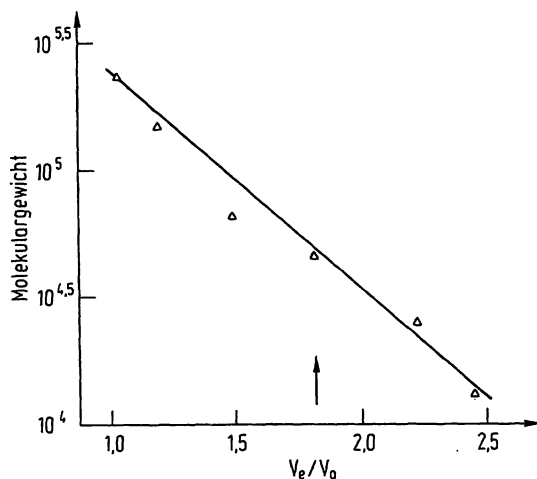


Abb. 5. Bestimmung des Molekulargewichtes von Kathepsin aus dem Elutionsvolumen nach Gelfiltration auf Sephadex G 100, Säule 3,2 × 220 cm. Aufgetragene Proteine von bekanntem Molekulargewicht in der Reihenfolge ihrer Elutionsvolumina: Katalase, Aldolase, Rinderalbumin, Ovalbumin, Trypsinogen, Cytochrom C.

Analytische Gel-Elektrophorese (Kathepsin)

Ein stärker gereinigtes Kathepsinpräparat (1 × Sephadex G 200, 3 × G 100, 3 × Elektrophorese, spezifische Aktivität 162) wurde für uns von Prof. Rüdiger, Biochemisches Institut der Universität Köln, mittels analytischer Gel-Elektrophorese untersucht (Abb. 6). Es überwiegt eine scharfe Bande bei 2 cm Wanderungstrecke über einem schmalen Untergrund schneller wandernder Proteine.

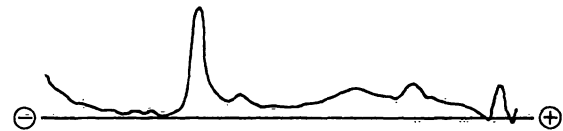


Abb. 6. Analytische Gelelektrophorese.

Kathepsinpräparat separiert auf Sephadex G 200, 3 × G 100, 3 × Elektrophorese, spezifische Aktivität (Tyrosinäquivalente) 162 nmol/min · mg Protein. Geprüft mit der analytischen Gelelektrophorese (Standardverfahren nach R. Maurer), 50 mA, 600 V, 55 min. Anfärbung mit Amidochwarz. Auswertung im Handauswertegerät von Bender und Hobein, München. Als Markierung der Wanderungstrecke diente Bromphenolblau.

Bestimmung der Sedimentationskonstanten (Kathepsin)

Ein mehrfach gereinigtes Kathepsinpräparat (1 × Sephadex G 200, 1 × G 100, 3 × Elektrophorese, spezifische Aktivität 109) wurde in der analytischen Ultrazentrifuge (Beckman Modell E) für uns von Herrn Prof. Rüdiger, Biochemisches Institut Köln, freundlichst untersucht. Es ergab sich eine Sedimentationskonstante von $3,9 \pm 0,13 s_{20,w}$. (Wegen sehr geringer Eiweißkonzentration Fehler bis zu 20% möglich).

Aminosäureanalyse (Kathepsin)

Zwei Kathepsinpräparate wurden nach der Methode von Spackman, Moore & Stein (31) mit dem Spinco Modell 120 Aminosäure-Analysator untersucht durch Dr. Eaker, Biochemisches Institut Uppsala. 1. Kathepsinpräparat: 1 × Sephadex G 200, 6 × Sephadex G 100, Endausbeute 12%. 2. Kathepsinpräparat: 1 × Sephadex G 200, 3 × Sephadex G 100, 1 × G 75, 1 × Agar-Gel-Elektrophorese, 1 × G 75, Endausbeute 7%. Nach Säurehydrolyse zeigten sich beide Präparate aus den gleichen Aminosäuren aufgebaut mit Mengenunterschieden (Tab. 3).

Kinetik (Kathepsin, Phosphoprotein-Phosphatase und Saure Phosphatase)

pH-Optimum

Kathepsin wies ein breites pH-Optimum auf im schwach sauren Bereich mit einem Maximum der Aktivität um pH 5,7. Die Halbwertsbreite betrug 2,5 pH-Einheiten.

Tab. 3. Aminosäure-Zusammensetzung von Kathepsin.

Die Werte in Klammern sind mittlere Literaturwerte, die mit Rücksicht auf die Ausgewogenheit der übrigen Restanteile eingesetzt wurden. Einzelheiten siehe Text.

| | Präparat 1 | | | Präparat 2 | | |
|----------------|---------------------------------|-----------|-------|---------------------------------|-----------|-------|
| | $\mu\text{mol}/0,63 \text{ mg}$ | Reste/Mol | Mol % | $\mu\text{mol}/0,39 \text{ mg}$ | Reste/Mol | Mol % |
| Tryptophan | (0,1) | (6,99) | — | (0,1) | (11,54) | — |
| Lysin | 0,3775 | 26,4 | 6,57 | 0,2435 | 28,10 | 5,69 |
| Histidin | 0,1028 | 7,2 | 1,79 | 0,0635 | 7,33 | 1,48 |
| Ammoniak | (0,3) | (20,9) | — | 0,9840 | 113,57 | 23,0 |
| Arginin | 0,2296 | 16,0 | 4,00 | 0,1359 | 15,68 | 3,18 |
| Asparaginsäure | 0,6130 | 42,8 | 10,7 | 0,3267 | 37,71 | 7,64 |
| Threonin | 0,2836 | 19,8 | 4,93 | 0,1711 | 19,75 | 4,00 |
| Serin | 0,3879 | 27,1 | 6,75 | 0,3075 | 35,49 | 7,19 |
| Glutaminsäure | 0,6703 | 46,8 | 11,7 | 0,3177 | 36,67 | 7,43 |
| Prolin | 0,3252 | 22,7 | 5,7 | 0,1849 | 21,34 | 4,32 |
| Glycin | 0,4699 | 32,8 | 8,2 | 0,3471 | 40,06 | 8,11 |
| Alanin | 0,4238 | 29,6 | 7,4 | 0,2491 | 28,75 | 5,82 |
| Halb-cystin | 0,0775 | 5,4 | 1,4 | (0,1) | (11,54) | — |
| Valin | 0,4105 | 28,7 | 7,1 | 0,2117 | 24,43 | 4,95 |
| Methionin | 0,1084 | 7,6 | 1,9 | 0,0546 | 6,3 | 1,28 |
| Isoleucin | 0,2718 | 19,0 | 4,7 | 0,1571 | 18,1 | 3,67 |
| Leucin | 0,5263 | 36,8 | 9,2 | 0,2808 | 32,41 | 6,56 |
| Tyrosin | 0,2299 | 16,1 | 4,0 | 0,0954 | 11,01 | 2,23 |
| Phenylalanin | 0,2578 | 18,0 | 4,5 | 0,1256 | 14,49 | 2,92 |

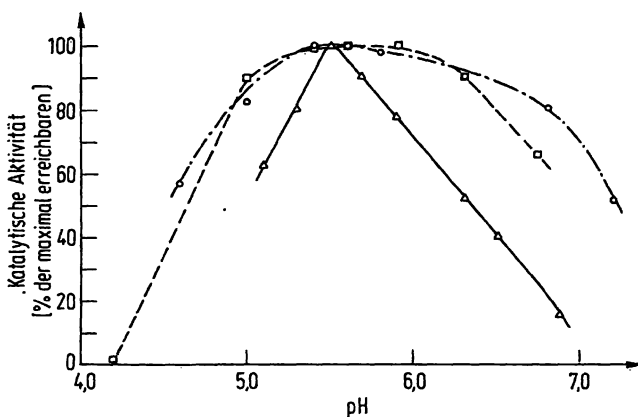


Abb. 7. pH-Optimum

Kathepsinpräparat: spezifische Aktivität (Tyrosin-äquivalente) 52 nmol/min · mg Protein. Im Ansatz von 0,3 ml 0,05 ml Enzympräparat. Inkubiert 60 min bei 37 °C. Phosphat-Citrat-Ammoniak-Puffer nach Willstätter-Grassmann (37). Phosphoprotein-Phosphatase: Im Ansatz von 0,8 ml : 0,05 ml Enzympräparat (spezifische Aktivität (Phosphat) 2,61 nmol/min · mg Protein), Acetat-Veronalpuffer nach Michaelis (35). Inkubiert 20 min, 38 °C. Saure Phosphatase: Im Ansatz von 0,8 ml : 0,1 ml Enzympräparat (1671 Phosphatase-Einheiten/mg Protein), Acetat-Veronalpuffer nach Michaelis (35), inkubiert 60 min bei 38 °C. 100% Umsatz entsprechen: Kathepsin (Tyrosinäquivalente) 9,66 nmol/min · ml. Phosphoprotein-Phosphatase (Phosphat) 6,65 nmol/min · ml sowie Phosphatase 94 Phosphatase-Einheiten/ml.

□—□ Kathepsin
 △—△ Phosphoprotein-Phosphatase
 ○—○ Saure Phosphatase.

Die Phosphoprotein-Phosphatase war durch ein schärferes pH-Optimum mit einem Maximum bei pH 5,5 ausgezeichnet. Die Halbwertsbreite betrug 1,3 pH-Einheiten. Die

Saure Phosphatase zeigte den breitesten pH-Wirkungsbereich mit einem Optimum bei pH 5,6 und einer Halbwertsbreite von 2,6 pH-Einheiten.

Optimale Inkubationstemperatur

Kathepsin hatte unter den 3 Enzymen die steilste Temperaturabhängigkeit mit Optimum bei 37 °C. Bei höheren Temperaturen fiel die Aktivität sehr schnell ab und war bei 50 °C praktisch verschwunden.

Die Phosphoprotein-Phosphatase hatte ihr Temperatur-Optimum bei 45 °C.

Die Saure Phosphatase hatte das höchste Temperatur-Optimum bei 54 °C. Selbst bei 60 °C waren beide Enzyme noch zu 50% aktiv.

Optimale Inkubationsdauer

Die Aktivität verlief linear der Zeit für Kathepsin und Saure Phosphatase während 30 min, für die Phosphoprotein-Phosphatase während 20 min.

Optimale Substratkonzentration

Bei Kathepsin stieg die Enzymaktivität bis zur Substratkonzentration von 6 g/l Casein Hammarsten an. Dann setzte eine Substratinhibition ein. Die Caseinkonzentration, bei der der Extinktionsunterschied (bei 280 nm) die Hälfte des Maximalwertes erreichte, war 2,75 g/l. Für die Phosphoprotein-Phosphatase war die optimale Substratkonzentration 10 g/l Casein isoelectric, das entspricht 82 mg/l caseingebundenem Phosphor. Bei 1,43 g/l Casein war die halbe Maximalgeschwindigkeit erreicht. Darüber trat auch hier Substratinhibition ein.

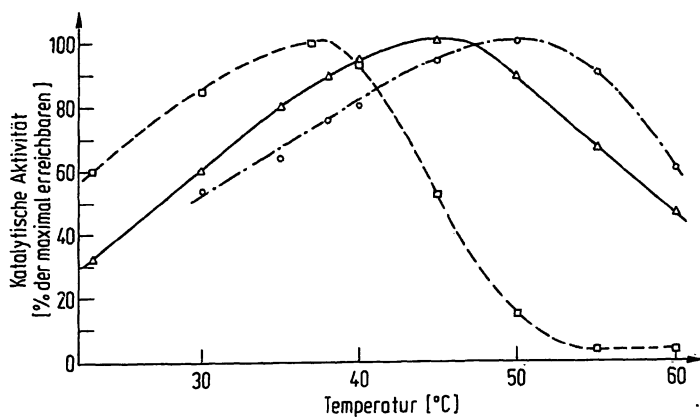


Abb. 8. Temperatur-Optimum.

Kathepsin: Im Ansatz von 0,3 ml : 0,05 ml Enzympräparat (Tyrosinäquivalente) 52,3 nmol/min · mg Protein. Inkubiert 30 min pH 5,4. Phosphoprotein-Phosphatase: Im Ansatz von 0,8 ml : 0,05 ml Enzympräparat (Phosphat) 2,61 nmol/min · mg Protein. Inkubiert 40 min, pH 5,5. Saure Phosphatase: Im Ansatz von 0,8 ml : 0,1 ml des Enzympräparates (1671 Phosphatase-Einheiten/mg Protein), inkubiert 50 min pH 5,6. 100% Umsatz entsprechen: Kathepsin (Tyrosinäquivalente) 14,6 nmol/min · ml. Phosphoproteinphosphatase (Phosphat) 5,7 nmol/min · ml. Saure Phosphatase 120 Phosphatase-Einheiten/ml.

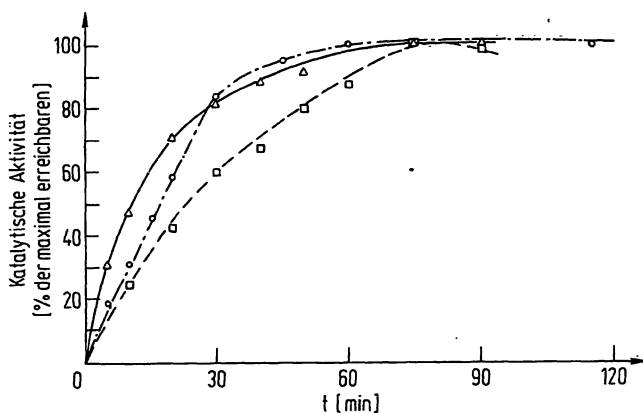


Abb. 9. Optimale Inkubationsdauer.

Kathepsinpräparat: Spezifische Aktivität (Tyrosinäquivalente) 109 nmol/min · mg Protein. Im Ansatz von 0,3 ml : 0,1 ml Enzympräparat, inkubiert bei pH 5,4, 37 °C. Phosphoprotein-Phosphatase: Im Ansatz von 0,8 ml : 0,05 ml Enzympräparat (Phosphat), 2,61 nmol/min · mg Protein, inkubiert bei pH 5,5/45 °C. Saure Phosphatase: Im Ansatz von 0,8 ml : 0,1 ml Enzympräparat (1671 Phosphatase-Einheiten/mg Protein). Inkubiert bei pH 5,6/50 °C. 100% Umsatz entsprechen: Kathepsin (Tyrosinäquivalente) 8,2 nmol/min · ml. Phosphoproteinphosphatase (Phosphat) 3,1 nmol/min · ml. Saure Phosphatase 78 Phosphatase-Einheiten/ml. Zeichenerklärung wie Abb. 7.

Bei der Sauren Phosphatase trat keine Substrathemmung auf. Die K_m betrug für Na-Phenolphthaleindiphosphat 2 μ mol/l.

Diskussion

Aus der löslichen Fraktion aus Rinderhirn-Cortex wurden 3 Enzyme isoliert, abgrenzbar durch Unterschiede des Molekulargewichtes, der kinetischen Eigenschaften und der Wirkung auf das Substrat. Die Saure Phosphatase wurde hier nur im nicht-biologischen Sinne charakterisiert durch ein körperfremdes Substrat Na-Phenolphthaleindiphosphat. Aus anderem Zusammenhang weiß man aber, daß sie mit dem Proteinumsatz verknüpft ist. Von den beiden Proteinasen im Gehirn: Kathepsin und Phos-

phoprotein-Phosphatase ist bekannt, daß sie fast nur Phosphoproteine angreifen, hier gemeinsam an der Aufspaltung von Casein geprüft.

Das Kathepsin stellte sich auf Dextran-Gel als einzelne, einheitliche Fraktion dar. Allerdings ergab die Polyacrylamidgel-Elektrophorese eines noch nicht stärker gereinigten Präparates (spezifische Aktivität 52,3) 4 Banden, die alle den gleichen Molekulradius hatten. In einem stärker gereinigten Präparat (spezifische Aktivität 162) trat nur eine Hauptbande hervor über einem schmalen, eiweißhaltigen Untergrund. Daher liegt möglicherweise das Hirnkathepsin in Isoenzymen vor mit einer Hauptfraktion, die bei weitergehender Reinigung alleine zurückbleibt. In der Leber sind von Kathepsin D mehrere Isoenzyme beschrieben (1) und von Kathepsin B1 mindestens 6 Isoenzyme (10). Auch im Hirn der Ratte stellten sich saure und neutrale Proteinase als Gruppe von Enzymen dar, die aber wegen ähnlicher Eigenschaften aus Dextran-Gel jeweils als einzelner Gipfel eluierten (26).

Es wurde in immer neuen Separationen versucht, das Enzymprotein rein darzustellen. Dabei zeigte sich regelmäßig die Kathepsinaktivität asymmetrisch dem Proteingipfel aufgelagert. Nur nach physikalischer Einwirkung auf das Proteinmolekül durch Frieren und Tauen, überlange Ultrafiltration, wiederholtes Zentrifugieren, Schwenken und Rühren, vielleicht auch durch die Erniedrigung des pH nach Fällung mit festem Ammoniumsulfat, spaltete sich aus dem aktiven Proteinpräparat eine inaktive Eiweißfraktion ab, die sich unter Elektrophorese entgegengesetzt, zur Anode, bewegte. Gleichzeitig gewann die aktive Fraktion raschere Beweglichkeit zur Kathode, deckte sich fast symmetrisch mit dem zugeordneten Proteingipfel und eluierte von Dextrangel später, was eine Verkleinerung des Moleküls anzeigt. Es spielten also wahrscheinlich in dem Präparat noch Assoziations- und Dissoziationsvorgänge eine Rolle. Vielleicht wurde ein fest mit dem Enzym verbundenes Begleitprotein nach Einwirkung gewisser physikalischer Faktoren abgespalten. Kathepsin könnte in der Zelle physiologisch fest mit einem Hemmprotein verbunden sein als wirksamer Schutz gegen Selbstverdauung. Dieses könnte durch

wiederholte, leichte mechanische Einwirkungen abgespalten werden ohne Verschwinden, aber unter Schmälerung der Aktivität.

Aus dem Elutionsvolumen bei Gelfiltration ergab sich ein Molekulargewicht für Kathepsin von etwa 45 000. Das entspricht dem Molekulargewicht von Kathepsin D aus menschlicher Leber (1). Aus der analytischen Gel-Elektrophorese ergab sich ein Molekulargewicht von 46 000. Da mit Hilfe der Säulenchromatographie und der analytischen Gel-Elektrophorese identische Molekülgröße gefunden wurde, kann man annehmen, daß es sich um ein normal konfiguriertes, globuläres Proteinmolekül handelt.

Die Bestimmung der Sedimentationskonstanten von Kathepsin in der analytischen Ultrazentrifuge ergab den Wert von $3,9 s_{20,w} \pm 0,13$. Ähnliche Sedimentationskonstante und Molekulargewicht fanden sich bei anderen globulären Enzymproteinen mit Proteinase-Aktivität:

| | $s_{20,w}$ | Mol.Gew. |
|---|------------|----------|
| Kathepsin: Dorschleber | 3,31 | 58 000 |
| Saure Proteinase: <i>Aspergillus</i> | 3,33 | 34 900 |
| Proteinase: <i>B. thermoproteolyticus</i> | 3,6 | 37 000 |
| Pepsinogen | 3,24 | 40 000 |
| | | (32) |

Die Aminosäure-Zusammensetzung wurde zwar nur an bis 380 fach gereinigten Präparaten geprüft. Dennoch ergab sich der für hochgereinigte Proteinase anderer Herkunft (Säuger-Pepsin, *Aspergillus*-Proteinase (17, 28)) typische Aufbau aus sauren Aminosäuren bei sehr niedrigem Gehalt an basischen und schwefelhaltigen Aminosäuren.

Enzymkinetisch fiel auf, daß im Gegensatz zu der an anderen Proteinase beobachteten Hitzestabilität (5)

Hirnkathepsin empfindlich ist gegen Temperaturen über 40°C , wobei es rasch seine Aktivität verliert, was auch von Guroff (6) beobachtet wurde. Dagegen waren Phosphoproteid-Phosphatase und Saure Phosphatase weit unempfindlicher gegen Wärme.

Die in der Literatur für Proteinase beschriebene Substrathemmung (6, 20) trat auch hier bei beiden Proteinase hervor. Sie wird durch Chelatbildung mit aktivierenden Metallen oder Verunreinigungen erklärt (6).

Umgekehrt war eine Notwendigkeit zur Aktivierung durch Metalle oder andere Aktivatoren nicht zu erkennen.

Die pH-Optima der drei untersuchten, mit dem Proteinumsatz verknüpften Enzyme lagen dicht zusammen, wodurch gemeinsamer Angriff am Substrat erleichtert werden könnte.

Die in der Kälte aufbewahrten Präparate der 3 Enzyme, unkonzentriert oder eingeeengt, hielten sich nicht unbegrenzt, sondern verloren allmählich ihre Aktivität, was für schleichende Selbstverdauung auch in der Kälte spricht.

Die rote Proteinfraction ist im Eluat aus Sephadex-Gel stets der Vorderflanke der Kathepsinaktivität verhaftet, konnte aber unter Elektrophorese durch raschere Wanderung zur Kathode abgetrennt werden. Ihr Absorptionsmaximum liegt bei 420 nm. Danach könnte es sich um ein Hämprotein handeln.

Danksagung

Herrn Professor K. Heinrich, Direktor der Psychiatrischen Klinik Düsseldorf, wird freundlichst gedankt für zeitliche Freistellung zur Niederschrift dieser Arbeit.

Literatur

- Barrett, A. J. (1970), *Biochem. J.* 117, 601–607.
- Dingle, J. T., Barrett, A. J. & Weston, P. D. (1971), *Biochem. J.* 123, 1–13.
- Morrison, G. I. G., Barrett, A. J., Dingle, J. T. & Prior, D. (1973), *Biochim. Biophys. Acta* 302, 411–419.
- Schwabe, C. & Sweeney, S. C. (1972), *Biochim. Biophys. Acta* 284, 465–472.
- Haurowitz, F. (1957), *Ann. New York Acad. Sci.* 68, 3–10.
- Guroff, G. (1964), *J. Biol. Chem.* 239, 149–155.
- Suzuki, K. (1973), *Vitamins (Japan)* 47, 285–295. Ref. C. A. 79, (1973) 88667n.
- Goettlich-Riemann, W., Young, J. O. & Tappel, A. L. (1971), *Biochim. Biophys. Acta* 243, 137–146.
- Liao Huang, F. & Tappel, A. L. (1971), *Biochim. Biophys. Acta* 236, 739–748.
- Barrett, A. J. (1973), *Biochem. J.* 131, 809–822.
- Greenbaum, L. M. & Fruton, S. J. (1957), *J. Biol. Chem.* 226, 173–180.
- Lichtenstein, N. & Fruton, J. S. (1960), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 46, 787–791.
- Liao Huang, F. & Tappel, A. L. (1972), *Biochim. Biophys. Acta* 268, 527–538.
- De Lumen, B. O. & Tappel, A. L. (1973), *Biochim. Biophys. Acta* 293, 217–225.
- Lieberherr, M., Vreven, J. & Vaes, G. (1973), *Biochim. Biophys. Acta* 293, 160–169; 170–177.
- Lenney, J. F. & Dalbec, J. M. (1969), *Arch. Biochem. Biophys.* 129, 407–409.
- Ottesen, M. & Rickert, W. (1970), *Comp. Rend. Trav. Lab. Carlsberg* 37, 301–325.
- Horiuchi, S., Yamasaki, M. & Yamada, Y. (1969), *Sci. Papers Coll. Gen. Educ. Univ. Tokyo* 19, 141–150.
- Hayashi, R., Oka, Y., Doi, E. & Hata, T. (1968)
 - Agric. Biol. Chem. (Tokyo)* 32, 359–366.
 - Agric. Biol. Chem. (Tokyo)* 32, 367–373.
- Rose, S. P. R. & Heald, P. J. (1961), *Biochem. J.* 81, 339–347.
- Rabinowitz, M. & Lipmann, F. (1960), *J. Biol. Chem.* 235, 1043–1050.
- Rodnight, R. (1966), in „Protides of the Biological Fluids.“ (Hrsg. H. Peeters) S. 39. Elsevier, Publ. Amsterdam.
- Rose, S. P. R. (1962), *Biochem. J.* 83, 614–622.
- Ansell, G. B. & Richter, D. (1954), *Biochim. Biophys. Acta* 13, 87–91.

25. Palladin, A. V., Polyakova, N. M. & Lishko, V. K. (1963), *J. Neurochem.* 10, 187-194.
26. Marks, N. & Lajtha, A. (1965), *Biochem. J.* 97, 74-83.
27. Beaufay, H., Berleur, A. M. & Doyen, A. (1957), *Biochem. J.* 66, 32 p.
28. Albert, E. (1955), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 302, 129-141.
29. Albert, E. (1968), *diese Z.* 6, 38-41.
30. Felgenhauer, K. (1971), *Clin. Chim. Acta* 32, 53-57.
31. Spackman, D. H., Stein, W. H. & Moore, S. (1958), *Anal. Chem.* 30, 1190-1206.
32. Sober, H. A. Ed. (1970), *Hdb. of Biochemistry*, 2. Aufl. S.C-15, Chemical Rubber Co. Cleveland, Ohio.
33. Levin, O. (1962) in „Methods in Enzymology“ (Colowick, S. P. & Kaplan, N. O. Ed) Bd. 5, p. 27, Academic Press, New York and London.
34. Huggins, C. & Talalay, P. (1945), *J. Biol. Chem.* 159, 399-410.
35. Michaelis, L. (1931), *Biochem. Z.* 234, 139-141/Documenta Geigy Wiss. Tab. 6. Aufl. Basel S. 277.
36. Kuttner, Th. & Lichtenstein, L. (1930), *J. Biol. Chem.* 86, 671-676.
37. Duspiva, F. (1939), *Protoplāsma* 32, 211-229.
38. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951), *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Prof. Dr. E. Albert
Psychiatrische Klinik
der Universität Düsseldorf
D-4000 Düsseldorf
Bergische Landstr. 2