

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.  
13. Jg. 1975, S. 45–48

## Umsatz von L-Aminosäure-nitroaniliden durch Arylamidasen<sup>1)</sup>

### Untersuchungen über Arylamidasen menschlicher Gewebe, II. Mitteilung

Von K. Lorentz, Silke Petersen<sup>2)</sup> und U. Ritter

Aus der I. Medizinischen Klinik (Direktor: Prof. Dr. U. Ritter) der Medizinischen Hochschule Lübeck

(Eingegangen am 2. August/11. Oktober 1974)

L-Alanin-4-nitroanilid ist das optimale Substrat zur Bestimmung von Arylamidasen im kinetischen Test. Nur L-Leucin-4-nitroanilid wird ebenso schnell umgesetzt, doch stört seine Hydrolyse durch Aminopeptidase (cytosol). N-substituierte Verbindungen werden nicht, andere L-Aminosäure-nitroanilide nur langsam und von verschiedenen Geweben gleichartig gespalten, so daß organotypische Muster für den Umsatz von Nitroaniliden fehlen. Entsprechend werden sie auch im Serum bei verschiedenen Erkrankungen vermißt. — In allen Geweben findet sich eine Peptidase, die N-Acetyl-L-alanin-4-nitroanilid bei pH 7,9 hydrolysiert. Das Enzym ist in Serum und Urin nur in minimaler Aktivität nachweisbar und auch bei Erkrankungen der Leber und Gallenwege nicht erhöht.

### Hydrolysis of L-amino acid nitroanilides by arylamidases. Studies on human arylamidases, II.

L-Alanine-4-nitroanilide is the optimal substrate for the kinetic determination of arylamidase. L-leucine-4-nitroanilide shows an equally rapid rate of conversion, but it is also subject to interfering hydrolysis by aminopeptidase (cytosol). With the exception of N-acetyl-L-alanine-4-nitroanilide, N-substituted amino acid arylamides are not hydrolyzed; this compound is hydrolyzed by a peptidase, which is present in all the tissues checked, but absent from serum and urine, even in patients with diseases of the liver and biliary tract. Other amino acid nitroanilides are hydrolyzed slowly and uniformly, and there is no selective hydrolysis of arylamides by different tissues.

Die mangelnde Übereinstimmung von Arylamidase-Pherogrammen des Serums mit denen der Homogenate aus menschlichen Organen (1) führte zu der Frage, ob durch den Einsatz verschiedener Aminosäure-nitroanilide eine organspezifische Bestimmung der mikrosomalen Arylamidase ( $\alpha$ -Aminoacylpeptidhydrolase, EC 3.4.11.2) möglich und die Herkunft dieser Aktivität im Serum zu bestimmen sei. Die Untersuchung dieses Problems wird in der folgenden Mitteilung beschrieben.

### Material und Methoden

Gewinnung und Aufarbeitung der untersuchten Proben entsprachen denen der I. Mitteilung (1). Seren für Zusätze zu Organextrakten entstammten gesunden Personen, desgleichen 10 Harnproben, die nach Dialyse getestet wurden.

### Reagenzien<sup>3)</sup>

Außer den zur Disk-Elektrophorese benutzten Substanzen (1) bezogen wir Sephadex G-200 und Blue Dextran 2000 von Pharmacia (Uppsala, Schweden), Humanalbumin von den

Behringwerken (Marburg), Puromycin von Serva (Heidelberg), Elastase und Neuraminidase von Boehringer (Mannheim), Carboxypeptidase A von Sigma (St. Louis, USA) und alle anderen Reagenzien einschließlich der Enzyme in bestmöglicher Qualität von E. Merck (Darmstadt).

Einige Nitroanilide stellten wir nach den folgenden Angaben her und prüften die Blockierung der Aminogruppen durch fehlende Reaktion mit *p*-Benzochinon (2).

*N*-Benzoyl-*D*, *L*-alanin-4-nitroanilid aus *N*-Benzoyl-*D*, *L*-alanin und 4-Nitroanilin nach Belleau & Malek (3): Ausbeute 30 % d. Th., Fp. 220° (aus Äthylacetat).

C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (313,3) Massefraktionen  
Ber. C 0,6134 H 0,0483 N 0,1341  
Gef. C 0,6110 H 0,0495 N 0,1315

*N*-Benzoylglycin-4-nitroanilid aus Hippursäure und 4-Nitroanilin nach I. c. (3): Ausbeute 57 % d. Th., Fp. 226–227° (aus Tetrahydrofuran).

C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (299,3) Massefraktionen  
Ber. C 0,6020 H 0,0439 N 0,1404  
Gef. C 0,5980 H 0,0445 N 0,1385

*N*-Benzoylglycin-2-nitroanilid entsprechend I. c. (3): Ausbeute 35 % d. Th., Fp. 180–181° (aus Diäthyläther/Äthanol).

Gef. C 0,5970 H 0,0445 N 0,1395

*N*-Acetyl-*L*-prolin-4-nitroanilid aus *L*-Prolin-4-nitroanilid · HCl mit Essigsäureanhydrid und Pyridin in Methanol: Ausbeute 65 % d. Th., Fp. 185–186° (aus Chloroform).

### Lösungen

Tris-Salzsäure 50 mmol/l, pH 7,5

Dieser Puffer diente zur Gelfiltration, zur Prüfung von Enzymstabilität und -polymerbildung, zur Elution der Polyacrylamid-

<sup>1)</sup> Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

<sup>2)</sup> Die Arbeit enthält wesentliche Teile der Inauguraldissertation von S. Petersen.

<sup>3)</sup> Verwendete Abkürzungen:

AcAla-4NA = N-Acetyl-L-alanin-4-nitroanilid  
Ala-4NA = L-Alanin-4-nitroanilid entsprechend andere Nitroanilide  
DCHCD = Dicyclohexylcarbodiimid  
DMF = Dimethylformamid  
DMSO = Dimethylsulfoxid

gelsegmente und zum kinetischen Test. Die Substrate wurden, evtl. unter einem Zusatz von 125–250 mmol/l DMSO, der die Aktivität nicht beeinflusste, darin gelöst. Daneben prüften wir die Hydrolyse von 2 mmol/l Ala-4NA, entsprechend den Bedingungen der optimierten Bestimmung im Serum (III. Mitteilung<sup>4</sup>) in 50 mmol/l Tris-Salzsäure pH 7,8.

#### Geräte

Zur Differentialzentrifugation benutzten wir das Modell Omikron II (Christ, Osterode), zur Gelfiltration ein Chromatographierohr K 9/30 (Pharmacia, Uppsala), das mit Sephadex G-200 in Trispuffer äquilibriert, ein Ausschlußvolumen von 16 ml (ermittelt mit Blue Dextran 2000) besaß. Die übrigen Apparaturen entsprachen denen der I. Mitteilung (1).

#### Methoden

**Aktivitätsbestimmung** im kinetischen Test:

3,2 ml Substratpuffer mit 50  $\mu$ l Probe in der 1 cm-Küvette (25°C) mischen und die Extinktionszunahme bei 405 nm am Kompensationsschreiber mit der Einstellung  $E_0 - E_{1,0} = 20$  cm registrieren. Je nach Aktivität der Probe wählt man die Geschwindigkeit  $v$  zwischen 0,2 und 2,0 cm/min. Die Berechnung erfolgt mittels  $tg \alpha$  des Steigungswinkels von  $\Delta E$  zur Zeitgeraden nach  $U/l = tg \alpha \cdot 328 \cdot v$ .

Bei der Prüfung von Effektoren und der protektiven Wirkung von Protein enthielt der Substratpuffer diese Substanzen in einer Konzentration, welche bei der Angabe der Reaktionsbedingungen die Verdünnung durch das Probevolumen berücksichtigte.

Zum Test auf Stabilität und Polymerbildung wurden 17 000 g- und 100 000 g-Überstände allein und nach Verdünnung mit 4 Teilen Trispuffer oder Serum bis zu 6 Tagen bei 0°C inkubiert. Sofort, nach 1 d, 3 d und 5 d entnommene Aliquots wurden dabei wie folgt untersucht:

- Kinetischer Test ohne Probenvorbehandlung
- Kinetischer Test im Überstand nach Zentrifugation mit 100 000 g  $\times$  60 min.
- Gelchromatographie: 0,9 ml Probe wurden mit 0,1 ml Saccharose (400 g/l) gemischt und auf der Säule (Höhe 300 mm, Durchmesser 9 mm) mit Trispuffer ( $v = 3$  ml/h) entwickelt. Die Fraktionen von jeweils 0,8 ml (25 Tropfen) wurden mit dem gleichen Volumen 10 mmol/l Ala-4NA 15 bis 30 min bei 25°C inkubiert und nach Zugabe von 0,2 bis 1,0 ml 100 mmol/l Salzsäure bei 405 nm photometriert.
- Disk-Elektrophorese: Die Lokalisation wurde mittels Segmentierung der Gele nach der Trennung vorgenommen (1).

Wir bestimmten das Hämoglobin als Hämoglobin-Cyanid und den Proteingehalt mittels Biuret-Reaktion (beide nach I.c. (4)). Bei letzterer erwärmen wir alle Proben zuvor im zehnfachen Volumen Kalilauge (5 mol/l) 10 Minuten auf 40°C, um auch Strukturproteine zu lösen.

#### Ergebnisse und Diskussion

##### Arylamidase und Peptidase

Beim Aufschluß von Organen mit Triton X-100 fanden wir die höchste spezifische Aktivität in Jejunalmucosa, Niere und Prostata, weniger in Pankreas, Milz und Leber (Tab. 1). Diese Verteilung und der Umsatz der getesteten Nitroanilide ähnelten den von Rehfeld et al. (5) mit *L*-Alaninnaphthyl-(2)-amid erhobenen Befunden und nicht den Angaben von Smith et al. (6) über Naphthylamidase in der menschlichen Leber. Mit Ausnahme von Knochen und Erythrocyten lag die *L*-Leucin-4-nitroanilid-Spaltung über der von Ala-4NA. Alle anderen Substrate wurden weitaus langsamer umgesetzt, ein organotypisches Muster bezüglich der Reihenfolge ihrer enzymatischen Spaltungsgeschwindigkeit war nicht zu erkennen. Die Beobachtung

<sup>4</sup>) diese Z. 13, 49–52 (1975), nachstehend.

gen von Pfeleiderer et al. (7) über die Konstanz der relativen Umsätze von *L*-Leucin-4-nitroanilid und Ala-4NA durch gereinigte Ribosomenfraktionen aus Rattennieren ließen sich somit auf verschiedene Nitroanilide und mehrere menschliche Gewebe ausdehnen. Die Poolseren ähnelten keiner anderen Probe, vor allem übertraf die Ala-4NA-Hydrolyse immer die Spaltung des Leucin-Analogen, so daß die Herkunft ihrer Aktivität nicht zu ermitteln war. Daher gab auch die Bestimmung der Arylamidase mit verschiedenen Substraten bei 185 Patienten keinen Hinweis auf das erkrankte Organ.

Benzoylglycin-2-nitroanilid, -4-nitroanilid und Benzoylalanin-4-nitroanilid (jeweils 1 mmol/l bei Gegenwart von 250 mmol/l DMSO) wurden von keinem Organextrakt oder Serum angegriffen. Indessen übertraf der Umsatz von AcAla-4NA die Spaltung von Ala-4NA in den meisten Geweben beträchtlich (Tab. 1). Dies galt auch für Hämolysate und bioptisch erhaltenes Lebergewebe, so daß postmortale Artefakte ausgeschlossen wurden. Da Acetyl-*L*-alanin nicht hydrolysiert wurde (gemessen nach I.c. (2)), erschien eine gleichzeitige Einwirkung von Acylase unwahrscheinlich. Im übrigen wurde keines der N-substituierten Aminosäure-nitroanilide durch Amino-peptidase (cytosol, EC 3.4.11.1), Trypsin (3.4.21.4), Chymotrypsin (3.4.21.1; außer N-Acetyl-*L*-tyrosin-4-nitroanilid), Carboxypeptidase A (3.4.12.2) und B (3.4.12.3), Elastase (3.4.21.11), Pro-nase E (3.4.24.4) oder Neuraminidase (3.2.1.18) gespalten. Auch von Arylamidasen unterschied sich die AcAla-4NA hydrolysierende Aktivität in folgenden Eigenschaften:

- Im Leberextrakt trat durch Zusatz von 50  $\mu$ mol/l  $Co^{2+}$  keine Aktivierung (Ala-4NA 135–140%), durch 2 mmol/l 2-Mercaptoethanol keine Hemmung (Ala-4NA 62–68%) gegenüber dem Kontrollansatz ein.
- Stärkere Inaktivierung durch Disk-Elektrophorese bei pH 8,3 und durch Zusatz von Serum, besonders bei der Inkubation von 100 000 g-Überständen (Tab. 2).
- Minimale Aktivität in Seren und Urinen bei hohen Gewebekonzentrationen.
- Vergleichsweise höhere Aktivitäten in 100 000 g-Überständen als Indiz einer anderen Kompartimentierung (vorbehaltlich postmortaler Autolyseartefakte) in der Zelle (Tab. 3).

Das Enzym (aus Hämolysaten) zeigte einen Aktivitätsbereich von pH 6,0–9,0 mit dem Optimum bei pH 7,9,  $K_m$  0,40 mmol/l und  $V$  ohne Überschüßhemmung ab 2,5 mmol/l AcAla-4NA, und es stimmte mit der Arylamidase in folgenden Punkten überein:

- Gleiche Stabilität in Trispuffer (Tab. 2).
- Identische Lokalisation der multiplen Formen bei der Disk-Elektrophorese (s. I. Mitteilung, (1)) und bei der Gelfiltration einheitliche Aktivität mit dem retardierten Elutionsvolumen von 21,4–21,6 ml.

Tab. 1. Arylamidaseaktivität in partikelfreien Überständen (60 min × 100 000 g), Poolserum und Hämolyt. Angabe in U/g Biuret-Protein, U/l Serum oder U/g Hämoglobin; Mittelwerte ± 2 Standardabweichungen aus jeweils 5 Proben. \* Zusatz von 250 mmol/l DMSO, φ keine Hydrolyse.

Substrat	Konzentration mmol/l	Leber	Lebermetastasen	Jejunum-mucosa	Pankreas	Lunge	Niere	Prostata
4-Nitroanilid von L-Alanin	5	8,2 ± 2,3	8,7 ± 3,1	68 ± 18	8,1 ± 2,2	3,9 ± 1,2	82 ± 33	41 ± 12
	2	8,0 ± 2,2	7,7 ± 2,0	65 ± 17	9,8 ± 2,5	3,3 ± 1,1	84 ± 32	40 ± 12
L-Leucin	4	9,5 ± 2,9	10 ± 3,8	72 ± 19	21 ± 4,9	4,0 ± 1,4	100 ± 35	48 ± 16
L-Prolin	25	3,3 ± 0,8	3,1 ± 1,1	36 ± 10	5,8 ± 1,3	1,3 ± 0,3	15 ± 7	11 ± 4,2
L-Lysin	5	5,3 ± 1,1	4,3 ± 1,2	21 ± 8	6,5 ± 1,5	2,2 ± 0,7	13 ± 5,5	18 ± 5,1
L-Glutaminsäure	5	1,5 ± 0,5	1,4 ± 0,3	18 ± 6	1,1 ± 0,2	0,9 ± 0,2	6,1 ± 3,0	1,5 ± 0,5
Glycin	1*	1,5 ± 0,4	0,9 ± 0,2	7,2 ± 2,8	1,6 ± 0,2	0,8 ± 0,4	5,5 ± 2,8	4,2 ± 1,3
L-Tyrosin	1*	0,6 ± 0,2	1,1 ± 0,5	8,5 ± 3,0	2,8 ± 1,0	0,6 ± 0,2	10 ± 4,6	7,0 ± 2,1
L-Phenylalanin	1*	0,8 ± 0,2	1,1 ± 0,2	3,6 ± 1,1	1,4 ± 0,5	0,5 ± 0,1	3,1 ± 1,2	2,2 ± 1,0
N-Acetyl-L-alanin	5	37 ± 11	23 ± 5,5	97 ± 28	18 ± 5,1	11 ± 3,5	35 ± 10	22 ± 5,3
N-Acetyl-L-tyrosin	1*	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	1,5 ± 0,4	9,8 ± 2,6	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1
N-Acetyl-L-prolin	5*	0,2 ± 0,1	0,5 ± 0,2	1,6 ± 0,5	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,6 ± 0,2

  

Substrat	Konzentration mmol/l	Knochen	Herz	Hirn	Milz	Leuko-cyten	Erythro-cyten	Poolserum (erhöhte Akt.)
4-Nitroanilid von L-Alanin	5	1,9 ± 0,5	2,1 ± 0,8	1,9 ± 0,5	9,0 ± 2,7	1,5 ± 0,8	0,6 ± 0,2	28 ± 8
	2	2,0 ± 0,5	2,0 ± 0,8	1,7 ± 0,3	9,8 ± 2,9	2,9 ± 0,8	0,5 ± 0,2	30 ± 8
L-Leucin	4	1,8 ± 0,5	3,4 ± 0,9	0,5 ± 0,2	16 ± 3,9	3,0 ± 1,1	0,3 ± 0,1	26 ± 6,0
L-Prolin	25	1,4 ± 0,3	2,0 ± 0,7	0,4 ± 0,2	4,8 ± 1,2	1,3 ± 0,4	1,9 ± 0,5	16 ± 4,1
L-Lysin	5	1,3 ± 0,3	3,7 ± 1,0	2,8 ± 1,0	11 ± 3,1	2,0 ± 0,6	0,6 ± 0,2	6,0 ± 2,3
L-Glutaminsäure	5	0,4 ± 0,2	0,7 ± 0,4	0,8 ± 0,3	2,2 ± 0,7	0,4 ± 0,2	0,1 ± 0,05	4,9 ± 1,7
Glycin	1*	0,2 ± 0,1	0,7 ± 0,4	φ	0,7 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	4,8 ± 1,6
L-Tyrosin	1*	0,1 ± 0,05	φ	φ	0,8 ± 0,3	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,05	3,8 ± 1,5
L-Phenylalanin	1*	0,2 ± 0,1	φ	φ	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	7,8 ± 2,6
N-Acetyl-L-alanin	5	6,0 ± 1,5	3,5 ± 0,9	21 ± 6,6	23 ± 6,0	8,1 ± 3,0	16,2 ± 3,5	0,5 ± 0,3
N-Acetyl-L-tyrosin	1*	0,1 ± 0,05	φ	0,1 ± 0,05	φ	0,2 ± 0,1	φ	φ
N-Acetyl-L-prolin	5*	0,1 ± 0,05	φ	0,3 ± 0,1	φ	0,1 ± 0,05	φ	φ

3. Fehlen einer Polymerbildung (unverändertes Verhalten beider Enzyme in Disk-Elektrophorese, Zentrifugation und Gelfiltration nach verschiedenen Inkubationszeiten und -bedingungen).

4. Gleichartige Verminderung der anodischen Beweglichkeit durch Behandlung mit Neuraminidase.

Da mikrosomale Arylamidasen nur Oligopeptide mit freier α-Aminogruppe hydrolysieren (8, 9), könnte es sich bei der beschriebenen Aktivität um eine neutrale Peptidase handeln. Die Existenz einer lysosomalen Arylamidase, die in Rattenleber und -niere gefunden wurde (10), welche N-geschützte Arylamide umsetzt, aber durch Co<sup>2+</sup> gehemmt und durch Thiole aktiviert wird, war weniger wahrscheinlich. Die Aktivität mikrosomaler Arylamidasen wird durch Co<sup>2+</sup> entgegen *Rehfeld et al.* (11) gesteigert (12,13,14,15).

#### Substratspezifität

Die gegenüber Ala-4NA erhöhte Hydrolyse von L-Leucin-4-nitroanilid durch Gewebsextrakte (Tab. 1) deutete auf die Gegenwart von Aminopeptidase (cytosol), die nach *Fleisher et al.* (12) bei Lebererkrankungen auch im Serum erscheint. Tatsächlich spaltete gereinigtes Enzym (EC 3.4.11.1) mit einer Aktivität von 2000 U/l gegenüber L-Leucinamid trotz des vom Optimum abweichenden Wertes von pH 7,5 L-Leucin-4-nitroanilid 22 mal schneller als Ala-4NA: L-Leucin-4-nitroanilid (4 mmol/l) 60 U/l, Ala-4NA (5 mmol/l) 2,7 U/l, L-Prolin-4-nitroanilid

Tab. 2. Relative Inaktivierung von Arylamidase (Ala-4NA 5 mmol/l) und Peptidase (AcAlaNA 5 mmol/l) durch Inkubation von 100 000 g- (obere Zahlen) und 17 000 g-Überständen in Trispuffer und Serum bei 0°C. Ausgangsaktivität (0 d) = 100.

	Leber		Niere		Pankreas		Milz	
	1 d	5 d	1 d	5 d	1 d	5 d	1 d	5 d
Arylamidase								
Tris	100	100	100	65	90	60	100	42
	88	58	96	85	92	53	100	38
Serum	100	68	100	60	96	57	100	53
	95	51	100	57	91	62	100	65
Peptidase								
Tris	96	61	88	60	83	56	70	60
	90	63	85	47	70	51	75	65
Serum	90	25	92	7	90	16	95	15
	86	32	96	10	95	37	100	30

Tab. 3. Relative Verteilung von Arylamidase (Ala-4NA 5 mmol/l) und Peptidase (AcAla-4NA 5 mmol/l) bei der Differentialzentrifugation von Organhomogenaten (Ausgangsaktivität = 100) und Test im Überstand.

	Leber	Niere	Pankreas	Milz
Arylamidase				
17 000 g × 15 min	54	56	96	69
100 000 g × 60 min	24	35	52	42
Peptidase				
17 000 g × 15 min	84	87	100	75
100 000 g × 60 min	69	75	93	53

(25 mmol/l) 10,2 U/l. Die Anwesenheit von Aminopeptidase im Serum neben Arylamidase konnte bereits von *Schlaeger* (16) durch parallele Messungen mit *L*-Leucin-4-nitroanilid und Ala-4NA nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zu Aminopeptidasen werden Arylamidasen durch 1 mmol/l Puromycin (13) und durch 50 mmol/l *L*-Aminosäuren (12) stark gehemmt. Erwartungsgemäß entsprach auch hier der Umsatz von Ala-4NA mehr den erwarteten Eigenschaften als die Reaktion mit *L*-Leucin-4-nitroanilid (Tab. 4), deren geringe Inhibition aus der Miterfassung von Aminopeptidase resultierte. Ein Humanalbumingehalt von 50 g/l im Organextrakt beeinflusste diese Ergebnisse nicht.

Die Resistenz von Arylamidasen gegen den Einfluß von Alkoholen (13) bestätigte sich bei der ungehemmten Hydrolyse von *L*-Alanin-, *L*-Leucin- und *L*-Prolin-4-nitroanilid durch Poolseren und Extrakte von Leber, Jejunum, Niere, Pankreas, Leukocyten und Milz in Gegenwart von 1 mol/l Methanol und 1 mol/l Äthanol. Während 0,25 mol/l DMSO und 0,125 mol/l DMF keinen Effekt zeigten, hemmte 1 mol/l Dioxan die Ausgangsaktivität um 30 % (Pankreas) bis 70 % (Milz).

Tab. 4. Hemmung der Arylamidase durch 1 mmol/l Puromycin und 50 mmol/l Aminosäuren. Inhibitorfreie Kontrolle = 100. Test im 17 000  $\mu$ -Überstand.

	Leber	Niere	Jejunum	Serum
<i>L</i> -Alanin-4-nitroanilid (5 mmol/l)				
<i>L</i> -Cystein	0,8	2,1	0,1	4,1
<i>L</i> -Methionin	3,1	4,5	5,8	1,6
$\beta$ -Alanin	2,2	6,0	14,6	2,5
Puromycin	17,4	17,6	20,8	21,2
<i>L</i> -Leucin-4-nitroanilid (4 mmol/l)				
<i>L</i> -Cystein	31	46	55	32
<i>L</i> -Methionin	16	13	65	14
$\beta$ -Alanin	48	41	66	52
Puromycin	38	39	47	48

### Danksagung

Frl. *Barbara Flatter* danken wir für ihre ausgezeichnete Mitarbeit an diesen Untersuchungen.

### Literatur

- Lorentz, K., Marunowski, A. & Ritter, U. (1974), diese Z. 12, 468–473.
- Lorentz, K., Flatter, B. & Mutschler, B. (1970), *Fresenius' Z. Anal. Chem.* 252, 218–221.
- Belleau, B. & Malek, G. (1968), *J. Amer. Chem. Soc.* 90, 1651–1652.
- Richterich, R. (1971), *Klinische Chemie, Theorie und Praxis*, 3. Aufl., S. 305–309 u. 380–382, Verlag S. Karger, Basel.
- Rehfeld, N., Peters, J. E., Giesecke, H., Beier, L. & Haschen, R. J. (1967), *Acta Biol. Med. Ger.* 19, 809–818.
- Smith, E. E., Kaufman, J. T. & Rutenberg, A. M. (1965), *J. Biol. Chem.* 240, 1718–1729.
- Pfleiderer, G., Celliers, P. G., Stanulović, M., Wachsmuth, E. D., Determann, H. & Braunitzer, G. (1964), *Biochem. Z.* 340, 552–564.
- Little, G. H. & Behal, F. J. (1971), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 136, 954–957.
- Delange, R. J. & Smith, E. L. (1971), in *The Enzymes* (Boyer, P. D., Hrsg.) 3. Aufl., Bd. 3, 81–118, Verlag Academic Press, New York & London.
- Mahadevan, S. & Tappel, A. L. (1967), *J. Biol. Chem.* 242, 2369–2374.
- Rehfeld, N., Peters, J. E., Giesecke, H. & Haschen, R. J. (1967), *Acta Biol. Med. Ger.* 19, 819–830.
- Fleisher, G. A., Pankow, M. & Warmka, C. (1964), *Clin. Chim. Acta* 9, 259–268.
- Behal, F. J., Asserson, B., Dawson, F. & Hardman, J. (1965), *Arch. Biochem. Biophys.* 111, 335–344.
- Behal, F. J., Little, G. H. & Klein, R. A. (1969), *Biochim. Biophys. Acta* 178, 118–127.
- Behal, F. J. & Story, M. N. (1969), *Arch. Biochem. Biophys.* 131, 74–82.
- Schlaeger, R. (1973), diese Z. 11, 326–328.

Prof. Dr. Klaus Lorentz  
I. Med. Klinik der Med. Hochschule  
24 Lübeck  
Kronsfordter Allee 71/73