Versuche zur Lokalisierung und Abgrenzung verschiedener Aminosäure-Arylamidasen in Uterus und Blastozyste des Kaninchens

Von H.-W. Denker und R. Stangl
(Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg i. Br.,
und Anatomisches Institut der Universität Freiburg i. Br.)

Mit 2 Abbildungen und einer Tabelle im Text

Nachdem Aminosäure-β-naphthylamide (AsNA) als Substrate in die Biochemie und Histochemie durch Gomori (1954), Folk und Burstone (1955) und Burstone und Folk (1956) eingeführt worden waren, wurden sie in der Folgezeit in zahlreichen histochemischen Untersuchungen verwendet in der Absicht, damit Aminopeptidasen, und speziell mit Leucin-β-naphthylamid (LeuNA) *Leucinaminopeptidase* (LAP) nachzuweisen. Biochemische Untersuchungen haben nun in den letzten Jahren immer häufiger gezeigt, daß eine ganze Reihe verschiedener Enzyme existiert, die *Arylamid*-Substrate (AsNA, Aminosäure-p-nitroanilide u. ä.) spalten können (vgl. z. B. Sylvén und Bois 1962, Hanson et al. 1963, Sylvén und Snellman 1968). Für eine Klasse dieser Enzyme ist es sogar typisch, daß sie derartige Substrate bevorzugt umsetzen, dagegen kaum andere bekannte Substrate wie das für LAP spezifische Leucinamid. Sie werden daher in der biochemischen Literatur heute meist als *Aminosäure-Arylamidasen* (kurz: *Arylamidasen*), manchmal auch als Naphthylamidasen bezeichnet (vgl. z. B. Nagel et al. 1964, Smith et al. 1965, Behal et al. 1969; zur Übersicht s. auch Bergmeyer 1970, Pearse 1972). Arylamidasen lassen sich elektrophoretisch und chromatographisch von LAP trennen und unterscheiden sich auch in anderen biochemischen Charakteristika von LAP: pH-Optimum (um pH 7, gegenüber pH 9–10 bei LAP), Aktivatoren (häufig Co^{++}, demgegenüber Mn^{++} bei LAP) und Inhibitoren (Behal et al. 1963, 1964, 1965, Hanson et al. 1963, 1967, Patterson et al. 1963, 1965, Krisch 1963, Nakagawa und Tsuji 1964, Rehfeld et al. 1967, Felicetti et al. 1971). An ihrer Reinigung und weitergehenden Charakterisierung wird noch in verschiedenen Forschergruppen gearbeitet (vgl. Literaturzusammenstellung zur Substratspezifität, s. Diskussion).

Für die Spaltung von LeuNA im histochemischen „LAP"-Test nach Burstone und Folk (1956) bzw. Nachlas et al. (1957) ist wahrscheinlich in vielen, wenn nicht den meisten Fällen nicht LAP, sondern eine Arylamidase verantwortlich (Sylvén und Bois 1962, 1963, Hanson et al. 1963, Pearse 1972), obwohl auch LAP LeuNA und ähnliche Arylamide spalten kann (Fittkau et al. 1960, Sylvén und Bois 1962, Hanson et al. 1965). Es erscheint daher zweckmäßig, eine mit diesen Substraten erzeugte histochemische „LAP"-Reaktion zunächst und bis zum Beweis des Gegenteils als Arylamidase-Reaktion zu beschreiben. Zur genaueren Einstufung sollten biochemische und immunologische (vgl. z. B. Wachsmuth 1968) Methoden mit herangezogen werden.

In Schleimhaut und Sekret des Uterus findet sich beim Kaninchen in der Präimplantationsphase eine sehr hohe LeuNA-spaltende Enzymaktivität (Denker 1969). Biochemische Untersuchungen haben gezeigt, daß dies nicht auf LAP, sondern auf eine Arylamidase-Aktivität zurückgeht (van Hoorn, in Vorbereitung). Dabei kam

XVII. Sympos. Ges.f.Histochemie, Bozen 1974
Acta histochem. (Jena) Suppl. XVI (1976)

auch der Verdacht auf, daß hier mehrere Arylamidasen nebeneinander vorkommen.

Wir haben daraufhin mit histochemischen Methoden ein Screening durchgeführt, um einen ersten Eindruck zu gewinnen, ob sich und ggf. wo sich in Uterus und Blastozyste des Kaninchens tatsächlich mehrere verschiedene Arylamidasen nachweisen lassen. Als Substrate verwendeten wir eine Serie von β-Naphthylamiden verschiedener Aminosäuren, ferner variierten wir pH und Art des Diazoniumsalzes und testeten den Effekt einiger Aktivatoren. Wir wollten wissen, ob dieses Vorgehen als Vorbereitung im Sinne eines Suchtests für anzuschließende gezielte biochemische Untersuchungen geeignet ist. In einer begrenzten Serie von Versuchen wurde ferner die Schärfe der Lokalisation verglichen, die mit Nativschnitten bzw. Gefriersubstitution und mit Methoxysubstrat bzw. Membranmethode zu erreichen ist.

Material und Methodik

Kaninchen-Uteri mit Blastozysten wurden 5 bzw. 7 Tage post coitum (d p.c.) gewonnen. Dazu wurden die Tiere durch Genickschlag und Ausbluten getötet; die Uteri wurden schnell entnommen, in 1–2 cm lange Abschnitte zerteilt und mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Am Kryostaten wurden 14-μm-Nativschnitte hergestellt.

In der *Standardprozedur* wurden die Schnitte durch Antauen auf Objektträgern montiert und in folgendem an Nachlas et al. (1957) angelehntem Inkubationsmedium 1 Stunde bei 37 °C inkubiert: Aminosäure-β-naphthylamid 8 mg, gelöst in 1 ml H_2O (bei als Hydrochlorid vorliegenden Substraten) oder zunächst in einigen Tropfen N,N-Dimenthylformamid; Veronal-Acetat-Puffer nach Michaelis pH 6,5 bzw. 7,5 10 ml; 0,9% NaCl-Lösung 8 ml; unmittelbar vor Gebrauch 10 mg Diazoniumsalz zugegeben. Als Diazoniumsalz wurden verwendet: 1. Fast Blue B salt · $ZnCl_2$ (FBB) (Serva Nr. 21270); 2. Fast Garnet GBC · $ZnCl_2$, C. I. 37210 (FGGBC) (Serva Nr. 21290). Bei Verwendung von FBB wurde nach der Inkubation wie in der Methode von Nachlas et al. (1957) ausgewaschen und das Kupferchelat gebildet, anschließend mit $CuSO_4$-haltiger Glycerin-Gelatine eingeschlossen. Im Fall von FGGBC entfiel die Cu-Behandlung, und eingeschlossen wurde mit Gummi arabicum nach Highman-Apáthy (s. Lillie 1965, S. 101).

Getestete Substrate: L-Alanin-β-naphthylamid (AlaNA) (Serva Nr. 11532), L-Arginin-β-naphthylamid · HCl (ArgNA) (Serva Nr. 13966), α-L-Asparaginsäure-β-naphthylamid (α-AspNA) (Serva Nr. 14185), α-L-Glutaminsäure-β-naphthylamid (α-GluNA) (Serva Nr. 23105), Glycin-β-naphthylamid · HCl (GlyNA) (Serva Nr. 23490), L-Leucin-β-naphthylamid · HCl (LeuNA) (Serva Nr. 27730), L-Lysin-β-naphthylamid · HCl (LysNA) (Serva Nr. 28255), L-Phenylalanin-β-naphthylamid (PheNA) (Serva Nr. 32235), L-Tryptophan-β-naphthylamid (TrpNA) (Serva Nr. 37445), L-Tyrosin-β-naphthylamid (TyrNA) (Serva-Nr. 37645).

Folgende *spezielle Verfahren* wurden geprüft hinsichtlich ihres Einflusses auf die *Schärfe der Lokalisation:*

a) Ersatz von LeuNA durch L-Leucin-4-methoxy-β-naphthylamid (Leumethoxy-NA) (· HCl, Serva Nr. 27727), sonst Standardprozedur;

b) Schnitt-Gefriersubstitution nach Glenner (1962), danach Standardprozedur;

c) Membranmethode (in Anlehnung an Meijer 1972) unter Verwendung von Visking (Union Carbide) Dialysierschlauch Type 36/32 (Serva Nr. 44120), mittlerer Porenradius 24 Å, und einem Agarose-Gel mit Konzentrationen an Substrat usw. wie in der Standardprozedur verwendet.

Mit ArgNA wurden Versuche zur *Aktivierung* durch Cl^- durchgeführt (Phosphatpuffer; weitere Details s. Mäkinen und Paunio 1972).

Ergebnisse

Die beim *Substratvergleich* mit der Standardmethode erzielten Ergebnisse sind für das Stadium 7 d p. c. in Tabelle 1 zusammengefaßt. Die Resultate waren bei beiden getesteten pH-Werten (6,5 und 7,5) recht ähnlich und werden daher nicht getrennt aufgeführt.

Tabelle 1
Vergleich der Spaltung von β-Naphthylamiden verschiedener Aminosäuren; Standardmethode (Kaninchen, 7 d p.c.)

Substrate	Ergebnisse							
	Myometrium		Gefäße		Uterusepithel		Trophoblast	
	FGGBC	FBB	FGGBC	FBB	FGGBC	FBB	FGGBC	FBB
PheNA	+	+	++	++	+++	+++	+	(+)
TyrNA	+	+	++	+	+++	+++	+	+
TrpNA	+	(+)	+	(+)	++	++	+	+
LeuNA	+	+	++	+	++	++	++	+
GlyNA	++	+	+++	++	++	+++	++	+
AlaNA	+++	+++	+++	++	++	++	++	+
ArgNA	++++	++	+++	+	+++	++	+	++
LysNA	++++	++	+++	+	++	++	+	(+)
α-GluNA	+++	+++	+	+	(+)	(+)	+++	+
α-AspNA	+++	(+)	+	(+)	+	(+)	+	(+)

Wenn die Reaktion innerhalb eines Gewebes von Ort zu Ort wechselt, so ist nur die stärkste beobachtete Reaktion angegeben. Die Werte für Uterusgewebe beziehen sich nur auf die Implantationsstelle, nicht auf Uterusabschnitte zwischen Blastozysten.

In einigen Fällen bringen die zwei Diazoniumsalze FBB und FGGBC unterschiedliche Ergebnisse (ArgNA und LysNA: Myometrium, Gefäße; AspNA: Myometrium; α-GluNA und α-AspNA: Trophoblast).

Hinsichtlich der beobachteten Verteilungsmuster ist eine gewisse Gruppierung der Substrate möglich (s. Diskussion). Im Endometrium ist dies nur 7 d p.c. deutlich, nicht 5 d. 5 d ist die Reaktion hier extrem stark und schlägt wahrscheinlich daher bei allen Substraten durch.

Versuche zur Verbesserung der *Schärfe der Reaktion* wurden, unter Anwendung der „speziellen Verfahren", vorwiegend mit LeuNA und Leu-methoxy-NA durchgeführt. Das Standardverfahren mit LeuNA ergibt vor allem im Endometrium ein verwaschenes Bild mit einer Ausdehnung der Reaktion vom Uterusepithel bis ins Stroma hinein. Die Verwendung von Leu-methoxy-NA bewirkt eine weitergehende Beschränkung der Reaktion auf das Uterusepithel, 5 d p. c. apikal, und auf einzelne Bindegewebszellnester. Dennoch ist bei Verwendung von Nativschnitten eine Verschmierung nicht ganz zu vermeiden. Die Anwendung der Gefriersubstitution führt zu einer deutlichen Verbesserung, und auch mit LeuNA ist die Lokalisation jetzt scharf (s. Abb. 1). Das Uterussekret wird bei dieser Methode im Schnitt erhalten und schwimmt nicht in das Inkubationsmedium ab. Es stellt sich in Form positiv reagierender Granula von verschiedener Größe dar.

Die Membranmethode erbringt mit LeuNA und FBB eine ähnlich unscharfe Lokalisation wie bei Verwendung eines flüssigen Inkubationsmediums, allerdings bleibt

im Gegensatz dazu Uterussekret im Schnitt identifizierbar und reagiert positiv. Mit LeuNA und FGGBC erhält man den Hauptanteil des Reaktionsproduktes im Gel, d. h. jenseits der Membran. Das Uterussekret reagiert deutlicher als alle anderen Strukturen. Die Kombination Leumethoxy-NA und FBB ergibt bei der Membranmethode die besten Resultate: Das Uterussekret bleibt am Ort liegen und reagiert

Abb. 1. Substrat: LeuNA. Schnitt-Gefriersubstitution. Endometrium, 5 d p.c. 160mal. Starke Reaktion im Uterusepithel, apikal.

deutlich positiv, im Gewebe ist die Reaktion scharf auf das Uterusepithel (5 d apikal) und einige Bindegewebszellnester beschränkt.

Eine Aktivierung durch Cl^- (Substrat: ArgNA) war an allen vier in der Tabelle aufgeführten Strukturen deutlich erkennbar.

Diskussion

Arylamidasen haben in der Regel ein breites und überlappendes Substratspektrum. Dennoch ist der relative Umsatz von β-Naphthylamiden verschiedener Aminosäuren durchaus charakteristisch für einzelne Arylamidasen (vgl. Behal et al. 1964, 1969;

Brecher und Suszkiw 1969; Hanson et al. 1967; Hopsu-Havu und Mäkinen 1967; Kerwar et al. 1971; Mäkinen und Raekallio 1968, 1969; Mahadevan und Tappel 1967; Meizel und Cotham 1972; Nachlas et al. 1962; Peters et al. 1972; Rehfeld et al. 1967; Smith et al. 1965; Vanha-Perttula 1973; Wintersberger und Chatterjee 1962; Wolff und Resnik 1963). Einer Identifizierung einzelner Arylamidasen aufgrund der Sub-

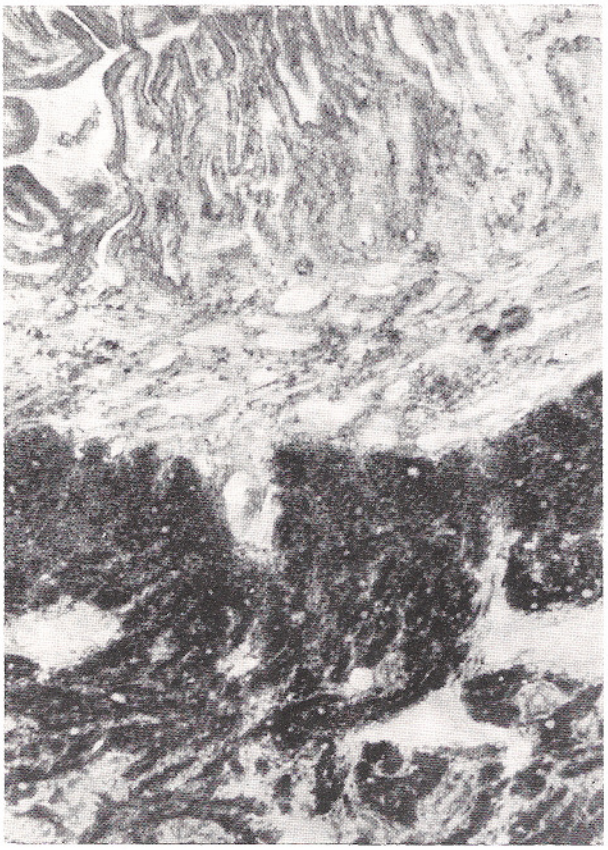

Abb. 2. Substrat: α-GluNA. Nativschnitt. Endometrium und Myometrium, 7 d p.c. 30mal. Starke Reaktion im Myometrium, dagegen das Endometrium praktisch negativ.

stratspezifität sind daher Grenzen gesetzt. Allerdings sind eine „Aminopeptidase A" mit Spezifität für α-GluNA und α-AspNA (Glenner und Folk 1961, Glenner et al. 1962, McMillan et al. 1962) und eine „Aminopeptidase B" mit ausschließlicher Spaltung von ArgNA und LysNA (und Aktivierung durch Cl^-; Hopsu et al. 1966 a u. b, Mäkinen und Paunio 1970, 1972) beschrieben.

Der histochemische Test ermöglicht die gleichzeitige Berücksichtigung zweier Kriterien: Substratspezifität und Lokalisation im Gewebe. Diese Kriterien reichen aus, um an unserem Objekt immerhin erste Hinweise auf das Vorkommen von mindestens 3 verschiedenen Arylamidasen zu erhalten:

Arylamidase 1 – typische Substrate: Naphthylamide der aromatischen Amino-

säuren (Phe, Tyr, Trp), evtl. auch LeuNA; Lokalisation: hauptsächlich im Uterusepithel, daneben in Gefäßwänden.

Arylamidase 2 – typische Substrate: Naphthylamide von Aminodicarbonsäuren (α-Glu, α-Asp); Lokalisation: hauptsächlich im Myometrium, daneben in Trophoblasten (interessanterweise ist die Aktivität hier bei α-GluNA höher als im Endometrium, s. Abb. 2). Das Enzym ist vermutlich verwandt oder identisch mit „Aminopeptidase A" (s. oben).

Arylamidase 3 – typische Substrate: GlyNA, AlaNA, ArgNA, LysNA; Lokalisation: Hervorstechend ist eine starke Reaktion der Gefäßwände. Zwar reagieren auch Uterusepithel, Myometrium und Trophoblast, aber dies könnte ebenso darauf beruhen, daß etwa die dort vorhandenen Arylamidasen 1 und 2 diese Substrate ebenfalls spalten. Hier ist eine weitere Untersuchung mit biochemischen Methoden notwendig.

Die deutliche Verstärkung der Reaktion mit ArgNA durch Cl^- würde nach Hopsu et al. (1966) und Mäkinen und Paunio (1972) anzeigen, daß in allen vier in der Tabelle aufgeführten Strukturen „Aminopeptidase B" vorkommt. Angesichts der Überlappung der Reaktionen würden wir auch diesen Schluß lieber auf eine Überprüfung mit biochemischer Methodik gründen.

Zusammenfassend stellen wir fest, daß anhand der Substratspektren und der Verteilungsmuster durchaus mit einfachen histochemischen Tests erste Informationen über Zahl und Art vorhandener Arylamidasen gewonnen werden können. Wir verstehen dieses Vorgehen als Suchtest zur Vorbereitung gezielter biochemischer Untersuchungen an jenen Strukturen, die im histochemischen Test besonders hohe Aktivität zeigen. Mit biochemischer Methodik kann die weitere Charakterisierung und Abgrenzung der Arylamidasen besser durchgeführt werden als im histochemischen Test.

Bei Verwendung von einfachen β-Naphthylamiden ist die Schnitt-Gefriersubstitution zu empfehlen. Wenn Methoxy-β-naphthylamide zur Verfügung stehen, können auch Nativschnitte verwendet werden, beim Vorkommen leicht diffusibler Enzyme (Sekrete!) unter Anwendung der Membranmethode.

Diese Untersuchungen wurden zum Teil durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt (De 181/3).

Summary

Distribution patterns of amino acid arylamidases have been studied in rabbit uterus and implantation stage blastocysts using a simultaneous coupling technique. A series of β-naphthylamides (NAs) of various amino acids were used as substrates. Tests were performed at p H 6.5 and 7.5 using both Fast Blue B and Fast Garnet GBC as diazonium salts. Despite limited substrate specificity known in arylamidases, this procedure proved to be sufficient to give some evidence for the presence in uterus and blastocyst of at least three different arylamidases. NAs of aromatic amino acids (Phe, Tyr, Trp) are hydrolyzed predominantly by an enzyme showing maximum activity in uterine epithelium and in walls of blood vessels. An amino dicarbonic acid (α-Glu, α-Asp) NAs splitting arylamidase, possibly related to „aminopeptidase A", seems to be localized more specifically in myometrium and trophoblast. When NAs of basic (Arg, Lys) or certain other (Gly, Ala) amino acids were used, a strong reaction was obtained in myometrium, uterine epithelium, blood vessels and trophoblast as well. The observed patterns of distribution did not give evidence for the existence of an enzyme splitting exclusively Arg-βNa and Lys-βNA („aminopeptidase B") although the activation by Cl^- ions did. The problem of identification of different amino acid arylamidases by histochemical means will be discussed.

For better localization, a section freeze substitution technique was found as efficient as the use of methoxy substrates. For the study of uterine secretion, either the section freeze substitution or the membrane method may be used.

Literatur

Behal, F. J., R. D. Hamilton, C. B. Kanavage and E. C. Kelly: Studies on aminopeptidases in human blood. Arch. Biochem. Biophys. **100**, 308–312 (1963).

–, –, F. B. Dawson and L. C. Terrell: A study of the activity of human plasma aminopeptidase components on dipeptides and chromogenic substrates. Arch. Biochem. Biophys. **108**, 207 up to 214 (1964).

–, B. Asserson, F. B. Dawson and J. Hardman: A study of human tissue aminopeptidase components. Arch. Biochem. Biophys. **111**, 335–344 (1965).

–, G. H. Little and R. A. Klein: Arylamidase of human liver. Biochim. Biophys. Acta **178**, 118 up to 127 (1969).

Bergmeyer, U.: Methoden der enzymatischen Analyse, Bd. 2. Weinheim/Bergstr.: Verlag Chemie, 1970.

Brecher, A. S., and J. B. Suszkiw: Brain Arylamidase. Purification and characterization of the soluble bovine enzyme. Biochem. J. **112**, 335–342 (1969).

Burstone, M. S., and J. E. Folk: Histochemical demonstration of aminopeptidase. J. Histochem. Cytochem. **4**, 217–226 (1956).

Denker, H.-W.: Zur Enzym-Topochemie von Frühentwicklung und Implantation des Kaninchens. Dissertat., Med. Fak. Marburg 1969 (s. a. Histochemie **25**, 344–360 (1971)).

Felicetti, D., C. A. Gründig und H. Hanson: Zum Verhalten von Glycyl-D-leucin und L-Leucinamid spaltenden Enzymaktivitäten in Rohhomogenaten aus menschlichen Nieren und Rattennieren auf Sephadex G 200. Acta biol. med. germ. **26**, 475–482 (1971).

Fittkau, S., D. Glässer und H. Hanson: Zur Aktivität und Spezifität der Leucinaminopeptidase in Augenlinsen. Aminosäure- und Dipeptidanilide als Substrate. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **322**, 101–111 (1960).

Folk, J. E., and M. S. Burstone: Chromogenic leucyl substrates for aminopeptidase and papain. Proc. Soc. exp. Biol. Med. (N. Y.) **89**, 473–476 (1955).

Glenner, G. G.: The preservation of peptidase activity localization using β-naphthylamide substrates. J. Histochem. Cytochem. **10**, 257–258 (1962).

– and J. E. Folk: Glutamyl peptidases in rat and guinea pig kidney slices. Nature **192**, 338–340 (1961).

– and P. J. McMillan: A mammalian peptidase specific for the hydrolysis of N-terminal α-L-glutamyl and aspartyl residues. Nature **194**, 867 (1962).

Gomori, G.: Enzymatic hydrolysis of acyl naphthylamides. Proc. Soc. exp. Biol. Med. (N. Y.) **85**, 570–572 (1954).

Hanson, H., P. Bohley und H.-G. Mannsfeldt: Zur Verwendung von L-Leucin-β-Naphthylamid als spezifisches Substrat für Bestimmungen von Leucinaminopeptidase. Clin. Chim. Acta **8**, 555–564 (1963).

–, D. Glässer und H. Kirschke: Leucinaminopeptidase aus Rinderaugenlinsen. Kristallisation, Eigenschaften und optimale Wirkungsbedingungen des Enzyms. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **340**, 107–125 (1965).

–, H.-J. Hütter, H.-G. Mannsfeldt, K. Kretschmer und Ch. Sohr: Zur Darstellung und Substratspezifität einer von der Leucinaminopeptidase unterscheidbaren Aminopeptidase aus Nierenpartikeln. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **348**, 680–688 (1967).

Hoorn, G. van: Dissertation, in Vorbereitung.

Hopsu-Havu, V. K., and K. K. Mäkinen: The hydrolysis of aminoacid naphthylamides by the human seminal aminopeptidase. Arch. klin. exp. Derm. **228**, 316–326 (1967).

–, – and G. G. Glenner: Characterization of aminopeptidase B: Substrate specificity and effector studies. Arch. Biochem. Biophys. **114**, 567–575 (1966).

–, –, –: A peptidase (aminopeptidase B) from cat and guinea pig liver selective for N-terminal arginine and lysine residues. I. Purification and substrate specificity. Acta Chem. Scand. **20**, 1225–1230 (1966).

Kerwar, S. S., H. Weissbach and G. G. Glenner: An aminopeptidase activity associated with brain ribosomes. Arch. Biochem. Biophys. **143**, 336–337 (1971).

Kolehmainen, L., and J. Mikola: Partial purification and enzymatic properties of an aminopeptidase from barley. Arch. Biochem. Biophys. **145**, 633–642 (1971).

Krisch, K.: Eigenschaften und Substratspezifität einer Esterase aus Schweinelebermikrosomen. Biochem. Z. **337**, 546–573 (1963).

Lillie, R. D.: Histopathologic technic and practical histochemistry. 3rd ed. New York: McGraw-Hill (Blakiston Divis.), 1965.

Mäkinen, K. K., and K. U. Paunio: Demonstration of aminopeptidase B in human periodontal tissues. Acta Chem. Scand. **24**, 1103–1104 (1970).

–, –: A histochemical method for the demonstration of aminopeptidase B activity. J. Histochem. Cytochem. **20**, 192–194 (1972).

– and J. Raekallio: Purification and properties of an arylaminopeptidase of rat wound tissue, acting chiefly on the 2-naphthylamides of L-methionine and L-valine. Acta Chem. Scand. **22**, 3111–3119 (1968).

–, –: Characterization of four arylaminopeptidases of rat skin. Enzymol. **36**, 93–110 (1969).

Mahadevan, S., and A. L. Tappel: Arylamidases of rat liver and kidney. J. Biol. Chem. **242**, 2369–2374 (1967).

McMillan, P. J., J. E. Folk and G. G. Glenner: The biochemical evaluation of a histochemically defined α-L-glutamyl-β-naphthylamidase (α-GNA) activity. J. Histochem. Cytochem. **10**, 675–676 (1962).

Meijer, A. E. F. H.: Semipermeable membranes for improving the histochemical demonstration of enzyme activities in tissue sections. I. Acid phosphatase. Histochem. **30**, 31–39 (1972).

Meizel, S., and J. Cotham: Partial characterization of a new bull sperm arylamidase. J. Reprod. Fert. **28**, 303–307 (1972).

Nachlas, M. M., D. T. Crawford and A. M. Seligman: The histochemical demonstration of leucine aminopeptidase. J. Histochem. Cytochem. **5**, 264–278 (1957).

–, –, –: An evaluation of aminopeptidase specificity with seven chromogenic substrates. Arch. Biochem. Biophys. **97**, 223–231 (1962).

Nagel, W., F. Willig and F. H. Schmidt: Über die Aminosäurearylamidase- (sog. Leucinaminopeptidase-) Aktivität im menschlichen Serum. Klin. Wschr. **42**, 447–449 (1964).

Nakagawa, S., and H. Tsuji: Electrophoretic separation of leucine aminopeptidase and leucyl-β-naphthylamide-splitting enzyme. Clin. Chim. Acta **10**, 572–573 (1964).

Patterson, E. K., S.-H. Hsiao and A. Keppel: Studies on dipeptidases and aminopeptidases. I. Distinction between leucine aminopeptidase and enzymes that hydrolyse L-leucyl-β-naphthylamide. J. Biol. Chem. **238**, 3611–3620 (1963).

–, –, – and S. Sorof: Studies on dipeptidases and aminopeptidases. II. Zonal electrophoretic separation of rat liver peptidases. J. Biol. Chem. **240**, 710–716 (1965).

Pearse, A. G. E.: Histochemistry. Theoretical and Applied. 3rd ed., vol. 2. Edinburgh and London: Churchill Livingstone, 1972.

Peters, J. E., I. Schneider und R. J. Haschen: Bestimmung der L-Alanyl-Peptidhydrolyse (Alanin-Aminopeptidase, Aminosäure-Arylamidase) im menschlichen Harn. Clin. Chim. Acta **36**, 289–301 (1972).

Rehfeld, N., J. E. Peters, H. Giesecke, L. Beier und R. J. Haschen: Untersuchungen über Aminosäure-arylamidasen. I. Verteilung und Isoenzyme der Aminosäure-arylamidase im menschlichen Organismus. Acta biol. med. germ. **19**, 809–818 (1967).

Smith, E. E., J. T. Kaufman and A. M. Rutenburg: The partial purification of an amino acid naphthylamidase from human liver. J. Biol. Chem. **240**, 1718–1721 (1965).

Sylvén, B., and I. Bois: Studies on the histochemical „leucine aminopeptidase" reaction. I. Identity of the enzymes possibly involved. Histochemie **3**, 65–78 (1962).

–, –: Studies on the histochemical „leucine aminopeptidase" reaction. II. Chemical and histochemical comparison of the enzymatic and environmental factors involved. Histochemie **3**, 341–353 (1963).

– and O. Snellman: Studies on histochemical „leucine aminopeptidase" reaction. V. Cathepsin B as a potential effector of LNA hydrolysis. Histochemie **12**, 240–243 (1968).

Vanha-Perttula, T.: Aminopeptidase of the rat testis. I. Fractionation and characterization. J. Reprod. Fert. **32**, 33–44 (1973).

Wachsmuth, E. D.: Lokalisation von Aminopeptidase in Gewebeschnitten mit einer neuen Immunofluoreszenztechnik. Histochemie **14**, 282–296 (1968).

Wintersberger, E., und K. P. Chatterjee: Reinigung und Eigenschaften einer Aminopeptidase der menschlichen Erythrozyten. Mh. Chem. **93**, 1268–1278 (1962).

Wolff, J. B., and R. A. Resnik: Aminopeptidase of the ocular lens. II. Substrate specificity. Biochim. Biophys. Acta **73**, 613–622 (1963).

Anschrift der Verfasser: per Adresse: Dr. Dr. H.-W. Denker,
Abteilung Anatomie der Medizinischen Fakultät an der RWTH,
51 Aachen, Melatener Str. 211.