

## Iodation enzymatique de protéines \* 1

J. NUNEZ, J. POMMIER, M. EL HILALI et  
J. ROCHE

Laboratoire de Biochimie générale et comparée, Collège de France, Paris 5<sup>e</sup>,  
France

### SUMMARY

*An iodination enzymatic method has been studied which makes possible the preparation of <sup>125</sup>I or <sup>131</sup>I labelled proteins.*

*Iodide oxidation is catalyzed by horse-radish peroxydase ; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is furnished by another enzymatic system : glucose-glucose oxydase. We have studied :*

- 1) *The optimal enzymatic iodination conditions for various proteins with different biological activities (immunological, hormonal, enzymatic).*
- 2) *The enzymatic iodination reaction mechanism.*
- 3) *Some molecular characteristics of the iodoproteins prepared.*

*We have established that :*

- 1) *The iodide oxidation is catalyzed by the horse-radish peroxydase and not directly caused by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced by the glucose-glucose oxydase system.*
- 2) *When iodide atoms are introduced in a protein in the conditions defined above — serumalbumin or thyroglobulin, for instance — no apparent denaturation occurs ; but a shift of the sedimentation coefficient established by sucrose gradient ultra-centrifugation appears which may be due to a change of the proteins shape.*

*These results has been discussed :*

- 1) *as to the validity of this method from a preparative point of view.*
- 2) *as a simple model of the physiological structural transitions observed during the biosynthesis and iodination of thyroglobulin.*

### RÉSUMÉ

*Une méthode d'halogénéation enzymatique a été mise au point permettant la préparation de protéines marquées par <sup>125</sup>I ou <sup>131</sup>I. L'oxydation de l'iodure est catalysée par la peroxydase de raifort, un autre système enzymatique (glucose-glucose oxydase)*

\* Manuscrit reçu le 14 juin 1965.

<sup>1</sup> Travail effectué en partie dans le cadre d'un contrat Euratom.

*fournissant  $H_2O_2$  nécessaire à la réaction. Ont successivement été étudiés :*

- 1) *Les conditions optimales d'iodation enzymatique de différentes protéines douées d'activités biologiques diverses (immunologiques, hormonales, enzymatiques).*
- 2) *Le mécanisme de la réaction enzymatique d'halogénéation.*
- 3) *Certaines caractéristiques moléculaires des protéines iodées préparées.*

*Il a été notamment établi :*

- 1) *que l'oxydation de l'iodure est catalysée par la peroxydase et non directement provoquée par l'eau oxygénée produite par le système glucose-glucose oxydase.*
- 2) *que l'introduction d'atomes d'iode par voie enzymatique, dans la sérumalbumine ou la thyroglobuline par exemple, ne provoque pas de dénaturation apparente mais conduit à un changement de coefficient de sédimentation en ultracentrifugation en gradient de saccharose qui peut être dû à une modification conformationnelle.*

*Ces résultats ont été discutés :*

- 1) *du point de vue de la validité d'utilisation de la méthode dans un but préparatif.*
- 2) *comme modèle simple des transitions conformationnelles observées dans des conditions physiologiques au cours de la biosynthèse et de l'iodation de la thyroglobuline.*

## INTRODUCTION

Les protéines marquées par l'iode radioactif ont été utilisées dans de multiples buts : dosage radioimmunoélectrophorétique d'hormones protéiques en cours de purification [1, 2, 3], recherches physicochimiques sur les structures protéiques secondaires et tertiaires [4, 5], renouvellement métabolique [6, 7, 8, 9] etc. L'isotope est fixé par substitution sur les restes de tyrosine et accessoirement sur ceux d'histidine par réaction d'iode [6, 10, 11, 12, 13, 14, 15] ou de monochlorure d'iode [16], dans des conditions qui risquent le plus souvent d'entraîner des dénaturations. Une méthode électrochimique apparemment plus douce a été également proposée [17].

Une des rares protéines iodées naturelles, la thyroglobuline, est halogénée dans le corps thyroïde par un système enzymatique, de nature peroxydase [18], dont l'étude et la purification sont en cours [19, 20]. Ce système réalise l'oxydation de l'iodure et l'iodation des restes de tyrosine de la protéine sans que l'on ait pu relier à l'action d'un seul enzyme les

deux étapes de la réaction [20, 21]. Par analogie avec ces faits, nous avons mis au point une méthode enzymatique d'iodation des protéines mettant en œuvre la peroxydase de raifort.

#### PARTIE EXPERIMENTALE.

##### 1. — *Produits utilisés.*

Les produits utilisés sont : la peroxydase de raifort (Light) à 90 U/mg, la glucose anhydre (Prolabo), la glucose oxydase (Light), la sérulalbumine de porc (Behring Merck), la ribonucléase pancréatique de bœuf  $5 \times$  cristallisée à 42 U/mg (Calbiochem), l'insuline (Light), le glucagon (Lillie) à 0,05 U/mg, la thyroglobuline de mouton, préparée par passage sur Sephadex G 200 [22], et la TSH titrant 0,7 U/mg (NIH<sup>1</sup> et Armour). <sup>125</sup>I et <sup>131</sup>I (traceurs) sont fournis par le Département des Radioéléments du C. E. A.

##### 2. — *Ultracentrifugation en gradient de saccharose.*

Le gradient de saccharose (Merck) 10-25 % a été réalisé dans les conditions décrites par MARTIN et AYMES [23]. Pour la sérulalbumine, l'analyse est poursuivie pendant 15 h à 39.000 T/mn; pour la thyroglobuline, on centrifuge pendant 7 h à 39.000 T/mn. Les lectures de densité optique sont effectuées à 210 m $\mu$  et les mesures de radioactivité en scintillation cristal autogamma Packard.

##### 3. — *Electrophorèse sur papier.*

Celle-ci a été opérée sur papier Whatman n° 1, en tampon au véronal de pH : 8,6. Pour la sérulalbumine, la ribonucléase, l'insuline, la thyroglobuline, la TSH, elle a été poursuivie pendant 12 h sous 120 V; pour le glucagon, pendant 15 h sous 120 V et avec un tampon carbonate-bicarbonate de pH : 10,5.

##### 4. — *Chromatographie.*

Elle a été opérée sur papier en solvant *n*-butanol-acide acétique-eau (78 : 5 : 17) ou éthanol-carbonate d'ammonium de pH : 9 (2 : 1). Les filtrations sur Sephadex ont été effectuées selon PORATH [24], les colonnes étant tamponnées par des phosphates ou le mélange carbonate-bicarbonate selon la protéine étudiée.

#### RÉSULTATS.

La peroxydase de raifort purifiée, d'activité très élevée, fonctionne en présence d'eau oxygénée. Pour éviter une addition de peroxyde d'hydrogène susceptible de provoquer des dénaturations, on a utilisé le système glucose-glucose oxydase qui fournit de l'eau oxygénée. L'halogène est introduit sous forme d'IK. Le système peroxydase-glucose-glucose oxydase fonctionne dans

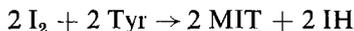
<sup>1</sup> Nous remercions vivement le N.I.H. (Bethesda USA) pour ce don.

une marge étendue de pH (4,5 à 8,5) alors que les systèmes chimiques utilisés le sont dans des conditions le plus souvent incompatibles avec l'intégrité conformationnelle des molécules protéiques.

### 1. — *Protocole général d'iodation.*

Pour ioder 5 mg d'une protéine, on utilise 50 µg de peroxydase de raifort, 10 µl d'une solution de glucose oxydase (1 mg/ml), 25 µl de solution de glucose (0,72 mg/ml), 50 µl d'une solution d'IK dont la concentration est calculée en fonction du nombre de restes de tyrosine de la molécule protéique étudiée et du nombre d'atomes d'iode que l'on désire introduire (par exemple 10 mg/10 ml pour 10 atomes d'iode). IK peut être préalablement marqué par une dose traceuse connue d'<sup>131</sup>I ou <sup>125</sup>I. Les constituants du mélange sont introduits dans une fiole à incubation selon l'ordre suivant : peroxydase, protéine, glucose, glucose oxydase, iodure de potassium (volume final : 0,5 ml). L'incubation est réalisée sous agitation dans un appareil de WARBURG pendant 1 h. Au bout de ce temps, la réaction est arrêtée par refroidissement à 0°.

On prélève une partie aliquote du milieu réactionnel et on l'analyse par chromatographie sur papier dans le solvant *n*-butanol-acide acétique-eau; on détermine ainsi le pourcentage de radioactivité fixée sur les protéines iodées obtenues (migration nulle) et celui de l'iodure qui n'a pas réagi. Connaissant l'activité spécifique de l'iodure utilisé, on calcule le nombre d'atomes d'iode fixés. On constate que, lorsque le nombre d'atomes d'iode utilisés est faible par rapport au nombre total de restes de tyrosine, le rendement d'halogénéation est proche de 100 %. En effet, la réaction :



libère de l'acide iodhydrique; celui-ci est réoxydé par la peroxydase et utilisé à nouveau, contrairement à ce qui a lieu au cours de l'iodation chimique. Par exemple, quand on traite la ribonucléase par 1 atome d'iode on fixe 0,93 atome de celui-ci.

La protéine halogénée obtenue est purifiée par percolation du mélange réactionnel sur une colonne de Sephadex équilibrée avec un tampon phosphate de pH : 7,5. Si l'on désire éliminer uniquement l'iodure qui n'a pas réagi, on utilise une colonne de Sephadex G 25. La séparation de la protéine iodée et des enzymes (peroxydase et glucose oxydase) est effectuée sur des colonnes de Sephadex G 100 ou G 200, selon le poids moléculaire du substrat utilisé. La séparation analytique de la protéine halogénée et des enzymes peut également être obtenue par électrophorèse sur papier dans un tampon convenable.

### 2. — *Modalités de la réaction enzymatique d'iodation.*

Plusieurs essais d'iodation de séralbumine cristallisée ont été réalisés dans les conditions décrites; ils ont permis de préciser le mécanisme de la réaction. La figure 1a reproduit le radioélectrophorégramme du milieu d'incu-

bation de 5 mg de sérualbumine et de 4 mg de peroxydase, la figure 1b les résultats obtenus avec 1  $\mu$ g de peroxydase. On constate, en comparant ces deux figures, que la peroxydase agit à des doses très faibles. La sérualbumine a été omise dans l'expérience illustrée par la figure 2; dans ces conditions, la peroxydase s'iode elle-même, ce qui entraîne sa dénaturation partielle. La figure 3 illustre les résultats d'un essai sans le système glucose-glucose oxydase. La sérualbumine s'iode alors, mais uniquement en présence de quantités importantes de peroxydase, laquelle fonctionne comme une oxygénase.

La comparaison des figures 1, 2 et 3 permet de constater que la peroxydase ne s'iode pas quand le système est complet, même lorsque les concentrations d'enzyme sont élevées : la réaction évolue en faveur de la sérualbumine. L'examen de la figure 4 montre que la peroxydase s'iode en absence de sérualbumine, de glucose et de glucose-oxydase. Un dernier essai nous a permis d'établir que l'incubation conduite en présence de glucose, de glucose-

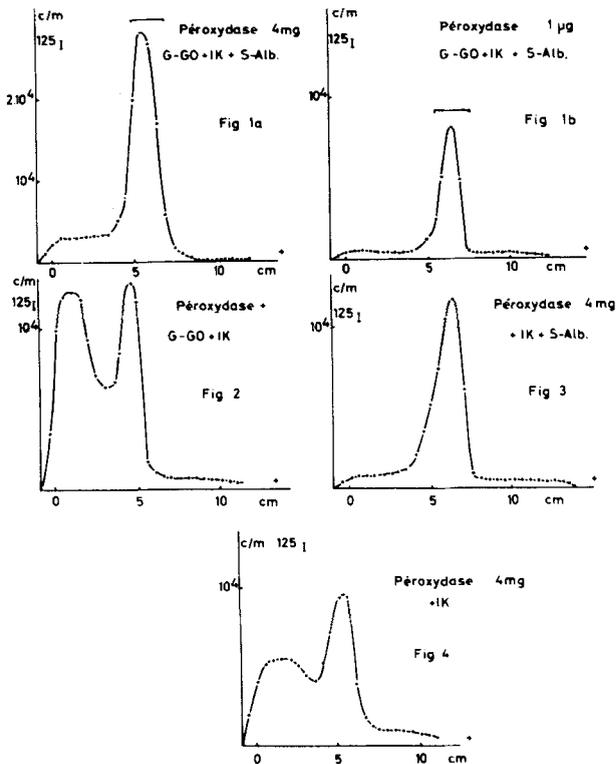


FIG. 1a, 1b, 2, 3 et 4.

Radioélectrophorogrammes sur papier (tampon véronal pH 8,6, 150 V, 12 h) des essais d'iodation de sérualbumine cristallisée effectués dans les conditions décrites.

oxydase, d'iodure et de séralbumine (omission de peroxydase) ne conduit à aucune halogénéation de cette dernière. Ce résultat ne s'explique que si  $H_2O_2$  produit par le système glucose-glucose oxydase n'est pas libérée dans le milieu. En effet, l'eau oxygénée libre oxyderait IK en  $I_2$  sans que la peroxydase soit nécessaire, ce qui reviendrait à une iodation chimique. Cette dernière observation confirme le rôle de la peroxydase et le caractère enzymatique de la réaction; il implique en outre des modalités particulières pour le transfert d' $H_2O_2$ .

### 3. — Protéines iodées préparées.

Diverses protéines ont été halogénées dans les conditions décrites. Le pH du tampon dans lequel est dissoute la protéine est choisi en fonction de la stabilité de celle-ci. Le mélange réactionnel est analysé par électrophorèse sur papier, en tampon véronal sodique généralement; les produits marqués sont homogènes selon ce critère analytique (fig. 5). On détermine également

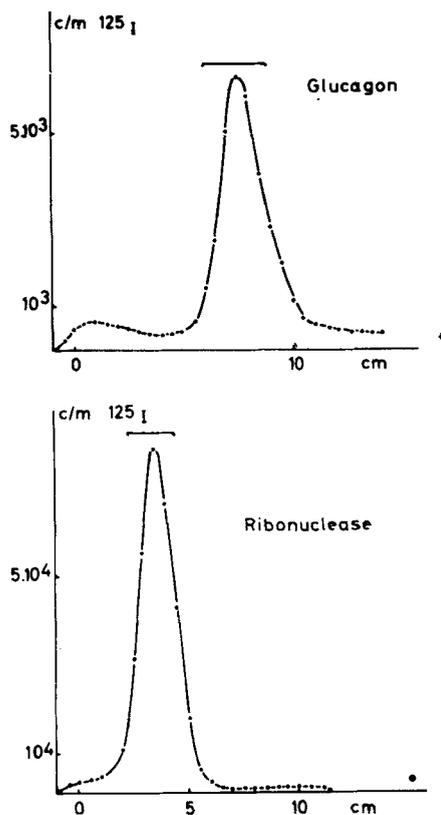


FIG. 5. — Radioélectrophorégrammes sur papier de ribonucléase et de glucagon iodés dans les conditions décrites.

Glucagon : tampon carbonate-bicarbonate pH 10,5, 120 V, 15 h. Ribonucléase : tampon véronal pH 8,6, 150 V, 12 h.

le pourcentage d'iode qui n'a pas été utilisé, donc le nombre d'atomes d'iode fixés. Les résultats obtenus au cours de l'iodation enzymatique de protéines douées d'activités biologiques diverses (hormonale, enzymatique, immunologique) sont rassemblés dans le tableau I.

TABLEAU I.

Essais	Nombre d'atomes d'iode utilisés	Nombre d'atomes d'iode fixés	pH d'iodation
RNAse .....	1	0,93	6,8
RNAse .....	5	4,5	6,8
RNAse ! .....	10	4,7	6,8
Sérumalbumine .....	1,33	0,17	6,8
Sérumalbumine .....	13,3	10,2	6,8
Sérumalbumine .....	30	8,4	4,6
Sérumalbumine .....	39,9	14,4	6,8
Sérumalbumine .....	39,9	16	6,8
Sérumalbumine iodée chimiquement (IK + IO <sub>3</sub> K)	39,9	8,7	9
Insuline .....	12	1,2	4,6
		0	8
TSH .....	2	0,28	6,8

Des essais d'iodation de la thyroglobuline ont été également effectués. Etant donné le nombre élevé de restes de tyrosine présents dans cette protéine (110-120), on a utilisé de 10 à 2000 atomes d'iode (fig. 6). 200 au maximum

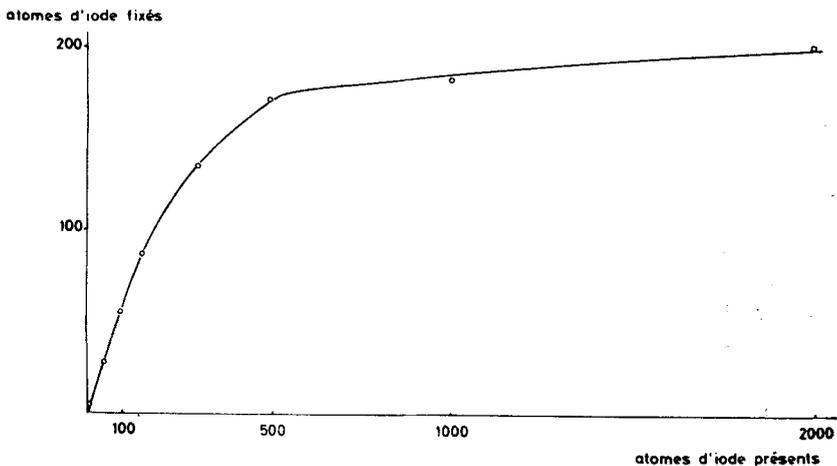


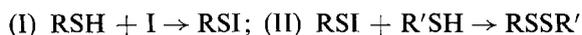
FIG. 6. — Nombre d'atomes d'iode fixés dans la thyroglobuline en fonction du nombre d'atomes d'iode présents dans le milieu d'incubation.

ont été fixés, ce qui correspond à une saturation; environ 20 atomes d'iode sont normalement présents par molécule de cette protéine.

On n'obtient la saturation par iodation chimique en milieu neutre qu'après dénaturation dans l'urée 8M [25]. Dans les conditions adoptées, la réaction est pratiquement linéaire jusqu'à ce que soient fixés 90 atomes d'iode, ce qui implique qu'un premier groupe de restes de tyrosine de la molécule de thyroglobuline est très réactif (90 restes de tyrosine au maximum, dans l'hypothèse d'une monoiodation).

#### 4. — *Caractéristiques moléculaires des protéines iodées par voie enzymatique.*

Toute manipulation dénaturant les protéines entraîne des modifications conformationnelles (rupture de liaisons hydrogène, déroulement de l' $\alpha$ -hélice, etc.). La dénaturation peut être reliée à divers facteurs, notamment le pH du milieu, l'oxydation des thiols libres ou des ponts disulfure. On admet [26] en outre qu'au cours de l'iodation, les réactions suivantes peuvent intervenir :



Ces processus conduiraient à des polymérisations ou des fragmentations de la molécule protéique, qui se traduiraient par des modifications du poids moléculaire et, par conséquent, de la vitesse de sédimentation lors de l'ultracentrifugation en gradient de saccharose.

Dans le but de vérifier si l'iodation enzymatique est susceptible d'entraîner de telles modifications, nous avons réalisé les expériences suivantes : nous avons préparé divers échantillons de sérumalbumine iodée contenant respectivement 0,17, 10,2 et 16 atomes d'halogène par molécule. Au cours d'un premier essai (fig. 7), on a analysé par ultracentrifugation en gradient de saccharose un mélange d'iodoalbumine marquée par  $^{125}\text{I}$  (0,17 atomes), d'iodoalbumine marquée par  $^{131}\text{I}$  (10,2 atomes) et de sérumalbumine naturelle.

On constate : 1) que la radioactivité due à  $^{125}\text{I}$  (albumine iodée faiblement à 0,17 atomes) coïncide avec la densité optique (albumine native); la vitesse de sédimentation d'une protéine faiblement halogénée ne diffère donc pas de celle de la protéine native; 2) que la radioactivité due à  $^{131}\text{I}$  (albumine fortement iodée à 10,2 atomes) est, par contre, décalée par rapport à  $^{125}\text{I}$  et à la densité optique. Si l'on établit les rapports  $^{125}\text{I}/^{131}\text{I}$  pour l'ensemble des fractions, on distingue nettement deux groupes de molécules halogénées, qui diffèrent par leur coefficient de sédimentation.

Un deuxième essai (fig. 8) a été réalisé en mélangeant avant ultracentrifugation une préparation iodée à 10,2 atomes et de la sérumalbumine non iodée, mais incubée en présence de peroxydase. Le décalage remarqué dans la figure 7 pouvait être attribué à des modifications dues à l'introduction d'halogène. On ne pouvait exclure, cependant, que des altérations de certains restes de la molécule protéique en soient la cause. Il n'en est rien car le décalage entre radioactivité et densité optique subsiste.

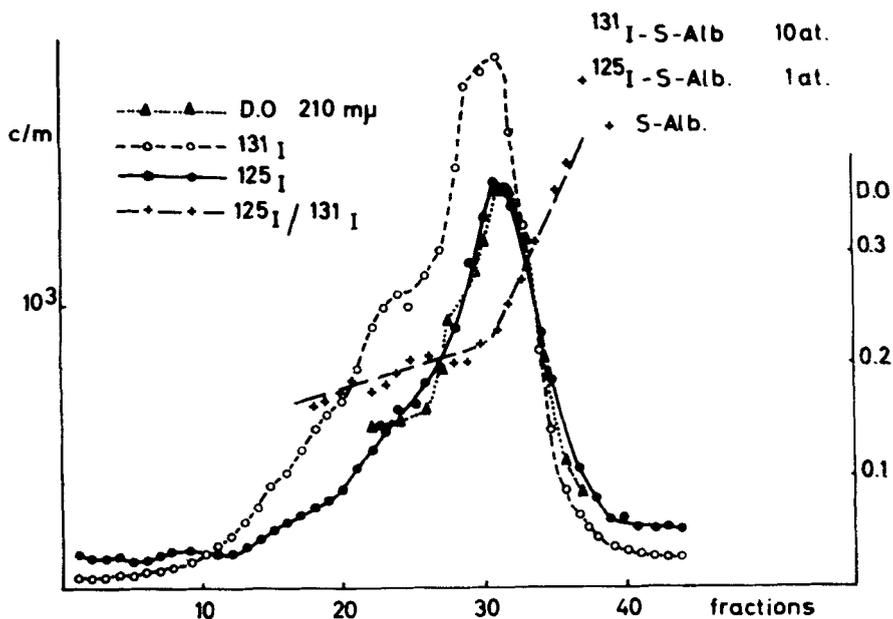


FIG. 7. — Ultracentrifugation en gradient de saccharose (10-25 %, tampon phosphate 0,05 M. pH 7,4;  $t$  : 15 h; 39.000 T/m) d'un mélange d' $^{125}\text{I}$ -sérumalbumine (0,17 atomes), d' $^{131}\text{I}$ -sérumalbumine (10,2 atomes) et de sérumalbumine native.

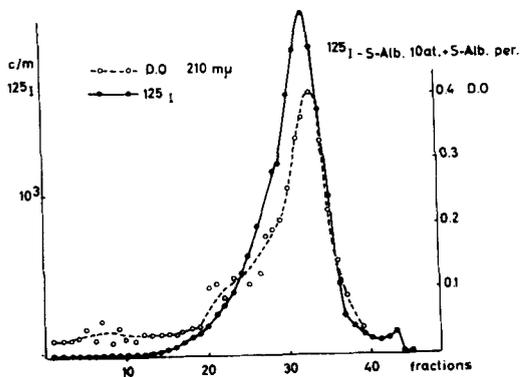


FIG. 8. — Ultracentrifugation en gradient de saccharose d'un mélange d' $^{125}\text{I}$ -sérumalbumine (10,2 atomes) et de sérumalbumine incubée en présence de peroxydase.

Un troisième essai (fig. 9) a été réalisé avec de la sérumalbumine encore plus halogénée (16 atomes) et de l'albumine native; le décalage existe, mais n'augmente pas.

Des résultats analogues ont été obtenus avec la thyroglobuline. Les figures 10 et 11 reproduisent les ultracentrifugations en gradient de saccharose d'un mélange de thyroglobuline native (mesures en densité optique) et de la

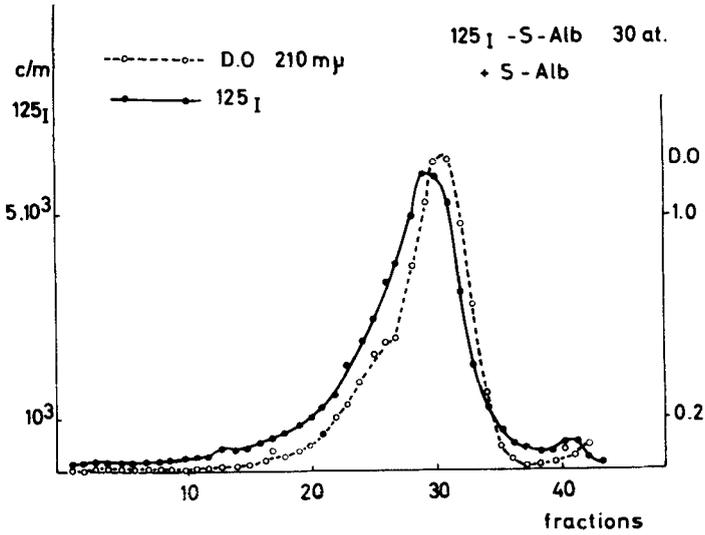


FIG. 9. — Ultracentrifugation en gradient de saccharose d'un mélange d' $^{125}\text{I}$ -sérumalbumine (16 atomes) et de sérumalbumine native.

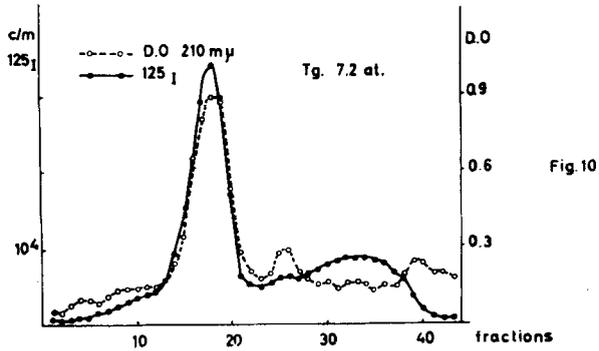


Fig.10

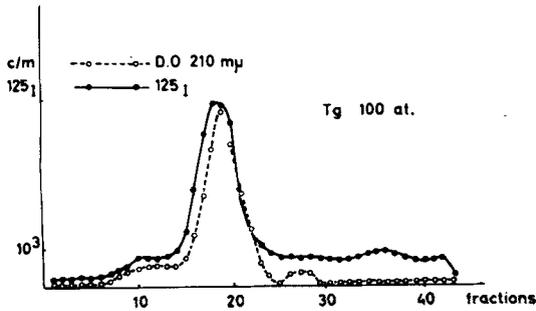


Fig.11

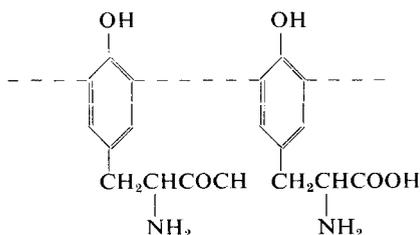
FIG. 10 et 11. — Ultracentrifugation en gradient de saccharose (10-25 %; tampon phosphate 0,05 M pH 7,4; 39.000 T/m; 7 h) d'un mélange de thyroglobuline native et de thyroglobuline iodée respectivement à 7,2 et 100 atomes.

même protéine iodée respectivement à 7,2 et à 100 atomes. Une faible iodation (7,2 atomes) ne modifie pas notablement la vitesse de sédimentation, contrairement à ce qui a lieu lorsque l'halogénéation est plus élevée (100 atomes).

Ces divers essais permettent de conclure que l'iodation enzymatique des protéines modifie d'une manière discrète certaines caractéristiques moléculaires. Elle n'entraîne pas, cependant, de dénaturation profonde se traduisant par des changements très importants du coefficient de sédimentation.

#### DISCUSSION.

La méthode enzymatique d'iodation proposée permet l'halogénéation de molécules protéiques dans des conditions favorables. La peroxydase et la glucose oxydase peuvent être utilisées à l'état de trace. Les résultats obtenus montrent que l'oxydation de l'iodure par  $H_2O_2$  n'est pas directe, mais qu'elle est catalysée par la peroxydase. Le système proposé ne permet ni l'iodation de tyrosine libre ni, d'une manière plus générale, celle de composés phénoliques libres. En effet, le système enzymatique proposé oxyde la tyrosine libre et conduit à un polymère du type [27] :



contenant deux ou trois restes d'acide aminé. Elle catalyse également l'oxydation de la diiodotyrosine en entraînant sa désiodation et la polymérisation de la tyrosine formée [28].

L'iodation de la tyrosine contenue dans les protéines pourrait être rendue possible par la distance séparant deux restes de cet acide aminé dans l'enchaînement primaire : les restes de tyrosine seraient oxydés par la peroxydase, ce qui pourrait favoriser leur iodation, mais ils seraient trop éloignés pour se dimériser. Une telle éventualité pourrait cependant intervenir entre deux restes de tyrosine appartenant à deux molécules protéiques différentes : on assisterait alors à un doublement du poids moléculaire; nous ne l'avons pas constaté pour les deux protéines étudiées par ultracentrifugation en gradient de saccharose. Le mécanisme de la réaction semble donc bien être le suivant : la peroxydase catalyse l'oxydation de l'iodure par l'eau oxygénée que fournit le système glucose-glucose oxydase. Ce dernier ne libère probablement pas le peroxyde d'hydrogène dans le milieu, ce qui évite une iodation non enzymatique. Enfin, la peroxydase est capable d'oxyder faiblement l'iodure sans apport d' $H_2O_2$  : elle paraît alors fonctionner comme une oxygénase, possibilité d'action qui a été envisagée pour cet enzyme [29].

L'iodation modifie légèrement, mais d'une manière significative, la vitesse de sédimentation en ultracentrifugation en gradient de saccharose. Ce résultat doit être rapproché de ceux obtenus au cours d'expériences sur la biosynthèse protéique et l'iodation de la thyroglobuline, réalisées *in vitro* avec des coupes de thyroïde de mouton incubées en présence d' $^{125}\text{I}$  et  $^3\text{H}$ -tyrosine [30]. L'ultracentrifugation en gradient de saccharose de la protéine doublement marquée obtenue permet de constater qu'il existe un décalage entre la radioactivité due à  $^{125}\text{I}$  et celle due à  $^3\text{H}$  : la protéine néosynthétisée (marquage par  $^3\text{H}$ ) n'est pas halogénée et sa vitesse de sédimentation est inférieure à celle de la thyroglobuline préformée, seule marquée par  $^{125}\text{I}$ . Dans les conditions physiologiques, on remarque donc également que la teneur en iode de la protéine entraîne une modification de la vitesse de sédimentation. Celle-ci ne peut être due à un changement du poids moléculaire (la quantité d'iode introduite est trop faible), mais est probablement consécutive à la modification de polarité du phénol selon qu'il est iodé ou non, donc aux liaisons hydrogène qu'il contracte avec des groupements proches. Cette modification des liaisons hydrogène est susceptible de déformer la molécule protéique, donc d'entraîner un changement de la vitesse de sédimentation.

La similitude des résultats obtenus au cours de l'iodation de protéines par la peroxydase de raifort, d'une part, et de l'iodation physiologique de la thyroglobuline, d'autre part, permet de penser que l'hétérogénéité observée n'est pas artificielle, mais est la conséquence de l'introduction d'atomes d'iode sur les restes de tyrosine d'une molécule protéique.

Les résultats décrits dans ce mémoire portent sur la préparation des iodoprotéines par voie enzymatique. Nous avons éliminé intentionnellement de la discussion toute considération portant sur la nature des combinaisons iodées formées. Un ensemble important de travaux antérieurs a été consacré à l'iodation des protéines par voie chimique et à ses résultats, en particulier à la formation de thyroxine au cours de ce processus [10]. Des recherches sont en cours pour étudier si la réaction d'iodation enzymatique étudiée conduit ou non à la formation exclusive de 3-monoiodo-L-tyrosine et de 3,5-diiodo-L-tyrosine et si le processus hormonogène de condensation de celles-ci exige ou non la participation d'un autre enzyme. Nous exposerons ultérieurement les résultats acquis dans ce domaine.

#### BIBLIOGRAPHIE

1. YALOW, R. S. et BERSON, S. A. — *J. Clin. Invest.*, **39** : 1157 (1960).
2. FITSHEN, W. — *Biochem. J.*, **88** : 13 p. (1963).
3. HALES, C. N. et RANDLE, P. J. — *Biochem.*, **88** : 137 (1963).
4. DONOVAN, L. G. — *Biochim. Biophys. Acta*, **78** : 474 (1963).
5. CHUL-YUNG CHA et SCHERAGA, H. A. — *J. Biol. Chem.*, **238** : 2958 (1963).
6. MAC FARLANE, A. S. — *Biochem. J.*, **62** : 135 (1955).
7. COHEN, S., HOLLOWAY, R. C., MATTHEWS, C. et MAC FARLANE, A. S. — *Biochem. J.*, **62** : 143 (1955).

8. STERLING, K. — *J. Clin. Invest.*, **30** : 1228 (1951).
9. MORETTI, J., BOREL, J., DOBRYSYZCKA, W. et JAYLE, M. F. — *Biochim. Biophys. Acta*, **69** : 205 (1963).
10. ROCHE, J. et MICHEL, R. — *Advances Protein Chem.*, **6** : 253 (1961).
11. HUGHES JR, W. L. et STRAESSLE, R. — *J. Amer. Chem. Soc.*, **72** : 452 (1950).
12. KESTON, A. S., *J. Biol. Chem.*, **153** : 335 (1944).
13. FRANCIS, G. E., MULLIGAN, W. et WORMALL, A. — *Nature*, **167** : 748 (1951).
14. HUNTER, W. H. et GREENWOOD, F. C. — *Nature*, **194** : 495 (1962).
15. GILMORE, E. C., ROBBINS, M. C. et REID, A. F. — *Nucleonics*, **12** : 65 (1954).
16. MAC FARLANE, A. S. — *Nature*, **182** : 53 (1958).
17. ROSA, U. — Proceedings of the Conference on Methods of preparing and storing marked molecules, Euratom, Brussels, 1963, p. 915.
18. ALEXANDER, N. M. — *J. Biol. Chem.*, **234** : 1530 (1959).
19. HOSOYA, R., KONDO, Y. et UI, N. — *J. Biochem.*, **52** : 180 (1962).
20. DE GROOT, L. J. et DAVIS, A. M. — *Endocrinology*, **70** : 492 (1962).
21. KLEBANOFF, S. J., YIP, C. et O. KESSLER. — *Biochim. Biophys. Acta*, **58** : 563 (1952).
22. NUNEZ, J., MAUCHAMP, J. et ROCHE, J. — *Biochim. Biophys. Acta*, **86** : 361 (1964).
23. MARTIN, R. G. et AMES, B. N. — *J. Biol. Chem.*, **236** : 1372 (1961).
24. PORATH, J. — *Biochim. Biophys. Acta*, **39** : 193 (1960).
25. EDELHOCH, H. — *J. Biol. Chem.*, **237** : 2778 (1962).
26. HUGHES, W. L. — *Annals, N. Y. Acad. Sci.*, **70** : 3 (1957).
27. GROSS, A. J. et SIZER, I. W. — *J. Biol. Chem.*, **234** : 1611 (1959).
28. MAYRARGUE-KOBYA, A., BOUCHILLOUX, S. et LISSITZKY, S. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **40** : 815 (1958).
29. MASON, H. S. — Proc. Intern. Symposium Enzyme Chem., Tokyo and Kyoto, 1957, p. 220.
30. NUNEZ, J., MAUCHAMP, J., MACCHIA, V. et ROCHE, J. — *Compt. Rend.*, **260** : 331 (1960).