

Versuche zur Synthese von Glutamat-2-T

M. WENZEL, M. BRÜHMÜLLER und K. ENGELS

Physiologisch-Chemisches Institut der Freien Universität Berlin

Empfangen den 6. Februar 1967

SUMMARY

Glutamic acid was labelled with tritium by exchange reaction in HTO. 1-glutamate is racemized in the exchange reaction after intermediate formation of azlactone with acetic acid. The tritium uptake is slight and does not occur on the C₂ atom, as was demonstrated by enzymatic oxydation with glutamate dehydrogenase. Using transaminase, on the other hand, it is possible to label 1-glutamic acid specifically on position 2 and to achieve the specific activity of the HTO utilized.

ZUSAMMENFASSUNG

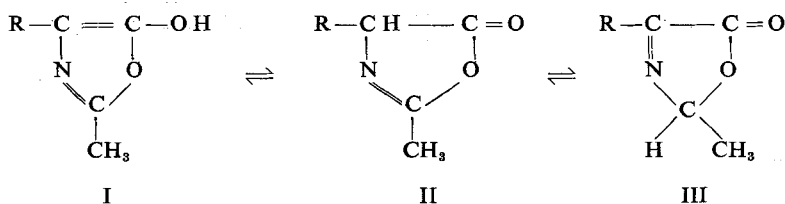
Glutaminsäure wurde durch Austauschreaktionen in HTO mit Tritium markiert. Bei der Austauschreaktion nach intermediärer Azlacton-Bildung mit Essigsäure wird 1-Glutamat racemisiert. Der Tritium-Einbau ist gering und erfolgt nicht am C₂-Atom, wie durch enzymatischen Abbau mit Glutamat-Dehydrogenase bewiesen wurde. Mit Hilfe von Transaminase gelingt es dagegen, spezifisch 1-Glutaminsäure in Position 2 zu markieren und die spezifische Aktivität des eingesetzten HTO zu erreichen.

Glutaminsäure kann durch Reduktion von α -Oximino-glutarsäure mit Zink/Salzsäure ⁽¹⁾, durch Hydrierung von α -Ketoglutarsäure in Gegenwart von Ammoniak und Raney-Nickel oder Palladiumschwarz ⁽²⁾ oder durch elektrolytische Reduktion von α -Ketoglutarsäureoxim ⁽³⁾ dargestellt werden. Durch Verwendung von gasförmigem Tritium bei der katalytischen Hydrierung oder von HTO als Lösungsmittel lassen sich diese Verfahren theoretisch auch auf die Synthese von Glutaminsäure-2-T übertragen. Ihr Wert ist jedoch dadurch gemindert, daß man entweder sehr hohe Aktivitäten von gasförmigem Tritium zusammen mit Ammoniak einsetzen muß oder die Reaktionsprodukte umständlich zu reinigen sind. Die Reduktion mit NaBH[T]₄ oder LiBH[T]₄ ^(4, 5)

ist auf die Synthese von Aminosäuren leider nicht anwendbar, da auf diese Weise nur primäre Amine dargestellt werden können. Wir entschieden uns deshalb für zwei Verfahren, bei denen man direkt von der Glutaminsäure ausgehen kann; das Tritium wird durch Austausch in das Molekül eingeführt. Man erhält einheitliche Reaktionsprodukte, deren Isolierung keinerlei Schwierigkeiten bereitet. Es standen uns für diesen Austausch ein chemisches und ein enzymatisches Verfahren zur Verfügung.

CHEMISCHE TRITIERUNG VON GLUTAMINSÄURE.

Aliphatische α -Aminosäuren bilden in der Hitze mit wasserfreier Essigsäure ungesättigte Azlactone, die infolge einer Keto-Enol-Tautomerie in 2-Stellung der Aminosäure ein Wasserstoffatom gegen Tritium austauschen können. Die Spaltung des Azlactonringes erfolgt dann durch Hydrolyse mit HCl. Bei der Reaktion in HTO, die von Clark und Rittenberg ⁽⁶⁾ auf die Deuterierung von Lysin und von Lubin und Kessel ⁽⁷⁾ auf die Tritierung von Alanin angewandt wurde, soll für den eigentlichen Austausch das folgende Gleichgewicht verantwortlich sein :

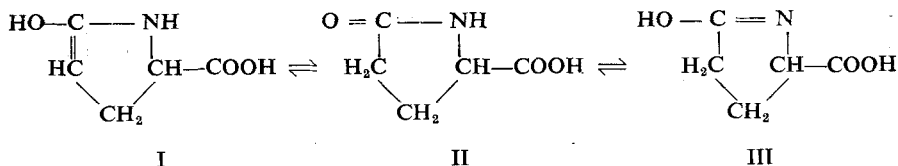


Der Austausch erfolgt in dem Gleichgewicht I-II, die Bildung von III ist wahrscheinlich wegen der Anwesenheit der benachbarten Methylgruppe weniger begünstigt; außerdem könnte ein Tritiumeinbau in dieser Stellung gar nicht registriert werden, da das Tritium bei der Hydrolyse wieder zurück in das Lösungsmittel gehen würde.

Zur Herstellung von Tritium-markierter Glutaminsäure wurde zunächst das Verfahren von Kessel und Lubin ⁽⁷⁾ übernommen und dadurch verbessert, daß der Tritiumdonator HTO vor der Hydrolyse nicht entfernt wurde. Der Rücktausch von Tritium gegen Wasserstoff konnte dadurch in gewissem Umfange zurückgedrängt werden.

Im Verlaufe der weiteren Untersuchungen konnte allerdings gezeigt werden, daß in dem besonderen Falle der Glutaminsäure eine Azlactonbildung wahrscheinlich gar nicht stattfindet. Vermutlich bildet sich aus der Glutaminsäure durch einfachen Wasseraustritt lediglich ihr Lactam, die α -Pyrrolidon-carbonsäure.

Für die α -Pyrrolidon-carbonsäure lassen sich die entsprechenden tautomeren Gleichgewichte formulieren :



Austauschfähig ist Gleichgewicht I-II, das Reaktionsprodukt müßte dann Glutaminsäure-4-T sein.

Abb. 1 zeigt das Radiochromatogramm eines entsprechenden Reaktionsansatzes.

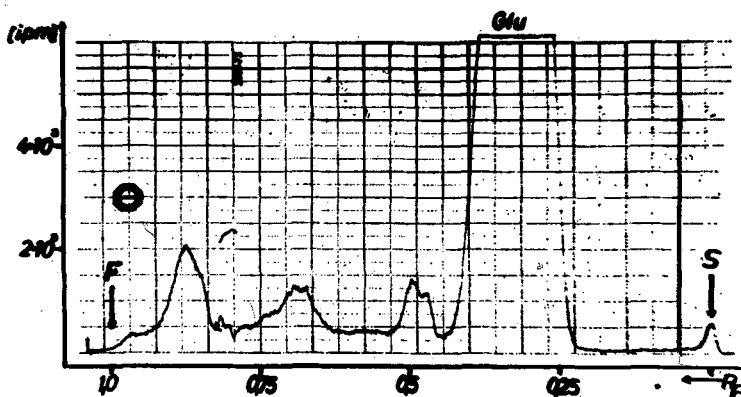


Abb. 1. Radiochromatogramm der chemischen Tritierung von Glutaminsäure mit HTO.

Ansatz : 74 mg *l*(+) Glutaminsäure (0,5 mM),
 45 mg Natriumacetat (0,55 mM),
 0,5 ml Eisessig (8,75 mM),
 0,17 ml Acetanhydrid (1,8 mM),
 1,1 ml HTO (4,0 Ci).

Nach der Reaktion Zugabe von 1,0 ml 5 *n* HCl zur Hydrolyse. Nach Gefrier-trocknung wurde ein Aliquot chromatographiert.

Laufmittel : Butanol-Eisessig-Wasser = 4 : 1 : 1.

Glu = Glutaminsäure.

Neben dem Hauptmaximum, das der Glutaminsäure entspricht, erkennt man drei kleinere Maxima, die nicht identifiziert wurden, da es sich prozentual nur um einen geringen Anteil handelte.

Da durch die chemische Umsetzung der Glutaminsäure zum Azlacton eine Racemisierung des eingesetzten reinen *l*(+)Antipoden wahrscheinlich war, wurde diese Frage gesondert geprüft. Zur Erfassung der enzymatisch aktiven *l*(+)Glutaminsäure wurde der optische Test mit Glutamat-DH durchgeführt⁽⁸⁾. Die quantitative chemische Bestimmung der Gesamtmenge an *d*- und *l*-Glutamat erfolgte mit Ninhydrin⁽⁹⁾. Die Ergebnisse in Tabelle 1 bestätigen die Vermutung einer 100-%igen Racemisierung, da von der eingesetzten

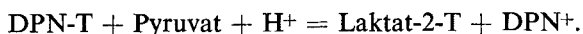
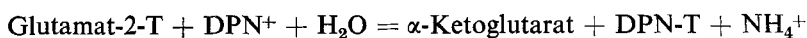
l(+)-Glutaminsäure nur 50% als *l*(+)-Glutaminsäure wiedergefunden wurde. Die spezifische Aktivität der Glutaminsäure errechnete sich zu 1,8 $\mu\text{Ci}/\mu\text{M}$ *d,l*-Glu, die der Reaktionsausgangslösung war 20,3 $\mu\text{Ci}/\mu\text{Atom H}$. Die eingesetzte Aktivität an HTO war 4 Ci, die Gesamtaktivität im Glutamat 912 μCi . Der Tritium-Einbau betrug somit 0,02% der eingesetzten Aktivität.

TABELLE 1. Glutamat-Menge nach der chemischen Tritierung. Reaktionsansatz wie in Abb. 1 angegeben.

Bestimmungsmethode	Glutamat gefunden (μM)	Ausbeute (%)
Optischer Test	252	50,2
Ninhydrintest	525	105

ENZYMATISCHER ABBAU DER CHEMISCH TRITIERTEN GLUTAMINSÄURE.

Um den Ort des Tritium-Einbaues in die auf chemischem Wege markierte Glutaminsäure zu klären, wurde die Glutaminsäure nach folgendem Schema umgesetzt :



Falls das Tritium tatsächlich am C_2 -Atom gebunden wäre, müßte es in der Milchsäure erscheinen ⁽¹⁰⁾; bei einer Bindung am C_3 - oder C_4 -Atom müßte man dagegen radioaktive Ketoglutar säure erhalten. Abb. 2 (Seite 238) zeigt das Ergebnis des entsprechenden Versuches.

Man sieht, daß bei Verwendung von 5 Mol% DPN nur etwa 8% der Aktivität im Lactat bzw. bei 500 Mol% DPN im Coferment zu finden war; es sind daher nur 8% des Tritiums der markierten Glutaminsäure am C_2 -Atom gebunden. Dagegen traten bei beiden DPN-Konzentrationen zwei Maxima auf, deren R_F -Wert etwas kleiner war als der von Glutamat und α -Ketoglutarat, die als Vergleichssubstanzen in Frage kamen. Diese geringe, dennoch deutliche Verminderung der R_F -Werte von Glutamat und α -Ketoglutarat gegenüber den Vergleichssubstanzen, konnten wir auf Salzeffekte zurückführen. Sowohl diese Glutaminsäure als auch das Ketoglutarat müssen also die Hauptmenge des Tritium am C_3 - oder C_4 -Atom enthalten.

Die Identifizierung der Tritium-markierten Substanzen erfolgte durch die Methode der getrennten Registrierung verschiedener β -Strahler auf dem gleichen Chromatogramm ⁽¹¹⁾. Zur gesonderten Erfassung der zugemischten ^{14}C -Glutaminsäure bzw. ^{14}C - α -Ketoglutar säure wurde das Chromatogramm

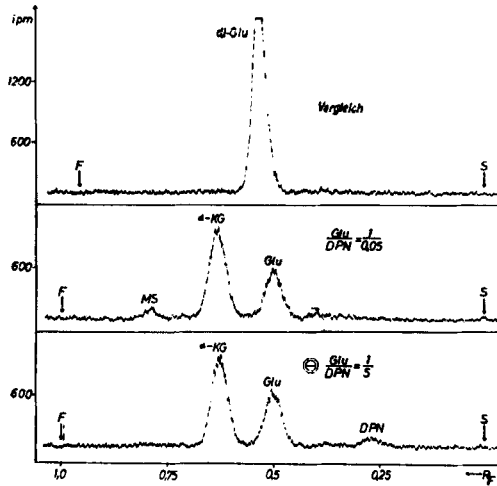


ABB. 2. Radiochromatogramme der Umsetzung des chemisch tritiierten Glutamats zu Lactat.

Ansatz : 1,0 ml Glutamat (4 μ M *d,l*-Glu, 7,2 μ Ci),

0,4 ml Phosphatpuffer pH 7,6 (40 μ M),

0,1 ml Glutamat-DH (1,0 mg, 3 Einh.), 0,03 ml EDTA (3 μ M), 0,1 ml Lactat-DH (0,33 mg, 120 Einh.),

0,2 ml Pyruvat (20 μ M). Nach Zusatz von 2 ml H₂O wurde die Lösung in zwei Hälften zu je 1,92 ml³ (2 μ M *d,l*-Glu) geteilt : 5 Mol% : 0,05 ml DPN (0,05 μ M) einer 0,81 mg/ml-Lsg.

Inkubation : 3 Std. bei 38 °C. Nach Gefriertrocknung und Inaktivierung der Enzyme, Rückstand in 0,25 ml H₂O aufgenommen und 0,1 ml chromatographiert.

Laufmittel : 1 m Ammonacetat (pH 5)-Äthanol = 3 : 7,5.

einmal in einem Doppelzählrohr ohne Fenster gemessen. Der dem radioaktiven Fleck entsprechende Flächeninhalt erfaßt dabei sowohl die T- als auch die ¹⁴C-Aktivität. Mißt man das gleiche Chromatogramm nochmals, nachdem man in das Berthold-Doppelzählrohr Blenden mit Fenster (0,9 mg/cm²) eingesetzt hat, so wird lediglich die ¹⁴C-Aktivität registriert, da die β -Strahlung des Tritiums vollständig vom Fenster absorbiert wird. Das Ergebnis war, daß ¹⁴C- und Tritium-Maxima sich völlig deckten, ein Beweis für ihre Identität (Abb. 3).

ENZYMATISCHE TRITIERUNG DER GLUTAMINSÄURE MIT HILFE DER TRANSAMINASE-REAKTION.

Da bei der chemischen Tritierung die eingesetzte *l*-Glutaminsäure racemisiert wird und der Tritium-Einbau nicht am C₂-Atom erfolgt, suchten wir nach einem enzymatischen Verfahren, um *l*-Glutamat-2-T mit HTO als Tritierungsquelle herzustellen. Es ist bekannt, daß bei Transaminase-Reaktion die α -Aminosäure mit Pyridoxalphosphat eine Schiffssche Base bildet ⁽¹²⁾,

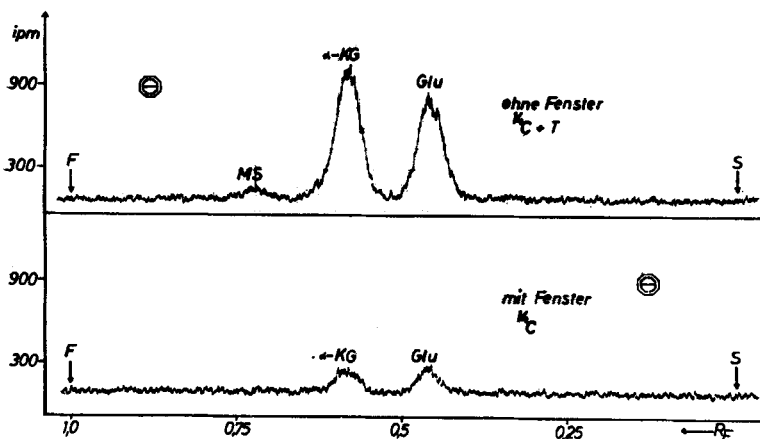


ABB. 3. Identifizierung von Tritium-markiertem Ketoglutarat mit Hilfe der getrennten Registrierung verschiedener β -Strahler nach Mischchromatographie mit Ketoglutarat- ^{14}C bzw. Glutamat- ^{14}C (Methodik in (11)).

deren α -H-Atom mit den Protonen des Reaktionsmediums ausgetauscht wird (13). Oshima und Tamiya (14) zeigen am Alanin, daß auch ein Austausch der H-Atome in β -Stellung mit den Protonen der Lösung erfolgt, und postulierten die Beteiligung der β -H-Atome am Transaminasemechanismus.

Bei der Reaktion der Glutaminsäure mit dem Pyridoxalphosphat verschwindet das Asymmetriezentrum im dem gebildeten Imino-Derivat. Es ist somit keine Aussage über eine eventuelle Änderung der Stereoisomerie möglich. Daher wurde zunächst geprüft, ob bei der Rückbildung des Glutamats aus der Schiff'schen Base die Stereoisomerie der eingesetzten Substanz erhalten bleibt, was an sich zu erwarten war, da im tierischen Organismus nur *L*(+)-Glutaminsäure auftritt. In einem inaktiven Ansatz wurde nach verschiedenen Inkubationszeiten jeweils die optische Drehung gemessen. Entsprechende Versuche (10) zeigten keine Änderung des Drehwertes während der Enzymreaktion.

ZEITABHÄNGIGKEIT DES TRITIUM-EINBAUS IN GLUTAMINSÄURE UND EINFLUSS DER ENZYMKONZENTRATION.

In der Annahme, daß nur das α -H-Atom am Transaminasemechanismus beteiligt ist, müßte die Glutaminsäure nach Einstellung des dynamischen Gleichgewichtes die gleiche spezifische Aktivität wie die Protonen des eingesetzten HTO besitzen. Werden aber mehrere H-Atome pro Molekül Glutaminsäure stabil ausgetauscht, so sollte der Endwert der spezifischen Aktivität des Glutamats entsprechend der am Austausch beteiligten H-Atome zwei- oder

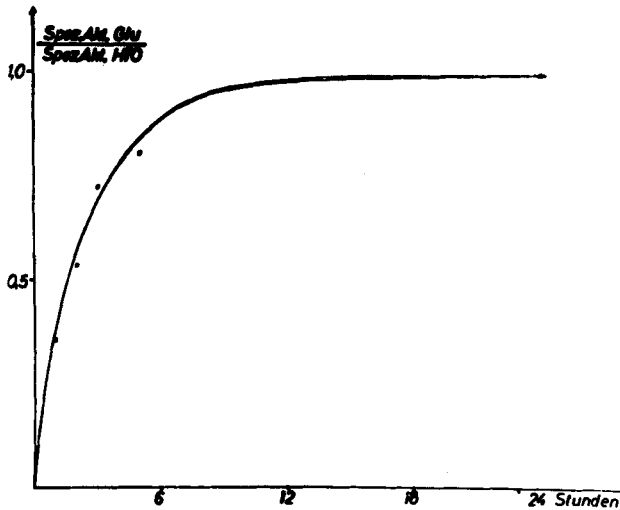


ABB. 4. Zeitabhängigkeit des enzymatischen Tritium-Einbaus in Glutaminsäure.

Ansatz : 7,4 mg l (+) Glutaminsäure ($50 \mu\text{M}$), 5,0 mg Kaliumbicarbonat zur Neutralisation 0,55 ml Phosphatpuffer pH 8,2 ($55 \mu\text{M}$), 0,05 ml Pyridoxalphosphat ($0,5 \mu\text{M}$), 0,4 mg Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) (11Einh.), 0,2 ml HTO (6,8 mCi). Gesamtvolumen : 1,0 ml, Temp. 38°C .

Nach den jeweiligen Inkubationszeiten wurden 0,1 ml ($5 \mu\text{M}$ Glu) entnommen, gefriergetrocknet und der Rückstand in 1,0 ml H_2O gelöst und 0,1 ml ($0,5$ Glu) chromatographiert.

Laufmittel : Butanol-Eisessig-Wasser = 4 : 1 : 1.

Das Radiochromatogramm wurde planimetrisch ausgewertet und die molspezifische Aktivität berechnet.

dreifach höher sein. Es wurde die Zeitabhängigkeit der Tritierung unter optimalen Enzymkonzentrationen (vergl. Abb. 5) gemessen. Abb. 4.

Aus Abb. 4 ist zu ersehen, daß nach 24 Stunden der Endwert des T-Einbaus erreicht ist und die molspezifische Aktivität des Glutamats gleich der der Protonen im eingesetzten HTO ist.

An anderer Stelle wurde gezeigt, daß die molspezifische Aktivität der Glutaminsäure beliebig variiert werden kann, entsprechend der leicht zu ändernden spezifischen Aktivität des einzusetzenden HTO ⁽¹⁵⁾.

Das Radiochromatogramm des nach 24 Stunden aufgearbeiteten Aliquots des Ansatzes von Abb. 4 zeigt ein einziges Maximum, dessen R_F -Wert mit dem der Glutaminsäure identisch ist (Abb. 5).

Allerdings trat bei manchen Ansätzen, bei denen die Transaminase durch Erhitzen inaktiviert wurde, noch eine geringe Aktivität mit dem R_F -Wert 0,21 auf, die Tritium-markiertem Pyridoxolphosphat entsprechen könnte ⁽¹⁶⁾.

Zur Untersuchung der Abhängigkeit der Austauschgeschwindigkeit von der Enzymkonzentration und zur Ermittlung der optimalen Versuchsbedin-

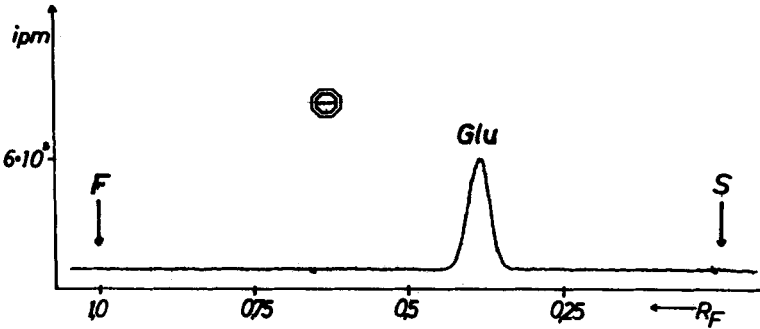


ABB. 5. Radiochromatogramm eines Ansatzes zur Herstellung von Glutamat-2-T.

Ansatz : Vergl. Abb. 4.

Inkubation : 24 Stunden bei 38°C.

Nach Reaktionsende wurde der Ansatz gefriergetrocknet und ein Aliquot des in H₂O gelösten Rückstandes chromatographiert.

Laufmittel : Butanol-Eisessig-Wasser = 4 : 1 : 1.

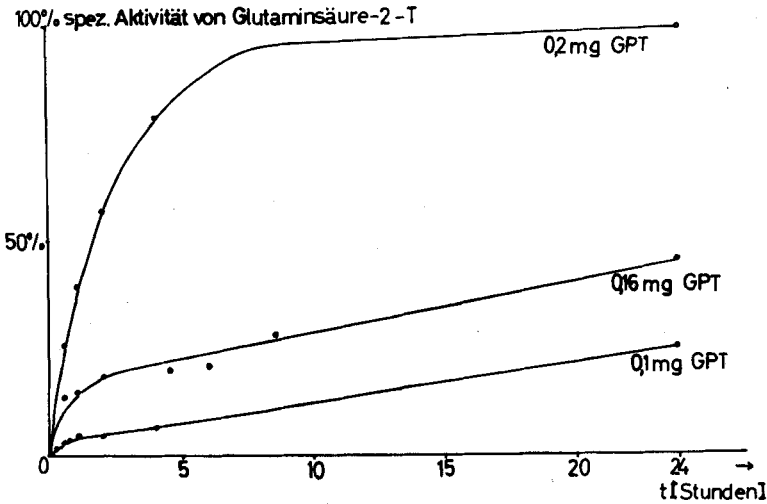


ABB. 6. Tritiummarkierung von L-Glutaminsäure in Abhängigkeit von der Zeit bei verschiedenen Enzymkonzentrationen. 0,2 mg GPT = 100%, 0,16 mg GPT = 80% und 0,1 mg GPT = 50%. 100% spezifische Aktivität von Glutaminsäure-2-T auf der Ordinate entsprechen der spez. Aktivität des HTO von 0,8 $\mu\text{Ci}/\mu\text{Atom H}$. Der weitere Ansatz entspricht dem Reaktionsansatz von Abb. 4.

GPT = Glutamat-Pyruvat-Transaminase.

gungen wurden drei verschiedenen Ansätzen mit unterschiedlicher Enzymkonzentration Proben von 0,1 ml zu verschiedenen Zeiten entnommen und die spezifische Aktivität der radioaktiven Glutaminsäure nach der chromatographischen Reinigung bestimmt. Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abb. 6 wiedergegeben. Es zeigt, wie mit zunehmender Konzentration an Transaminase der Austausch beschleunigt wird.

DISKUSSION.

Es wurde gezeigt, daß mit Hilfe des Austauschverfahrens auf chemischem Wege Tritium aus HTO in die Glutaminsäure eingebaut wird. Für biochemische Untersuchungen jedoch besteht ein großer Nachteil dieser gezielten chemischen Tritierung in der Racemisierung der optisch aktiven Substanz. Da die Substratspezifität ein charakteristisches Kriterium der Enzyme ist, reagiert bei weiteren enzymatischen Umsetzungen nur der eine optisch aktive Antipode des Racemats. In manchen Fällen bewirkt sogar der entgegengesetzte Antipode eine Aktivitätshemmung des Enzyms. Außerdem ist das Tritium nicht am C_2 -Atom sondern am C_3 - oder C_4 -Atom gebunden. Eine weitere Einschränkung der chemischen Tritierung ist die Tatsache, daß die spezifische Aktivität des markierten Produktes erheblich niedriger ist als die des eingesetzten HTO. Es muß also HTO mit sehr hoher spezifischer Aktivität verwendet werden, um ein Produkt von ausreichender spezifischer Aktivität zu bekommen.

Die Verwendung von reinen Enzymen zur Herstellung von an definierter Stelle markierten Verbindungen läßt ein einheitliches radioaktives Produkt erwarten^(17, 18). Umständliche Reinigungsverfahren sind nicht notwendig. Man erhält reines *l*-Glutamat-2-T^(10, 15).

Da enzymatische Umsetzungen ausschließlich in Puffersystemen durchgeführt werden, kann der gesamte Enzymansatz zunächst gefriergetrocknet und das HTO zu dem wasserfreien Reaktionspartner zugesetzt werden. Dadurch wird eine Verdünnung des einzusetzenden HTO vermieden. Umgekehrt ist das Wiedergewinnen des HTO nach der Austauschreaktion durch Tieftemperaturdestillation möglich⁽¹⁷⁾.

Die spezifische Aktivität der zu markierenden Substanz kann je nach Gabe des HTO beliebig variiert werden. Es tritt keine Änderung der Stereoisomerie ein.

METHODIK.

Radioaktivitätsmessungen.

Dünnschichtchromatogramme und Papierchromatogramme wurden mit dem « Dünnschicht-Scanner » LB 2721 * der Fa. Berthold und dem 4-Pi-Doppelzählrohr LB 6200 * automatisch ausgewertet.

* Laboratorium Prof. Dr. Berthold, 7547 Wildbad (Schwarzwald).

Als Standard bei der planimetrischen Bestimmung der Aktivitäten diene ein Aliquot der eingesetzten ^3H -Glutaminsäure. Vergl. Abb. 2, oberste Kurve.

Radioaktive Lösungen wurden in üblicher Weise mit dem Flüssig-Szintillationszähler der Firma Packard bestimmt. Vergl. ⁽¹¹⁾.

Chemische Tritierung von Glutaminsäure.

Versuchsansatz :

80 mg L-Glutaminsäure	= 0,54 mMol
0,5 ml Eisessig	= 8,7 mMol
0,17 ml Acetanhydrid	= 1,8 mMol
45 mg CH_3COONa , wasserfrei	= 0,55 mMol
0,2 ml HTO (21 mCi/ml)	= 4,2 mCi
3 ml 2n HCl.	

In einem 5-ml-Kölbchen werden 80 mg L-Glutaminsäure, 0,5 ml Eisessig und 45 mg wasserfreies Natriumacetat 1 Stunde lang unter Rückfluß gekocht, dann werden 0,17 ml Acetanhydrid hinzugefügt und weitere 2 Stunden erhitzt. Nach Zusatz von 0,2 ml HTO wird das Erhitzen noch 1 Stunde lang fortgesetzt. Nach Entfernung der Lösungsmittel durch Gefriertrocknung wird der Niederschlag mit 3 ml 2 n HCl aufgenommen und im Glycerinbad bei 120 °C hydrolysiert. Die Lösung wird dann im Exsikkator im Vakuum über KOH stark eingengt, anschließend neutralisiert und die Glutaminsäure mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie gereinigt. Die Analyse zeigt, daß die Substanz radiochemisch einheitlich ist.

Aus diesen Werten wurde die folgende Ausbeute berechnet : Eingesetzte Aktivität des HTO : 0,31 $\mu\text{Ci}/\mu\text{Atom H}$.

Ausbeute : $7,4 \cdot 10^{-3} \mu\text{Ci}/\mu\text{Mol Glutaminsäure} = 2,4 \%$.

Enzymatische Tritierung von Glutaminsäure.

Versuchansatz :

15 mg Glutaminsäure	= 102 μMol
0,2 ml GPT (Suspension in 0,1 ml 1,7 m $(\text{HN}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung (pH 6), spezifische Aktivität 27 E./mg nach Racker bzw. 1500 E./mg nach Bücher)	
0,05 ml 0,01 m Pyridoxalphosphatlösung	
0,5 ml 0,1 m Phosphatpuffer (pH 8,2)	
0,1 ml HTO (87 mCi = 0,8 $\mu\text{Ci}/\mu\text{Atom H}$)	
0,25 ml H_2O (Endvolumen 1 ml)	
1 Tropfen Toluol als bakteriostatisches Mittel.	

15 mg L-Glutaminsäure werden in 0,5 ml 0,1 m Phosphatpuffer (pH 8,2) und 0,25 ml H₂O weitgehend gelöst. Mit wenig 10 n KOH wird die pH-Verschiebung durch die Säure wieder abgefangen, wobei der Rest der Glutaminsäure in Lösung geht. Dann werden 0,05 ml 0,01 m Pyridoxalphosphatlösung zur Aktivierung der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) und 0,1 ml HTO (0,8 μ Ci/ μ Atom H) hinzugefügt. Nach guter Durchmischung wird die Reaktion mit 0,1 ml GPT-Suspension gestartet. Das Reaktionsgefäß wird 24 Stunden bei 38°C im Umlaufthermostaten gehalten. Reaktionsabbruch erfolgt durch Eintauchen in flüssige Luft und Entfernung der flüssigen Bestandteile durch Gefriertrocknung. Zur sicheren Inaktivierung des Enzyms wird noch 1 ml Aceton zugesetzt, das anschließend mit der Wasserstrahlpumpe wieder abgeschnorchelt wird. Anschließend wird die markierte Glutaminsäure durch Papier- oder Dünnschicht-Chromatographie gereinigt. Vergl. Abb. 5.

Für die materielle Unterstützung der Arbeiten danken wir der Euratom-Kommission.

Über die Ergebnisse dieser Arbeit wurde teilweise auf der Euratom-Konferenz November 1966 in Brüssel vorgetragen.

LITERATURVERZEICHNIS

1. WOLFF, E. — *Ann.*, **260** : 119.
2. KNOOP, F. und OESTERLIN, H. — *Z. physiol. Chem.*, **148** : 308.
3. GANDRY, R. und McIVOR, R. — *Canad. J. Chem.*, **29** : 427 (1951).
4. HUANG-MINTON, A. und PETTEBONE, R. H. — *J. Amer. Chem. Soc.*, **74** : 1562 (1952)
5. WENDLER, N. — *J. Amer. Chem. Soc.*, **73** : 3818 (1951).
6. CLARK, J. und RITTENBERG, D. — *J. biol. Chem.*, **189** : 521 (1951).
7. KESSEL, D. und LUBIN, M. — *Biochemistry*, **4**, Nr. 3 (1965).
8. BERGMAYER, U. — Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, 1962.
9. SKIN, W. und MOOSE, S. — *J. biol. Chem.*, **211** : 915 (1954).
10. BRÜHMÜLLER, M. — Biochem. Diplomarbeit Freie Universität Berlin. Berlin, 1966.
11. WENZEL, M. — *Naturwissenschaften*, **52** : 129 (1965).
WENZEL, M. und SCHULZE, P. E. — Tritium-Markierung. Walter de Gruyter u. Co., Berlin, 1962.
12. METZLER, D., IKARA, M. und SNELL, E. — *J. Amer. Chem. Soc.*, **76** : 648 (1954).
13. KONIKOVA, A., DOBBERT, N. und BRAUNSTEIN, A. — *Nature*, **159** : 67 (1947).
14. OSHIMA, T. und TAMIYA, N. — *Biochem. J.*, **78** : 116 (1961).
15. WENZEL, M. und BRÜHMÜLLER, M. — *Z. Naturforsch.*, **21b** 1224 (1966).
16. ENGELS, K. — Chem. Diplomarbeit Freie Universität Berlin. Berlin, 1966.
17. WENZEL, M. und GÜNTHER, Th. — *Z. physiol. Chem.*, **333** : 286 (1963); **335** : 372 (1963).
18. ROGNSTAD, R., KEMP, R. und KATZ, J. — *Arch. Biochem. Biophysics*, **109** : 372 (1965).