

Desoxyribonucleasen im menschlichen Seminalplasma

Deoxyribonucleases in the Human Seminal Plasma

E. Jürgen Zöllner *, Horst Lachner ** und Rudolf K. Zahn

* Physiologisch-chemisches Institut (Direktor: Prof. Dr. R. K. Zahn), Johannes Gutenberg-Universität, Mainz und ** Universitäts-Hautklinik (Direktor: Prof. Dr. G. W. Korting), Mainz

(Z. Naturforsch. 28 c, 742–746 [1973]; eingegangen am 20. September 1973)

Deoxyribonucleases, disc electrophoresis, seminal plasma

Acid and alkaline deoxyribonuclease (EC 3.1.4.6, EC 3.1.4.5) activities were demonstrated in the human seminal plasma. By means of a micro-disc-electrophoretic deoxyribonuclease test six different fractions are detectable. They were characterized with respect to their optimal substrate and optimal incubation conditions. The various enzyme activities were tested at pH 5.0 in 0.1 M Na-acetate buffer or at pH 7.4 in 0.1 M Tris-HCl buffer in the presence of different combinations of $MgCl_2$, $CaCl_2$, EDTA, $NaSO_4$, NaF and mercaptoethanol with native or denatured herring sperm DNA as substrate.

Einleitung

Cordonnier und Bernardi¹ konnten eine Enzymaktivität aus Bullenseminalplasma als DNase II charakterisieren. Quinn² wies im Seminalplasma verschiedener Spezies (Widder, Bulle, Mensch, Hund und Kaninchen) sowohl bei saurem als auch bei alkalischem pH Desoxyribonucleaseaktivitäten nach. Da die Aktivitäten bei pH 7,6 sich durch Citrat und Zink hemmen ließen, schloß er auf die Existenz zweier verschiedener DNAsen, einer DNase I und einer DNase II im Seminalplasma.

Weiterhin scheint ein Zusammenhang zwischen Desoxyribonuclease-Aktivitäten und Hoden-Veränderungen wie testikularer Degeneration und Kryptorchismus sowie auch in Verbindung mit Vitamin-A- oder Vitamin-C-Mangelerscheinungen zu bestehen^{3–5}.

Zur weiteren Abklärung der Frage, ob es im menschlichen Seminalplasma mehrere DNAsen gibt, erschien uns die Untersuchung dieses Sekretionsproduktes mit Hilfe der Disceletrophorese und dem daran geknüpften DNase-Nachweis besonders geeignet.

Zunächst gilt es, um einen Einblick in mögliche Zusammenhänge zwischen Erkrankungen des testikulären Systems und den DNase-Aktivitäten zu erhalten, in einem relativ leicht zugänglichen Untersuchungsmaterial Normalwerte zu bestimmen. Für die vergleichende Normierung zur Beurteilung des DNase-Enzymmusters erwies sich der disceletrophoretische DNase-Nachweis als geeignet.

Sonderdruckanforderungen an Dr. E. Jürgen Zöllner, Physiologisch-chemisches Institut der Johannes-Gutenberg-Universität, D-6500 Mainz, Johann-Joachim-Becher-Weg 13.

Material und Methode

Es wurde das Sperma von 9 Probanden untersucht, die im Rahmen der routinemäßigen Fertilitätsuntersuchung zuvor klinisch untersucht worden waren und einen unauffälligen Spermogrammbefund aufwiesen.

Das Ejakulat wurde nach einer sexuellen Karenzzeit von 4–7 Tagen durch Masturbation in der Klinik gewonnen und nach der Wiederverflüssigung bis zu einer Stunde bei 4 °C aufbewahrt. Danach wurde die Probe bei 4 °C 10 min bei 5000 U/min (Sorvall SM 34 Rotor) zentrifugiert. Der so gewonnene spermienfreie Überstand dient als Ausgangsmaterial für die weiteren Untersuchungen.

DNA

Zur Bestimmung der DNase-Aktivität verwendeten wir Tritium-markierte *Escherichia coli*-DNA mit einer spezifischen Aktivität von 4,7 μ Ci/mg DNA. Diese [³H]DNA wurde aus einer Thyminmangelmutante von *E. coli* (CR 34/K 416 thy⁻) (Denhardt) isoliert. Der Stamm wuchs 6 Stunden in einem synthetischen Medium mit einer Gesamtkonzentration von 3 μ g Thymin/ml mit 0,2 mCi/l [³H]Methylthymin (spezifische Aktivität 5 Ci/mMol) (Radiochem. Centre, Amersham). Danach wurden die Bakterien geerntet, mit Lysozym (5 mg/ml) in einem Puffer pH 8,5, *p*-Aminosalicylsäure 10%, EDTA 0,2% lyisiert und die DNA durch wiederholte Fällung mit dem kationischen Detergens Cetyltrimethylammoniumbromid isoliert und gereinigt⁶.

Bei der in die Acrylamidgele einpolymerisierten DNA handelt es sich um eine nach der Hitze-Detergens-Methode präparierte DNA aus Heringssperma⁷. Um DNA zu denaturieren, wurde sie 10 min auf 100 °C erhitzt und dann sofort im Eisbad



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

abgekühlt. Alle anderen Chemikalien waren vom höchsten käuflichen Reinheitsgrad.

Bestimmung der DNase-Gesamtaktivität

Die in dem Versuchsansatz unter DNase-Wirkung aus [³H]*E. coli*-DNA gebildeten säurelöslichen DNA-Abbauprodukte wurden im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen. 20 µl Untersuchungsflüssigkeit wurden zu 100 µl Inkubationsansatz gegeben. Der Inkubationsansatz enthielt 55 µg [³H]*E. coli*-DNA entweder in 0,1 M Na-Aacetat-Puffer pH 5,0, 5 · 10⁻³ M EDTA oder 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,4, 10⁻² M MgCl₂, 10⁻³ M CaCl₂. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C. Jeweils 50 µl wurden nach 0 und 60 min entnommen, auf Filterpapier (Ø 2,3 cm, Whatman Nr. 1) aufgetragen und der säurefällbare DNA-Anteil nach Bollum⁸ bestimmt, wobei die Differenz der säurefällbaren DNA-Probe-Menge den in diesem Zeitraum durch DNase-Wirkung freigesetzten säurelöslichen DNA-Spaltprodukten entspricht. Eine DNase-Einheit ist dabei in Anlehnung an Loeb⁹ die Enzym-Aktivität, die pro ml und min 1 · 10⁻⁹ Mol DNA-P in die säurelösliche Form überführt.

Die discelektrophoretische Auftrennung und Bestimmung der DNase-Aktivitäten, basierend auf Angaben von Boyd¹⁰ und Neuhoff¹¹ erfolgte analog der Nucleasetrennung des Liquor cerebrospinalis¹².

Die Gele enthielten 134 g/l Acrylamid und 0,3 g/l DNA. Dabei wandern die Desoxyribonucleasen nach Maßgabe ihrer elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit unterschiedlich weit in das DNA-haltige Trenngel unter Bedingungen ein, bei denen sie nicht aktiv sind. Nach Beendigung der Trennung wurden die Polyacrylamidgele in einen Inkubationspuffer überführt. Sind die Desoxyribonucleasen unter diesen Bedingungen aktiv, so entstehen DNA-Bruchstücke, die aus dem Gel diffundieren. Nach Anfärbung der DNA-Gele mit Gallocyanin und nach-

folgender Differenzierung finden sich proportional der Desoxyribonuclease-Aktivitäten Zonen, die infolge ihres DNA-Verlustes weniger oder überhaupt nicht angefärbt sind.

Die Trennung erfolgte bei 700 µA pro Gel und dauerte 90 min bei etwa 4 °C. Nach der elektrophoretischen Trennung wurden die Gele jeweils in einem der folgenden drei Puffersysteme eine Stunde inkubiert: 1. 0,1 M Na-Aacetat-Puffer pH 5,0, 5 · 10⁻³ M EDTA; 2. 0,1 M Na-Aacetat-Puffer pH 5,0, 1 · 10⁻² M MgCl₂, 1 · 10⁻³ M CaCl₂; 3. 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,4, 1 · 10⁻² M MgCl₂, 1 · 10⁻³ M CaCl₂.

Um die unterschiedliche Hemmbarkeit der einzelnen Banden zu beurteilen, wurde jeder der Stamm-puffer zusätzlich mit folgenden Substanzen in der angegebenen Endkonzentration als Inkubationslösung benutzt:

- a. 5 · 10⁻² M EDTA; b. 10⁻² M Na₂SO₄; c. 10⁻² M 2-Mercaptoäthanol; d. 5 · 10⁻² M NaF.

Nach der Inkubation wurden die Gele wie früher beschrieben¹³ mit Gallocyanin-Chromalaun gefärbt und in Wasser differenziert, worauf die Aufhellungen densitometrisch vermessen und zur Beurteilung ihrer Aktivität mit Densitometerkurven bekannter Konzentrationen an DNase I (Worthington, Freehold, USA, spezifische Aktivität: 2000 Einheiten/mg) normiert wurden.

Ergebnisse und Diskussion

Die Bestimmung der DNase-Gesamtaktivität im menschlichen Seminalplasma von Normalpersonen ergab bei pH 5,0 (0,1 M Na-acetat, 1,5 · 10⁻³ M EDTA) und bei pH 7,4 (0,1 M Tris/HCl, 10⁻² M MgCl₂, 10⁻³ M CaCl₂) für jeden Inkubationsansatz jeweils unterschiedliche Werte (Tab. I).

Wurde eine Probe auf eine Temperatur von -20 °C eingefroren und nach einem Monat wieder

Tab. I. Bestimmung der Desoxyribonucleaseaktivitäten im Seminalplasma unter verschiedenen Inkubationsbedingungen und nach Lagerung der Probe bei 4 °C über 4 Wochen. Eine DNase Einheit entspricht der Enzymmenge, die pro ml und min 1 · 10⁻⁹ Mol DNA-P in die säurelösliche Form überführt. Einzelheiten siehe unter Material und Methode. Die Aktivitätsabnahme nach Lagerung bei saurer Inkubation ist bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ signifikant.

	Normalkollektiv <i>n</i> = 9	Normalkollektiv <i>n</i> = 3 frisch 4 Wochen -20 °C	Normalkollektiv <i>n</i> = 3 frisch 4 Wochen -20 °C	
Inkubationsansatz	0,1 M Na-Aacetat-Puffer pH 5,0, 5 · 10 ⁻³ M EDTA	0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,4, 10 ⁻² M MgCl ₂ , 10 ⁻³ M CaCl ₂	0,1 M Na-Aacetat-Puffer pH 5,0, 5 · 10 ⁻³ M EDTA	0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,4, 10 ⁻² M MgCl ₂ , 10 ⁻³ M CaCl ₂
Desoxyribonucleaseaktivität in E/ml Seminalplasma	0,95 ± 0,43	1,69 ± 0,59	1,32 ± 0,55 0,47 ± 0,41	1,54 ± 0,45 1,44 ± 0,41

aufgetaut, so fand sich beim alkalischen jedoch nicht beim neutralen Inkubationsansatz eine deutliche Aktivitätsverminderung (Tab. I). Schon diese Befunde sprechen für die Existenz verschiedener DNAsen im Spermplasma. Wurden die DNA-Gele nach erfolgter Auf trennung des Seminalplasmas in verschiedenen Inkubationspuffern inkubiert, so zeigen sich deutlich mindestens 6 verschiedene DNA-spaltende Aktivitäten im menschlichen Spermplasma (Abb. 1).

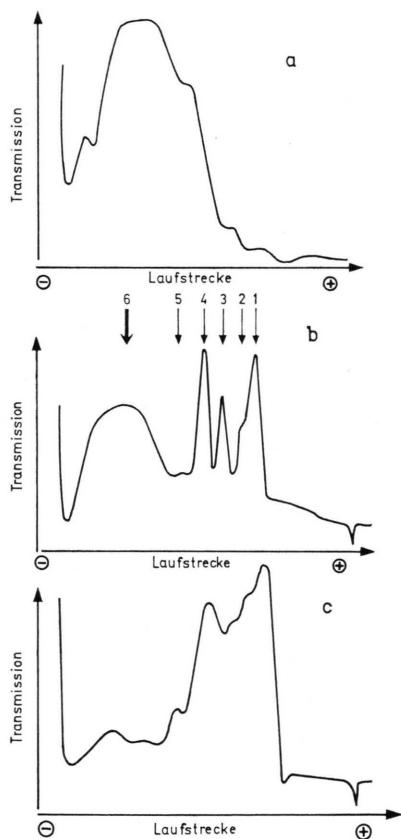


Abb. 1. Densitometerkurven von Micro-Disc-Elektrophorese-Gelen zum Desoxyribonuclease-Nachweis. Laufzeit: 90 min bei 700 μ A pro Gel. Probe: Charakteristisches Spermplasma bei normalem Spermogramm. Inkubation der DNA-Gele: eine Stunde in: a. 0,1 M Na-Acetat-Puffer pH 5,0+ $5 \cdot 10^{-3}$ M EDTA; b. 0,1 M Na-Acetat-Puffer pH 5,0+ 10^{-2} M MgCl₂+ 10^{-3} M CaCl₂; c. 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,4+ 10^{-2} M MgCl₂+ 10^{-3} M CaCl₂.

Dabei lassen sich 5 schmale Aktivitätsbanden, in der Abb. 1 mit 1–5 bezeichnet, klar von einem im Gel breiten Aktivitätsbereich mit saurem pH-Optimum abgrenzen. Eine Auf trennung dieser Aktivitätszone in distinkte Banden war auch mit Hilfe von

Acrylamidgelen anderer Porengröße, wie sie bei 6,7% und 20% Acrylamid-Konzentration gegeben sind, nicht möglich. Eine angedeutete Sattelbildung der Densitometerkurven lässt jedoch Inhomogenitäten vermuten. Dagegen lassen sich die Banden 1–5 mit Sicherheit voneinander abgrenzen. Sie sind nicht nur im DNA-Acrylamidgel an unterschiedlichen Stellen lokalisiert (Abb. 1), sondern sie zeigen auch bei verschiedenen Inkubationsbedingungen ein unterschiedliches Aktivitätsverhalten (Abb. 1, Tab. II) und sind so zusätzlich charakterisierbar.

Zur Auswertung wurden die Flächen der einzelnen Densitometerausschläge planimetriert, durch Vergleich mit bekannten Desoxyribonuclease I-Konzentrationen normiert und stellen so ein Maß für die Enzymaktivitäten unter den jeweiligen Bedingungen dar.

Die Banden 1+2 und 3+4 wurden bei pH 7,4 gemeinsam beurteilt, da sie unter diesen Inkubationsbedingungen nicht mehr in allen Fällen getrennt vermessen werden können. Aktivitätsunterschiede lassen sich dabei jedoch auf die Banden 1 und 4 beziehen, wie aus bei pH 7,4 gut getrennten Kurven ersichtlich ist.

Die Banden 1–5 sind alle bei pH 5,0 in Anwesenheit von EDTA nicht oder nur kaum aktiv. Die erste Bande zeigt ein klares Optimum bei pH 7,4, ist aber, wie alle Banden bei pH 5,0 nach Zusatz von MgCl₂ und CaCl₂ nachweisbar. Die Aktivitätszunahme beträgt bei pH 7,4 das 6-fache derjenigen bei pH 5,0. Eine Beurteilung der nächsten Bande in bezug auf das pH-Optimum ist nicht möglich, da sie bei pH 7,4 mit der ersten Bande verschmilzt. Bei der dritten und vierten Bande wurden zwischen alkalischer und saurer Inkubation kaum Aktivitätsunterschiede beobachtet, während Bande 5 wieder ein Optimum bei pH 7,4 zeigt. Sie weist bei pH 7,4 das 2-fache der Aktivität von pH 5,0 auf.

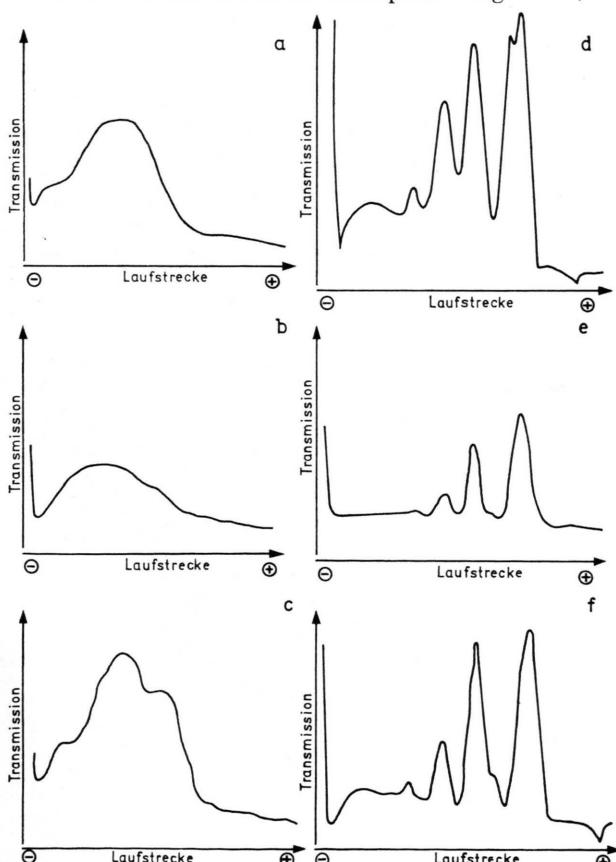
Die sechste breite, langsam anionisch wandernde Aktivität nimmt beim Übergang zum alkalischen Inkubationspuffer um die Hälfte ihrer Aktivität ab. Sie ist weiterhin bei pH 5,0 ohne Ionen in Gegenwart von $1,5 \cdot 10^{-3}$ M EDTA 5-mal aktiver als bei gleichem pH-Wert mit Magnesium und Calcium.

Veränderungen der Aktivität der einzelnen Banden durch Veränderungen des Substrats, wobei de-naturierte DNA an Stelle nativer DNA eingesetzt war, und ihre Hemmbarkeit durch Zusatz verschiedener Substanzen zeigt Abb. 2. So ist die breite Aktivitäts-Zone bei pH 5,0 durch Sulfationen deut-

Tab. II. Desoxyribonucleaseaktivitäten der einzelnen Banden des Seminalplasmas unter drei verschiedenen Pufferbedingungen in Äquivalenten an Desoxyribonuclease I (ng/ml) und in Relativprozenten. Es handelt sich um ein Normalkollektiv von 9 Probanden. Zur Beurteilung der Desoxyribonuclease-Aktivitäten der einzelnen Banden wurden die Densitometerkurven bekannter Konzentrationen von Desoxyribonuclease I (spez. Akt. 2000 Einheiten/mg) herangezogen. Als Bezugseinheit diente ein Äquivalent von 1 ng Desoxyribonuclease I/ml. Die planimetrierten Ausschläge der Densitometerkurven der Seminalplasmatarennungen wurden auf diese Eichlösungen bezogen.

Inkubationsbedingungen	Aktivität der einzelnen Banden im Seminalplasma in Desoxyribonuclease I-Äquivalenten (ng/ml)												
	und in % der Gesamtaktivität ($n = 9$)		6 [ng/ml] [%]		5 [ng/ml] [%]		4 [ng/ml] [%]		3 [ng/ml] [%]		2 [ng/ml] [%]		+ 1 [%]
0,1 M Na-Aacetat-Puffer pH 5,0, $5 \cdot 10^{-3}$ M EDTA	360 ± 84	100 ± 23,4											
0,1 M Na-Aacetat-Puffer pH 5,0, 10^{-2} M MgCl ₂ , 10^{-3} M CaCl ₂	63 ± 42	36,4 ± 10,3	17 ± 1	12,9 ± 5,8	34 ± 10	22,6 ± 5,7	18 ± 8	11,1 ± 4,8	26 ± 12	17,0 ± 3,6			
0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,4, 10^{-2} M MgCl ₂ , 10^{-3} M CaCl ₂	28 ± 11	13,6 ± 5,1	28 ± 11	14,6 ± 8,2	58 ± 31 ng/ml	25,9 ± 8,5%			158 ± 212 ng/ml	46,2 ± 18,3%			

lich hemmbar, während durch Zusatz von Mercaptoäthanol eine Aktivitätszunahme feststellbar ist. Wird denaturierte DNA als Substrat, oder EDTA sowie Natriumfluorid im Inkubationspuffer angeboten, so



verändert sich die Aktivität nicht. Bei pH 7,4 mit Magnesiumchlorid und Calciumchlorid weisen die anderen Banden eine starke Aktivitätsabnahme auf, wo statt nativer DNA denaturierte DNA eingesetzt wird. Diese Aktivitäten werden bei Zugabe von EDTA oder Natriumfluorid ganz zum Verschwinden gebracht, während unter Mercaptoäthanol nur eine geringe Aktivitätsabschwächung zu beobachten ist. Die sechs Aktivitäten sind also hinsichtlich ihrer elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit, optimaler Inkubationsbedingung und Hemmbarkeit zu charakterisieren.

Entsprechend der auch bei Normalpersonen stark schwankenden DNase-Gesamtaktivität weisen die absoluten Werte der einzelnen Banden eine starke Streuung auf. Vergleicht man jedoch die Relativprozente der einzelnen Banden bezogen auf die Gesamtaktivitäten miteinander, so wird die Streuung gering (Tab. II).

Besonders bei der Inkubation der DNA-Gele mit 0,1 M Na-Aacetat-Puffer, pH 5,0 mit 10^{-2} M MgCl₂ +

Abb. 2. Densitometerkurven von Micro-Disc-Elektrophorese-Gelen zum Desoxyribonuclease-Nachweis. Laufzeit: 90 min bei 700 μ A pro Gel. Inkubationszeit: 1 Stunde. Probe: Charakteristisches Seminalplasma bei verschiedenen Inkubationsbedingungen: a. 0,1 M Na-Aacetat-Puffer pH 5,0 + $5 \cdot 10^{-3}$ M EDTA; b. 0,1 M Na-Aacetat-Puffer pH 5,0 + $5 \cdot 10^{-3}$ M EDTA + 10^{-2} M Na₂SO₄; c. 0,1 M Na-Aacetat-Puffer pH 5,0 + $5 \cdot 10^{-3}$ M EDTA + 10^{-2} M 2-Mercaptoäthanol; d. 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,4 + 10^{-2} M MgCl₂ + 10^{-3} M CaCl₂; e. 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,4 + 10^{-2} M MgCl₂ + 10^{-3} M CaCl₂ + denaturierte DNA als Substrat im Trenngel; f. 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,4 + 10^{-2} M MgCl₂ + 10^{-3} M CaCl₂ + 10^{-2} M 2-Mercaptoäthanol.

10^{-2} M CaCl₂ ergeben die Relativprozente der einzelnen Banden eine geringe Streuung.

Ein Vergleich mit bekannten Kriterien zur Klassifizierung von Säugetier-DNAsen lässt teilweise eine Zuordnung zu ^{14–16}. So kann die breite, langsam anionisch wandernde Aktivität aufgrund ihres pH-Optimums im Sauren und der Hemmbarkeit durch MgCl₂ und Sulfationen bei einem Maximum an Aktivität in Gegenwart von EDTA der bekannten sauren DNase (DNase II) aus Schweinemilz zugeordnet werden.

Das gemeinsame Kriterium der Banden 1–5 ist ihre Abhängigkeit von zweiwertigen Kationen. Sie entsprechen damit der Pankreas-DNase (DNase I). Bei allen ist jedoch das für sie charakteristische pH-Optimum im Alkalischen nicht so ausgeprägt. Nur die Banden 1 und 5 zeigen eine klare Aktivitätszunahme bei pH 7,4 gegenüber pH 5,0.

Die vorliegende Arbeit bietet eine Ausgangsbasis für weitere Untersuchungen über Desoxyribonucleasen des menschlichen Spermaplasmas. Ein Vergleich

des Enzymmusters von Normalpersonen mit dem von Patienten mit pathologischem Spermogramm ist in diesem Labor in Vorbereitung. Untersuchungen der DNase-Aktivitäten müssen auch die Bestimmungen der Aktivitäten der einzelnen Fraktionen beinhalten, da sonst Aktivitätserhöhungen einer Fraktion durch Erniedrigung einer anderen Fraktion überdeckt werden könnten.

Eine Abklärung möglicher Aktivitätsdifferenzen dieses Enzymmusters zwischen normalen und pathologischen Spermaplasmaproben könnte neben dem möglichen diagnostischen Wert auch einen etwas näheren Einblick in die Funktionen dieser ubiquitär verbreiteten Enzymgruppe geben.

Wir bedanken uns bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die die Arbeit durch eine Sachbeihilfe unterstützte, bei Frl. U. Gügerich und Frl. M. Becker für die technische Hilfe bei der Präparation der [³H]*E. coli*-DNA und bei der Fa. Mack, Illertissen, für die Bereitstellung der Herings-DNA.

- ¹ C. Cordonnier u. G. Bernardi, Canad. J. Biochem. **46**, 989 [1968].
- ² P. J. Quinn, J. Reprod. Fert. **17**, 35 [1968].
- ³ M. Goubern, F. Buission-N'Diaye, Th. Terroine u. R. Ferrando, C. R. Acad. Sci. Ser. D **271**, 357 [1970].
- ⁴ J. Pestis, Y. Hitier u. Th. Terroine, C. R. Soc. Biol. **164**, 269 [1970].
- ⁵ Y. Hitier u. A. M. Honot, Arch. Sci. physiol. **24**, 323 [1970].
- ⁶ W. Hoenig, R. K. Zahn u. W. Heitz, Analyt. Biochem. [New York], in press.
- ⁷ R. K. Zahn, E. Tiesler, A. K. Kleinschmidt u. D. Lang, Biochem. Z. **336**, 281 [1962].
- ⁸ F. J. Bollum, Procedures in Nucleic Acid Research (eds. C. J. Cantoni and D. R. Davis), pp. 296–300, Harper and Row, New York-London 1966.
- ⁹ L. A. Loeb, J. biol. Chemistry **244**, 1672 [1970].
- ¹⁰ J. B. Boyd u. H. K. Mitchell, Analyt. Biochem. [New York] **13**, 28 [1965].
- ¹¹ V. Neuhoff, Arzneimittel-Forsch. **18**, 35 [1968].
- ¹² E. J. Zöllner, R. K. Zahn u. G. Meinig, Z. klin. Chem. klin. Biochem. **11**, 117 [1973].
- ¹³ E. J. Zöllner, W. E. G. Müller, R. K. Zahn, G. Brehm u. G. W. Korting, Klin. Wschr. **49**, 1290 [1971].
- ¹⁴ M. McCarty, J. gen. Physiol. **29**, 123 [1966].
- ¹⁵ G. Bernardi, The Enzymes Vol. 4, 3rd edition (ed. D. Boyer), pp. 271–287, Academic Press, New York 1971.
- ¹⁶ M. Sr. Laskowski, The Enzymes, Vol. 4, 3rd edition (ed. D. Boyer), pp. 289–311, Academic Press, New York 1971.