

Anreicherung der Leber-N-Acetyltransferase durch präparative Polyacrylamidgel-Elektrophorese und Bestimmung des Molekulargewichts

Purification of Human Liver Serotonin-/Isoniazid-N-Acetyltransferase
by Preparative Polyacrylamidgel-Electrophoresis and Determination
of Molecular Weight

Ernst H. Schulte, Werner Schloot und H. Werner Goedde

Institut für Humangenetik, Universität Hamburg

(Z. Naturforsch. **29 c**, 661–666 [1974]; eingegangen am 21. März/23. Juli 1974)

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. B. Rensch zum 75. Geburtstag in Verehrung gewidmet

N-Acetyltransferase, Serotonin, Isoniazid, Molecular Weight, K_M -values

Human liver N-acetyltransferase was purified by means of column chromatography on Sephadex G-100 (18 fold; yield: 60–70%) and preparative disc electrophoresis (40 fold; yield: 95–100%).

A separation of the hypothetical "serotonin-N-acetyltransferase" and "INH-N-acetyltransferase" on the basis of a possible difference of the charge of the proteins could not be achieved (disc electrophoresis). Thus the assumption is confirmed that INH and Serotonin are substrates of one enzyme.

The activity of N-acetyltransferase can be stabilized by adding thioglycolate, 2-mercaptoethanol, and cysteine. In some cases an activation of 100 to 200% could be observed.

A molecular weight of about 26 500 was determined by the method of column chromatography on Sephadex as well as by calculating the sedimentation coefficient.

Enzymes prepared by different procedures showed similar K_M -values.

Einleitung

Die N-Acetyltransferase aus Lebergewebe des Menschen und verschiedener Säugetiere (Rhesusaffen, Kaninchen, Ratten) acetyliert u. a. das Tuberculostaticum Isonicotinsäurehydrazid zu Acetyl-INH. Coenzym ist Acetylcoenzym A. Es besteht eine positive Korrelation zwischen schneller bzw. langsamer INH-Inaktivierung, niedrigen bzw. hohen INH-Plasmaspiegeln *in vivo* und hoher bzw. niedriger N-Acetyltransferase-Aktivität *in vitro*. Durch Untersuchung verschiedener Spezies (Mensch und Kaninchen) konnte geklärt werden, daß ein genetisch bedingter Polymorphismus für die INH-Acetylierung vorliegt (Bönicke *et al.*², Evans *et al.*^{6–8}, Frymoyer *et al.*⁹, Goedde *et al.*^{10–18}, Schloot *et al.*^{23–31}).

Da auch Serotonin von der N-Acetyltransferase umgesetzt wird, eine hohe Affinität zu dem Enzymprotein hat und die K_M -Werte den K_I -Werten (Hemmung der INH-Acetylierung durch Serotonin) sehr ähnlich sind, kann angenommen werden, daß das Serotonin ein physiologisches Substrat der INH-N-

Acetyltransferase ist (Goedde *et al.*^{10–13, 16}, Schloot *et al.*^{23, 24, 26, 28–31} und Schulte *et al.*³²).

Die Acetylierung von INH und Serotonin durch eine N-Acetyltransferase erfolgt beim Menschen und beim Rhesusaffen (Schloot *et al.*^{23, 28, 30}) und bei dem Kaninchen (Weber *et al.*^{37, 38}) nach einem „Ping-Pong Bi-Bi“-Mechanismus, bei dem zwei Substrate in die Reaktion hineingehen und zwei Produkte entstehen.

In den folgenden Untersuchungen werden neue Anreicherungsmethoden (vgl. Goedde *et al.*^{12, 13}, Jenne¹⁹, Schloot *et al.*^{23, 26, 30} und Weber *et al.*³⁸) beschrieben. Es wurde außerdem mit gereinigten Präparaten das elektrophoretische Verhalten des Enzymproteins studiert und das Molekulargewicht der N-Acetyltransferase aus menschlichem Lebergewebe bestimmt. Um festzustellen, ob zwei unterschiedliche Enzymproteine oder nur eine N-Acetyltransferase für die Acetylierung von Serotonin und INH nachzuweisen sind, wurden K_M -Werte für die INH- und Serotonin-Acetylierung in verschiedenen Anreicherungsstufen verglichen. Der Nachweis genetischer Unterschiede in der Serotonin-Acetylierung

Sonderdruckanforderungen an Privatdozent Dr. W. Schloot und Prof. Dr. H. W. Goedde, Institut für Humangenetik der Universität Hamburg, D-2000 Hamburg 54, Butenfeld 32.

Enzym: Arylamin-Acetyltransferase, Acetyl-CoA: Arylamin-N-Acetyltransferase (EC 2.3.1.5.).

Abkürzungen: INH, Isonicotinsäurehydrazid (Isoniazid); K_M , Michaelis-Menten-Konstante; K_I , Inhibitorkonstante.



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 digitalized 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.

wäre in verschiedener Hinsicht von Interesse, da die Serotonin-Acetylierung u. a. Vorstufe zur Melatonin-Synthese (Epiphyse) ist, ein Stoffwechselweg, der offensichtlich einem circadianen Rhythmus unterliegt.

Material und Methoden

Menschliches Lebergewebe (Autopsiematerial) wurde 2 min homogenisiert und anschließend bei $48000 \times g$ zentrifugiert. Eine Anreicherung des Enzyms N-Acetyltransferase erfolgte durch Säulenchromatographie an einer Pharmacia-Säule $K_{50/100}$ mit Sephadex G-100 durch aufsteigende Chromatographie. Außerdem erfolgte eine Reinigung des Enzymproteins durch präparative Diskelektrophorese (Gerät der Fa. Buchler, USA, Stromstärke 30 bis 40 mA, Spannung 140–200 V, Kühlung 15 °C). Zur Reduktion oxydierender Gruppen im Acrylamidgel sowie zur Stabilisierung der Enzymaktivität wurde 0,25% (v/v) 2-Mercaptoethanol (siehe unten) zugegeben (Davis³, Duesberg *et al.*⁵, Ornstein²²).

Bestimmung der Serotoninacetylierung durch Inkubation von: $2,0 \cdot 10^{-3}$ M Tris-HCl-Puffer, pH 8,0; Serotonin $3 \cdot 10^{-1}$ M ($0,2 \mu\text{Ci}$ [$3\text{-}^{14}\text{C}$] Serotonin), Acetylcoenzym A $8 \cdot 10^{-4}$ M, Enzympräparation 0,05 ml, Gesamtvolumen 0,2 ml; Start mit Acetylcoenzym A; die Inkubation bei 37 °C dauerte 30 min und wurde mit 0,02 ml 20-prozentiger Sulfosalizylsäure abgestoppt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand auf DC-Kieselgel-Fertigplatten mit einem Laufmittel aus Chloroform/Methanol/Eisessig 75:10:15 getrennt. Zur Bestimmung der prozentualen Umsätze in den einzelnen Inkubationsansätzen vergl. Schloot *et al.*³⁰.

Spektrophotometrische Bestimmung der INH-Acetylierung

$1,0 \cdot 10^{-1}$ M Natrium-Diphosphatpuffer pH 9,0, Acetylcoenzym A $8 \cdot 10^{-4}$ M, INH $2,9 \cdot 10^{-3}$ M, 0,1 ml Enzympräparation, Gesamtvolumen 1 ml; E_{313} 1 cm; Reaktionstemperatur 25 °C.

Die K_M -Werte wurden graphisch nach der Methode von Lineweaver und Burk²⁰ (vergleiche Dixon *et al.*⁴) bestimmt.

Die Enzympräparate wurden mit Thioglykolat ($1 \cdot 10^{-2}$ M), 2-Mercaptoethanol ($1 \cdot 10^{-2}$ M) und Cystein ($1 \cdot 10^{-2}$ M) stabilisiert und bei -60 °C gelagert.

Molekulargewichtsbestimmung der N-Acetyltransferase

1. Gelfiltration an Sephadex G-100: Nach Andrews¹ ist zur Molekulargewichtsbestimmung eine

Reinigung und Anreicherung des Enzymproteins nicht notwendig, wenn das Protein durch spezifische Tests im Säuleneluat nachgewiesen werden kann (vgl. Siegel *et al.*³³). Die Molekulargewichtsbestimmung erfolgte an einer Pharmacia-Säule $K_{25/50}$ mit einem Gelvolumen von 220 ml; der Durchfluß wurde auf 25 ml/Stunde (aufsteigend) eingestellt und das Eluat in 5 ml Fraktionen getrennt.

Die Säule wurde mit den Referenzsubstanzen Albumin (Rind), Cytochrom c (Pferd) und Dextranblau geeicht. Die Bestimmung des Elutionsvolumens der N-Acetyltransferase erfolgte durch vier Chromatographieläufe mit einem Probenvolumen von 0,75 ml Präparation I (Proteinkonzentration 10 mg/ml), 0,4 ml Dextranblaulösung und 0,85 ml Tris-HCl-Puffer pH 8,0. Vierte Referenzsubstanz war das Hämoglobin im jeweiligen Homogenat.

Das Molekulargewicht der N-Acetyltransferase wurde durch Auftragen der Mittelwerte der Elutionsvolumina der drei Referenzsubstanzen sowie der N-Acetyltransferase gegen den Logarithmus des Molekulargewichts bestimmt.

2. Das Molekulargewicht wurde außerdem durch Berechnung des Sedimentationskoeffizienten bestimmt. Angereicherte Enzympräparate nach Diskelektrophorese sowie nach Anreicherung mit der Sephadex G-100-Säule wurden in einer Spinco L 2, 65 B/Beckmann, Rotor SW 40 nach Martin *et al.*²¹ zentrifugiert. Dabei kam ein Sucrose-Gradient (1 bis 20%) zur Anwendung.

Ansatz 1 und 2: 20 mg Albumin, 2 mg Cytochrom c und 1 Tropfen Bromphenolblau werden in 2 ml 0,05 M Tris HCl-Puffer gelöst; Ansatz 3 und 4: 0,75 ml Präparation I (10 mg/ml Proteingehalt) werden mit Tris HCl-Puffer auf 2 ml verdünnt; Ansatz 5: Diskelektrophorese-Eluat (Proteingehalt 0,3 mg/ml) wird 1:3 verdünnt; Ansatz 6: Kontrolle. Von jedem Ansatz wurden 0,5 ml aufgetragen. Nach Zentrifugation und Fraktionierung wurden die Testsubstanzen im Spektralphotometer analysiert (Albumin und Bromphenolblau bei 615 nm, Cytochrom c bei 415 nm und Hämoglobin bei 580 nm).

Ergebnisse

Mit der Gelfiltration und der Diskelektrophorese wurde versucht, die N-Acetyltransferase aus menschlichem Lebergewebe höher anzureichern. Die Reinigung durch Ammoniumsulfat-Fällung (Faktor 2 bis 3) und Ionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Cellulose ergibt zu geringe Anreicherungs-werte (Goedde *et al.*¹⁶ und Schloot *et al.*³⁰). Aus Rhesusaffenleber konnte eine hohe Anreicherung, jedoch mit geringer Ausbeute bis ca. 460-fach erreicht werden (Goedde *et al.*^{12, 13} und Schloot *et al.*^{23, 26}).

	[mg/ml]	Spez. Akt.	Faktor	Ausbeute [%]
A. Präparation I	22	13,4	1	100
Gesamtaktivität	0,3–0,1	18,9–247,0	1,4–18,5	20
Spitzenfraktion	0,33	247,0	18,5	3,6
B. Präparation I	22	9,45	1	100
Gesamtaktivität	0,6–0,3	11,6–84,9	1,2–9,0	98,2
Spitzenfraktion	0,47	127,7	13,5	13,2
C. Präparation I	20	10,0	1	100
Gesamtaktivität	0,7–0,28	9,3–164,1	3,5–16,4	70,5
Spitzenfraktion	0,31	180,02	18,0	5

Tab. I. Drei Anreicherungen der N-Acetyltransferase an einer Sephadex G-100-Säule; spezifische Aktivität, Anreicherungsfaktor und Ausbeute.

In Tab. I sind die Werte von verschiedenen Anreicherungen der N-Acetyltransferase an einer Sephadex-Säule zusammengefaßt. Die N-Acetyltransferase wird, wie aus Abb. 1 ersichtlich, von dem übrigen Protein und vom Hämoglobin abgetrennt und weist wenig Fremdprotein auf.

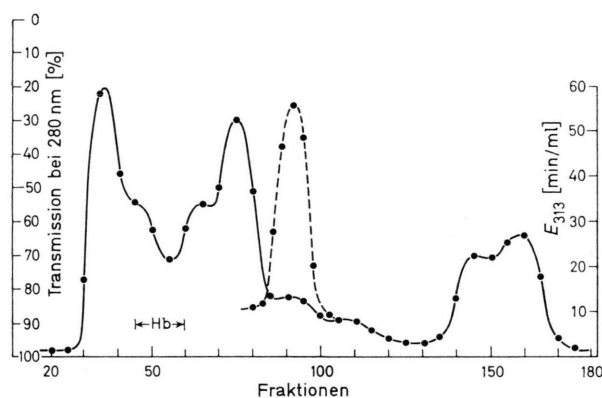


Abb. 1. Elutionsdiagramm nach Gelfiltration an Sephadex G-100; —●— Protein, —○— Aktivität der N-Acetyltransferase.

Da die N-Acetyltransferase wenig stabil ist, wurde eine Anreicherung mit der vergleichsweise schnelleren präparativen Diskelektrophorese durchgeführt. Dabei sollte außerdem das Enzym im elektrischen Feld untersucht werden (Goedde *et al.*¹³, Schloot *et al.*²⁶), um zu prüfen, ob eine Trennung der N-Acetyltransferase-Aktivität in zwei Enzymproteine „INH-Acetyltransferase“ und „Serotonin-N-Acetyltransferase“ möglich ist. Mit der Methode der Elektrofocussierung zur Charakterisierung und Bestimmung des isoelektrischen Punktes der N-Acetyltransferase denaturiert das Enzym (Deppermann, unveröffentlicht). Die N-Acetyltransferase wird in der präparativen Diskelektrophorese als scharfe Bande deutlich vom Hämoglobin ge-

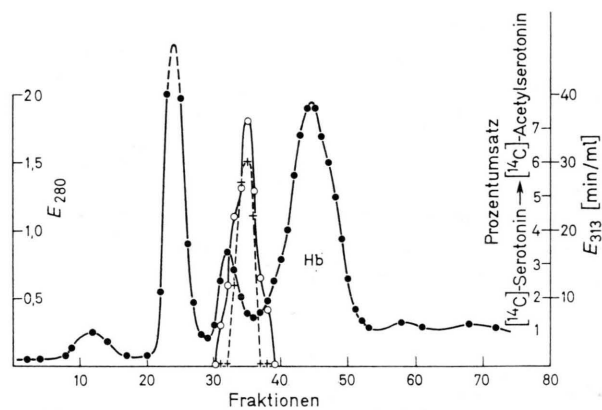


Abb. 2. Anreicherung der N-Acetyltransferase mit der präparativen Diskelektrophorese: Elutionsdiagramm —●— Protein, —○— INH-N-Acetyltransferase, —+— 5-HT-N-Acetyltransferase.

trennt (Abb. 2). Alle Fraktionen, in denen eine INH-N-Acetyltransferaseaktivität nachgewiesen werden konnte, wurden auch auf Serotonin-Acetylierung geprüft. In derselben Fraktion konnten jeweils sowohl die maximalen Aktivitäten für die Serotonin-Acetylierung als auch für die INH-Acetylierung nachgewiesen werden. Die Elutionsdiagramme sind hinsichtlich der INH- und Serotonin-Acetylierung annähernd gleich. Dieses Ergebnis ist ein weiterer Hinweis darauf, daß im menschlichen Lebergewebe, wie bei Rhesusaffen eine N-Acetyltransferase sowohl INH als auch Serotonin acetyliert (vgl. Schloot *et al.*^{23, 28–30}).

Die Anreicherungswerte mit der präparativen Diskelektrophorese sind in Tab. II zusammengestellt. Bei Zugabe von 0,5-prozentigem 2-Mercaptoäthanol (v/v) waren in allen Versuchen die Aktivitätsausbeuten gleich hoch. Die präparative Diskelektrophorese ist also eine schnelle und schonende Methode zur Reinigung des Enzyms.

	[mg/ml]	Spez. Akt.	Faktor	Ausbeute [%]
A. Präparation I	28,0	6,3	1	100
Spitzenfraktion	1,0	278,9	44	56
Gesamtaktivität	—	—	—	110
B. Präparation I	30	2,8	1	100
Spitzenfraktion	0,31	120,7	43	23
Gesamtaktivität	0,6–0,3	20,4–120,7	7–43	95
C. Präparation I	30	2,8	1	100
Spitzenfraktion	1,0	60,0	21,5	39
Gesamtaktivität	1,6–0,7	7,3–60,0	3–21,5	106
(Mittelwert)	1,25	26,2	9	—

Tab. II. Drei Anreicherungen der N-Acetyltransferase mit der präparativen Diskelektrophorese; spezifische Aktivität, Anreicherungsfaktor und Ausbeute.

Eine Stabilisierung der N-Acetyltransferase wurde außer mit Mercaptoäthanol auch mit Thioglykolat und Cystein geprüft. Nach drei Wochen Lagerung bei -60°C wurden in verschiedenen gereinigten Enzympräparaten die prozentualen Restaktivitäten der N-Acetyltransferase bestimmt. Die Proben ohne Zusatz verloren in diesem Zeitraum ca. 60–80% der Ausgangsaktivität, während durch 2-Mercaptoäthanol, Thioglykolat und Cystein ein Aktivitätsverlust verhindert wurde; gelegentlich erfolgte eine Aktivierung um 100–200%.

Zur Molekulargewichts-Bestimmung wurden die Elutionsdiagramme für die N-Acetyltransferase und die Referenzsubstanzen Blue Dextran, Albumin, Hämoglobin, Cytochrom c ermittelt und die Mittelwerte für die Elutionsvolumina der getesteten Substanzen bestimmt.

Durch Auftragung der Mittelwerte der Elutionsvolumina gegen den Logarithmus der entsprechenden Molekulargewichte (Andrews¹) wurde für die N-Acetyltransferase ein Molekulargewicht von

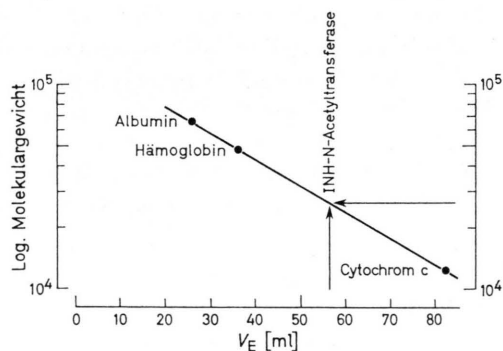


Abb. 3. Berechnung des Molekulargewichts der N-Acetyltransferase. Abszisse: Mittelwerte aller Elutionsvolumina V_E (ml), Ordinate: Logarithmus des Molekulargewichts. Elutionsvolumen der N-Acetyltransferase $V_D = 56,5$ ml $\hat{=}$ MG 26 500.

26500 bestimmt (Abb. 3, vgl. auch Tab. III). Diese Methode ist bei der Bestimmung globulärer Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 10000 und 150000 mit einem Unsicherheitsfaktor von $\pm 10\%$ behaftet (Andrews¹).

Tab. III. Molekulargewicht der N-Acetyltransferase und verschiedener Referenzsubstanzen mittels Gelfiltration (Sephadex G-100).

	V_E [ml]	MG
Albumin	26,0	65.000
Hämoglobin	36,4	48.000 *(64.000)
N-Acetyltransferase	56,5	26.500
Cytochrom c	82,5	12.400

* Mittelwert aus 64.000 und 32.000.

Der niedrige Wert für das Molekulargewicht von Hämoglobin könnte durch Dissoziation des Hämoglobinmoleküls in zwei Moleküle von je 32000 MG (α - und β -Kette) erklärt werden.

$$1 \text{ Hämoglobin } 64000 \begin{bmatrix} \alpha & \alpha \\ \beta & \beta \end{bmatrix} \rightleftharpoons 2 \text{ Hämoglobin } 32000 \begin{bmatrix} \alpha \\ \beta \end{bmatrix}.$$

Zur Bestimmung des Molekulargewichts der N-Acetyltransferase wurde außerdem der Sedimentationskoeffizient nach Martin *et al.*²¹ berechnet (Abb. 4). Dabei ergeben sich für die N-Acetyltransferase ein Molekulargewicht von 26755 und für Hämoglobin von 35710 entsprechend der Größenordnung eines Hämoglobinmoleküls aus einer α - und einer β -Kette von 32000.

Zur weiteren Untersuchung, ob die Acetylierung von Serotonin und INH durch ein Enzym erfolgt, wurden die K_M -Werte in verschiedenen Anreicherungsstufen bestimmt. Bei zwei verschiedenen

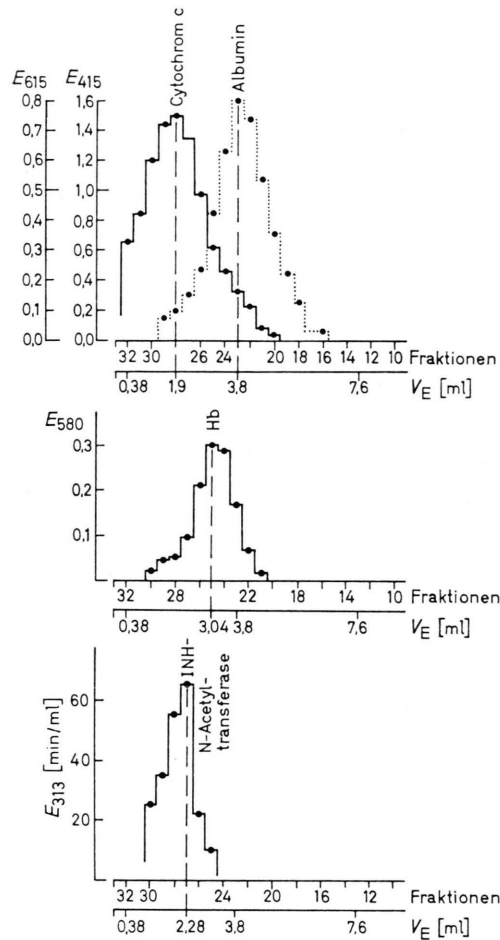


Abb. 4. Bestimmung des Molekulargewichts der N-Acetyltransferase/Ermittlung des Sedimentationskoeffizienten: Elutionsdiagramm von Cytochrom c, Albumin, Hämoglobin und der N-Acetyltransferase.

Enzymproteinen sollte bei Anwendung verschiedener Anreicherungsverfahren bei unterschiedlichen Anreicherungsstufen eine Auftrennung in eventuell unterschiedliche K_M -Werte erfolgen. In Tab. IV sind die K_M -Werte verschiedener Anreicherungsstufen für das Substrat INH (Coenzym: CoASHAc) zusammengestellt. Die Werte unterscheiden sich nur geringfügig. Die Differenzen liegen innerhalb der

Tab. IV. K_M der N-Acetyltransferase in verschiedenen Anreicherungsstufen; Substrat INH; Coenzym: CoASHAc; pH 9,0.

Präparation I	Sephadex G-100	Diskelektrophorese
$2,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	$5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	$4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$
	$6,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	$3,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$
	Mittelwert:	
	$5,75 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	$3,75 \cdot 10^{-4} \text{ M}$

Fehlerbreite der Bestimmungsmethode. Auch bei Bestimmung der K_M -Werte von Serotonin konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Anreicherungsstufen mit Sephadex G-100 oder mit der präparativen Diskelektrophorese ermittelt werden (Tab. V).

Tab. V. K_M der N-Acetyltransferase in verschiedenen Anreicherungsstufen; Substrat Serotonin; Coenzym: CoASHAc.

Sephadex G-100	Diskelektrophorese
$2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ (pH 7,4)	$2,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ (pH 7,4)
	$4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ (pH 8,0)

Die verschiedenen pH-Werte haben in diesem pH-Bereich auf Grund anderer Versuche keinen wesentlichen Einfluß auf die Affinität des Substrats zu der N-Acetyltransferase.

Diskussion

Bisher waren nur vorläufige unpublizierte Werte des Molekulargewichts der N-Acetyltransferase (ca. 37000) bekannt (l.c. Weber³⁶). Mit Hilfe der Säulenchromatographie und der Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten konnten nun übereinstimmende Werte eines Molekulargewichts von ca. 26500 ermittelt werden.

Eine Trennung der N-Acetyltransferase in eine „INH-“ und eine „Serotonin-N-Acetyltransferase“ kann auch in der Elektrophorese nicht nachgewiesen werden. Verschiedene Proteinfractionen nach präparativer Diskelektrophorese katalysieren sowohl die INH- als auch die Serotonin-Acetylierung. Die maximalen Enzymaktivitäten für die INH- und Serotonin-Acetylierung finden sich in denselben Fraktionen. Die Elutionsprofile sind unter Berücksichtigung der verschiedenen Testmethoden ähnlich. Auch die Affinität des Enzymproteins nach unterschiedlichen Anreicherungsverfahren gegenüber den Substraten INH und Serotonin (K_M -Mittelwerte: $3,4 \cdot 10^{-4}$ bzw. $2,8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) sowie die den K_M -Werten ähnlichen K_I -Werte bei kompetitiver Inhibition durch INH bzw. Serotonin sprechen dafür, daß nur ein Enzym INH und Serotonin acetyliert (Schloot *et al.*^{23, 28, 30}). Die Serotonin-Acetylierung und die kompetitive Inhibition der INH-Acetylierung durch Serotonin ($1,2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) wurde von uns bereits früher nachgewiesen (Goedde *et al.*^{10, 12, 13, 16}; Schloot *et al.*^{23, 28-31}).

Die hier vorgelegten Ergebnisse belegen, daß eine weitere Trennung in verschiedene N-Acetyl-

transferasen mittels der Diskelektrophorese und der Gelchromatographie nicht möglich ist. Damit wird unsere Hypothese weiter abgesichert, daß INH und Serotonin von einem Enzym acetyliert werden. Auch Steinberg *et al.*³⁴ fanden eine positive Korrelation der spezifischen Anreicherungsstufen für INH, Sulphamethazin und Sulphacetamid sowie Serotonin.

Für hervorragende technische Mitarbeit danken wir Herrn Gregor Klitscher.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Stiftung Volkswagenwerk und dem Fond der Chemischen Industrie für die Unterstützung der Arbeit.

- ¹ P. Andrews, *Biochem. J.* **91**, 22 [1964].
- ² R. Bönicke u. B. P. Lisboa, *Naturwissenschaften* **44**, 314 [1957].
- ³ B. J. Davis, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**, 404 [1964].
- ⁴ M. Dixon u. E. C. Webb, *Enzymes*, Longmans London sec. ed., 1966.
- ⁵ P. H. Duesberg u. R. R. Rückert, *Anal. Biochem.* **11**, 342 [1965].
- ⁶ D. A. P. Evans, *Amer. J. Med.* **34**, 639 [1963].
- ⁷ D. A. P. Evans, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **151**, 723–733 [1968].
- ⁸ D. A. P. Evans, K. Manley u. V. A. McKusick, *Brit. Med. J.* **II**, 485 [1960].
- ⁹ J. W. Frymoyer u. R. F. Jacox, *J. Clin. Invest.* **44**, 1992 [1965].
- ¹⁰ H. W. Goedde, 9. Tagung Deutsche Ges. f. Anthropologie u. Humangenetik, Freiburg, 7.–9. Okt. 1965 a und
- ¹¹ *Homo* Tagungsband p. 68–73, 1966.
- ¹² H. W. Goedde, K. Altland u. W. Schloot, *Conf. on „Pharmacogenetics“*, N. Y. Academy of Sci., N. Y., USA, 5.–6. 10. 1967 a und
- ¹³ *Ann. N. Y. Acad. of Sci.* **151**, 742–752 [1968].
- ¹⁴ H. W. Goedde, W. Schloot u. A. Valesky, *Angew. Chemie* **77**, 1020 [1965 b].
- ¹⁵ H. W. Goedde, W. Schloot u. A. Valesky, *Arzneim.-Forsch.* **16**, 1030 [1966].
- ¹⁶ H. W. Goedde, W. Schloot u. A. Valesky, *Biochem. Pharmacol.* **16**, 1793–1799 [1967 b].
- ¹⁷ H. W. Goedde, E. Schoepf u. D. Fleischmann, *Biochem. Pharmacol.* **13**, 1671 [1964 a].
- ¹⁸ H. W. Goedde, E. Schoepf, D. Fleischmann u. R. Hoffbauer, *Humangenetik* **1**, 141 [1964 b].
- ¹⁹ J. W. Jenne, *J. Clin. Invest.* **44**, 1992 [1965].
- ²⁰ H. Lineweaver u. D. Burk, *J. Amer. Chem. Soc.* **11**, 658 [1934].
- ²¹ R. G. Martin u. B. N. Ames, *J. Biol. Chem.* **236**, 1371 [1961].
- ²² L. Ornstein, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**, 321 [1964].
- ²³ W. Schloot, *Pharmakogenetische und biochemische Untersuchungen einer N-Acetyltransferase*, Habilitationsschrift, Universität Hamburg 1970.
- ²⁴ W. Schloot, *Proc. 13th International Congress of Pediatrics* **V**, 395–402 [1971].
- ²⁵ W. Schloot, K. G. Blume, G. Flatz, H. W. Goedde u. M. Bhaibulaya, *Humangenetik* **4**, 274–279 [1967].
- ²⁶ W. Schloot u. H. W. Goedde, *Tag. Ges. f. Biol. Chem.* 2.–3. Okt., Frankfurt/Main, und Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.* **348**, 1224 [1967 a].
- ²⁷ W. Schloot u. H. W. Goedde, *Acta Genetica* **18**, 394–398 [1968].
- ²⁸ W. Schloot u. H. W. Goedde, *Humangenetik* **9**, 208 [1970].
- ²⁹ W. Schloot, E.-H. Schulte u. H. W. Goedde, *Abstr. Comm. Meet. FEBS* **8**, 331 [1972].
- ³⁰ W. Schloot, F.-J. Tigges, H. Blasner u. H. W. Goedde, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **350**, 1353–1361 [1969].
- ³¹ W. Schloot, A. Valesky u. H. W. Goedde, *FEBS*, 4.–7. April, Warschau 1966.
- ³² E. H. Schulte, W. Schloot u. H. W. Goedde, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **351**, 10324 [1970].
- ³³ L. M. Siegel u. K. J. Monty, *Biochim. Biophys. Acta* **112**, 346–362 [1966].
- ³⁴ M. S. Steinberg, S. N. Cohen u. W. W. Weber, *Biochim. Biophys. Acta* **184**, 210 [1969].
- ³⁵ S. Sunahara, M. Urano u. K. Kawait, *Tokyo Nat. Chest. Hosp. Ann. Rep.* 1963.
- ³⁶ W. W. Weber, *Handbook Pharmacol.* (ed. B. B. Brodie and J. R. Gilette), Springer, Heidelberg 1971.
- ³⁷ W. W. Weber u. S. N. Cohen, *Mol. Pharmacol.* **3**, 266–273 [1967].
- ³⁸ W. W. Weber, S. N. Cohen u. M. S. Steinberg, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **151**, 734–741 [1968].