

BBA 8256

## DIE OXYDATION VON ADENOSINDERIVATEN ZU $N^1$ -OXYDEN UND DER EINBAU VON ADP- $N^1$ -OXYD IN POLY-A DURCH BAKTERIEN-ROHEXTRAKTE

F. CRAMER, K. RANDERATH UND E. A. SCHÄFER

*Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule,  
Darmstadt (Deutschland)*

(Eingegangen am 28 November 1962)

---

### SUMMARY

*Oxidation of adenosine derivatives to  $N^1$ -oxides and the incorporation of ADP- $N^1$ -oxide in poly-A by crude bacterial extracts*

ADP- $N^1$ -oxide is prepared from ADP by oxidation with perphthalate at pH 7 in 49% yield. The  $N$ -oxide is incorporated into poly-A by extracts of *Azotobacter vinelandii* as shown from the isolated polynucleotide.

---

### EINLEITUNG

Als Substrate der Polynucleotid-Phosphorylase<sup>1</sup> können außer den vier natürlichen Ribonucleosid-diphosphaten auch chemisch modifizierte unnatürliche Nucleosid-diphosphate dienen (vgl. Tabelle I). Da bisher noch keine Derivate des ADP in die enzymatische Reaktion eingesetzt worden sind, haben wir die Synthese des ADP- $N^1$ -Oxydes und sein Verhalten bei der enzymatischen Poly-A-Synthese studiert.

Adenin und seine Derivate lassen sich durch Wasserstoffperoxyd bzw. Persäuren zu ihren  $N^1$ -Oxyden oxydieren. Während die Oxydation von Purinderivaten zu ihren  $N^1$ -Oxyden von BROWN und Mitarbeitern<sup>2-7</sup> sowie von CRAMER UND RANDERATH<sup>8</sup> mit  $H_2O_2$ -Essigsäure durchgeführt wurden, benutzten FREDERIKSEN UND KLENOW<sup>9-11</sup> Monoperphthalsäure zur Oxydation von Desoxyadenosin und von Desoxy-AMP bei pH 5. Da die Reaktion bei der Verwendung dieses Oxydationsmittels wesentlich rascher und unter milden Bedingungen verläuft, schien uns Monoperphthalsäure für die Oxydation von ADP geeigneter als  $H_2O_2$ -Essigsäure zu sein. Weiterhin wollten wir prüfen, ob die Oxydation auch bei neutralem pH-Wert durchführbar ist.

### MATERIALIEN UND METHODEN

Nucleotide waren Präparate der Fa. Sigma, Chem. Comp., St. Louis, Mo. (U.S.A.). Die Monoperphthalsäure wurde nach PAYNE<sup>29</sup> dargestellt.

#### *Oxydation von ADP mit Natriummonoperphthalat*

3 mMol Monoperphthalsäure in 9.4 ml Diäthyläther wurden zu etwa 5 ml Wasser gegeben. Das Gemisch wurde gerührt und nach dem Verdampfen des Äthers mit 1 N

TABELLE I

ÜBERSICHT ÜBER DAS VERHALTEN VERSCHIEDENER  
NUCLEOSID-5'-PYROPHOSPHATE GEGENÜBER POLYNUCLEOTID-PHOSPHORYLASE (EC 2.7.7.8)

<i>Nucleosidpyrophosphat</i>	<i>Gebildete Polymere</i>	<i>Hemmung von</i>	<i>Literatur- stelle</i>
Adenosin-5'-pyrophosphat	Poly-A + Mischpolymere		1
Guanosin-5'-pyrophosphat	Poly-G mit Starter + Mischpolymere		12
Cytidin-5'-pyrophosphat	Poly-C + Mischpolymere		1
Uridin-5'-pyrophosphat	Poly-U + Mischpolymere		1
Inosin-5'-pyrophosphat	Poly-I + Mischpolymere		1
Purinribosid- 5'-pyrophosphat	keine Reaktion		13
6-Mercaptopurinribosid- 5'-pyrophosphat		Poly-A- Synthese	14
8-Azaguanosin- 5'-pyrophosphat	Poly-Aza-G mit Starter pApApA		15
Ribothymidin- 5'-pyrophosphat	Poly-T mit Starter pApApA		16
6-Azauridin- 5'-pyrophosphat		Poly-U- Synthese; Phosphataustausch bei UDP und ADP	17, 18, 19
3-Methyl-6-azauridin- 5'-pyrophosphat		Phosphataustausch bei UDP	20
3-Methyluridin- 5'-pyrophosphat	Poly-3-Methyl-U		21
2-Thiouridin- 5'-pyrophosphat	Poly-Thio-U + Mischpolymere		22, 23
5-Fluoruridin- 5'-pyrophosphat	Poly-Fluor-U(?)	Polyribonucleotid- Synthese(?)	24, 25
5-Chloruridin- 5'-pyrophosphat	Poly-Chlor-U		26
5-Bromuridin- 5'-pyrophosphat	Poly-Brom-U		26
5-Joduridin- 5'-pyrophosphat	Poly-Jod-U		26
1- $\beta$ -D-Arabinosyl-uracil- 5'-pyrophosphat		Poly-U- Synthese; Phosphataustausch bei UDP	26
5,6-Dihydrouridin- 5'-pyrophosphat	keine Reaktion		21
Desoxycytidin- 5'-pyrophosphat		Poly-A- Synthese; Poly-C- Synthese	28

Natronlauge neutralisiert. Zu dieser Lösung wurde eine wässrige ADP-Lösung ( $485.2 \text{ mg} = 1 \text{ mMol ADP-NaH}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$  in 5 ml Wasser gelöst und mit 1 N Natronlauge neutralisiert) gegeben. Die Lösung blieb bei Raumtemperatur stehen. Während der Reaktion wurde der pH-Wert der Lösung durch Zugabe von 1 N Natronlauge auf 7.0–7.4 gehalten. Der Reaktionsverlauf wurde ultraviolett-spektroskopisch verfolgt. Hierzu wurde die Lösung mit Tris-Puffer (0.05 M, pH 7.0) im Verhältnis 1:2500 verdünnt. Mit einem Zeiss PMQ II-Spektralphotometer wurden die Extinktionen gegen den gleichen Puffer gemessen. Das Verhältnis der Extinktionen bei  $233 \text{ m}\mu$  und  $260 \text{ m}\mu$  stieg im Verlaufe von 5 Std von 1.9 auf einen konstanten Wert von etwa 4.8.

*Papierchromatographie:* Papier, Ederol 202\*, getränkt mit 1% iger Ammonsulfatlösung. Laufmittel: Isopropanol–1%-ige Ammonsulfatlösung (2:1, V/V)<sup>30</sup>, aufsteigend. Zusätzlich zur Reaktionslösung wurden jeweils  $2 \mu\text{l}$  0.1 M EDTA-Lösung aufgebracht.  $R_F$ -Werte siehe Ref. 5. Phthalsäure und Monoperphthalsäure laufen unter diesen Bedingungen in Front. Nachweis der Verbindungen im kurzwelligen Ultraviolett-Licht ( $254 \text{ m}\mu$ ).

Die Lösung wurde auf 6 Filterkartons (Schleicher und Schüll 2071\*\*) als schmale Streifen aufgetragen und 20 Std aufsteigend mit Methanol–Wasser (7:3, V/V) chromatographiert. Phthalsäure und Monoperphthalsäure wandern unter diesen Bedingungen als breites Band schneller als die Nucleotide. Die Nucleotide befinden sich in einer Zone, die sich vom Start bis zu einem  $R_F$ -Wert von etwa 0.3 erstreckt. Diese wurde in kleine Streifen geschnitten und die Nucleotide wurden dreimal 24 Std mit je 175 ml dest. Wasser bei Raumtemperatur eluiert.

*Reinigung durch Säulenchromatographie:* 200 g Dowex-1, 200–400 mesh, Chloridform\*\*\*, wurden nach Abdekantieren der feinsten Partikel in die Bicarbonatform überführt<sup>31</sup>. Hierzu wurde im Becherglas mit 8% iger Natriumbicarbonatlösung chloridfrei gewaschen. Die in üblicher Weise hergestellte Säule (Durchmesser 2.3 cm, Höhe 36 cm) wurde mit 300 ml Wasser nachgewaschen.

Nach dem Aufgeben der Nucleotidlösung wurde mit 400 ml Wasser nachgewaschen (Ausflusgeschwindigkeit etwa 2.5 ml/min).

Es wurde mit Kaliumhydrogencarbonatlösung (linearer Gradient, vgl. Fig. 1) eluiert. Die Ausflusgeschwindigkeit betrug zu Beginn etwa 3 ml/min. Sie sank während der Elution kontinuierlich auf etwa 1.4 ml/min. Mit Hilfe eines Fraktionsammlers wurden 15-ml Fraktionen aufgefangen. Zur Charakterisierung der Fraktionen diente das Ultraviolett-Spektrum (Messung der Extinktionen jeweils bei  $233 \text{ m}\mu$  und  $260 \text{ m}\mu$ ). Diejenigen Fraktionen des Hauptgipfels, welche ein Absorptionsverhältnis  $A_{233}/A_{260} > 4.4$  aufwiesen, wurden vereinigt und mit 375 ml Kationenaustauscher Merck I§ (H<sup>+</sup>-Form) unter Eiskühlung 40 Min lang gerührt. Dann wurde vom Austauscher abfiltriert, gründlich mit dest. Wasser nachgewaschen und das Filtrat mit 1 N Natronlauge neutralisiert.

\* Firma Binzer, Hatzfeld/Eder.

\*\* Firma Schleicher und Schüll, Dassel, Krs. Einbeck.

\*\*\* Fa. Dow Chemical Comp., Midland, Mich. (U.S.A.).

§ Fa. E. Merck AG., Darmstadt.

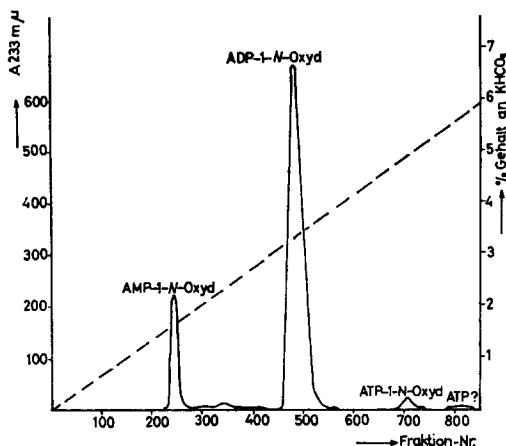


Fig. 1. Säulenchromatographische Reinigung der Reaktionsgemische an einer Dowex-1-Säule (Bicarbonatform). Experimentelle Bedingungen s. Text. —, Absorption; - - -,  $\text{KHCO}_3$ -Gradient.

**Papierchromatographie:** Papier und Laufmittel: s.o. Das Chromatogramm zeigte 2 Flecke mit den  $R_F$ -Werten von ADP- $N^1$ -Oxyd und AMP- $N^1$ -Oxyd. Die quantitative Auswertung nach Elution ergab, daß die Lösung neben etwa 96% ADP- $N^1$ -Oxyd etwa 4% AMP- $N^1$ -Oxyd enthielt.

Das Volumen der Lösung betrug 1100 ml. Die Lösung kann im Rotationsverdampfer oder durch Gefriertrocknung konzentriert werden.

**Spektroskopische Bestimmung der Ausbeute:** Die Lösung wurde mit Tris-Puffer (0.05 M, pH 7.0) im Verhältnis 1:10 verdünnt. Sie zeigte die typischen Maxima bei 232.5  $m\mu$  und 261–262  $m\mu$  (Siehe Ref. 2). Zur Konzentrationsbestimmung wurde der Extinktionskoeffizient<sup>2</sup>  $\epsilon_{232.5} = 40.8 \cdot 10^3$  benutzt.

Die Lösung enthielt 487 mMol ADP- $N^1$ -Oxyd entsprechend 48.7% d.Th.

Das ADP- $N^1$ -Oxyd läßt sich analog den anderen Nucleosid-diphosphaten aus konzentrierter neutraler Lösung mit Aceton als Natriumsalz oder aus ammoniakalischer Lösung (pH 8–8.5) als Bariumsalz fällen.

### Enzymatische Einbauversuche von ADP- $N^1$ -Oxyd in Polyribonucleotide

Die Züchtung von *Azotobacter vinelandii*\* und die Herstellung der Bakterienrohextrakte erfolgte wie früher beschrieben<sup>32</sup>, die Proteinbestimmung nach der Biuret-methode<sup>33</sup>.

Reaktionsansätze:

1. ADP (5  $\mu\text{Mol}$ ), ATP (5  $\mu\text{Mol}$ ),  $\text{MgCl}_2$  (2.5  $\mu\text{Mol}$ ), Tris-Puffer (100  $\mu\text{Mol}$ ), Azotobacter-Rohextrakt (0.1 mg Protein).
2. ADP (5  $\mu\text{Mol}$ ), ATP (5  $\mu\text{Mol}$ ), ADP- $N^1$ -Oxyd (1  $\mu\text{Mol}$ ),  $\text{MgCl}_2$  (2.5  $\mu\text{Mol}$ ), Tris-Puffer (100  $\mu\text{Mol}$ ), Azotobacter-Rohextrakt (0.1 mg Protein).
3. ADP (5  $\mu\text{Mol}$ ), ATP (5  $\mu\text{Mol}$ ), ADP- $N^1$ -Oxyd (5  $\mu\text{Mol}$ ),  $\text{MgCl}_2$  (2.5  $\mu\text{Mol}$ ), Tris-Puffer (100  $\mu\text{Mol}$ ), Azotobacter-Rohextrakt (0.1 mg Protein).

\* Bearbeitet von Dipl.-Chem. R. KLETT.

4. ADP (5  $\mu$ Mol), ATP (5  $\mu$ Mol), ADP- $N^1$ -Oxyd (25  $\mu$ Mol),  $MgCl_2$  (2.5  $\mu$ Mol), Tris-Puffer (100  $\mu$ Mol), Azotobacter-Rohextrakt (0.1 mg Protein).
5. ATP (5  $\mu$ Mol), ADP- $N^1$ -Oxyd (5  $\mu$ Mol),  $MgCl_2$  (2.5  $\mu$ Mol), Tris-Puffer (100  $\mu$ Mol), Azotobacter-Rohextrakt (0.1 mg Protein).
6. ADP- $N^1$ -Oxyd (5  $\mu$ Mol),  $MgCl_2$  (2.5  $\mu$ Mol), Tris-Puffer (100  $\mu$ Mol), Azotobacter-Rohextrakt (0.1 mg Protein).

Wir verwendeten 2.5 M Tris-Puffer (pH 8.1). Das Endvolumen betrug bei allen Ansätzen 0.5 ml.

Den Ansätzen wurde ein Tropfen Toluol zugesetzt. Alle Reaktionen wurden bei 30° im Thermostaten durchgeführt.

*Papierchromatographie:* Papier und Laufmittel s.o. Nach 1, 3, 5, 11, 24, 34, 51, 59, 75 und 100 Std wurden je 20  $\mu$ l mit einer Mikropipette aus den Ansätzen entnommen und aufgetragen. Zusätzlich wurden auf jeden Startfleck 5  $\mu$ l 0.1 M EDTA-Lösung aufgebracht. Die am Start zurückgebliebenen ultraviolett-absorbierenden Substanzen wurden nach RANDERATH UND CRAMER<sup>32</sup> eluiert und gemessen.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### *Oxydationsversuche*

Wie unsere Ergebnisse zeigen, lassen sich Adenin-Nucleotide durch Oxydation mit einem dreifach molaren Überschuss an Natrium-monoperphthalat bei pH 7 und Raumtemperatur in einigen Stunden zu ihren  $N^1$ -Oxyden oxydieren. Infolge der milden Reaktionsbedingungen tritt praktisch keine Hydrolyse der Polyphosphate auf. Der Verlauf der Reaktion kann ultraviolett-spektroskopisch und papierchromatographisch verfolgt werden. Das charakteristische Ultraviolett-Spektrum der  $N^1$ -Oxyde (Maximum bei 232.5  $m\mu$ <sup>2</sup>) läßt auch Spuren dieser Verbindungen im Gemisch mit Adenin-Nucleotiden eindeutig nachweisen.

Bei der Papierchromatographie erwies sich von einer Reihe untersuchter Laufmittel das Gemisch Isopropanol-1% Ammonsulfatlösung (2:1, V/V)<sup>30</sup> als am besten geeignet.

Um den Überschuss an Phthalsäure und Perphthalsäure zu entfernen, haben wir das Reaktionsgemisch durch Chromatographie an Filterkarton (Schleicher und Schüll 2071) mit Methanol-Wasser (7:3, V/V) als Laufmittel vorgereinigt. Zur präparativen Auftrennung des Reaktionsgemisches verwendeten wir dann bei der Chromatographie an einer Anionenaustauschersäule das Bicarbonatsystem nach MARTONOSI<sup>31</sup>. Es ergab sich das in Fig. 1 gezeigte Elutionsdiagramm. Das überschüssige Bicarbonat wurde aus der Hauptfraktion mit einem sauren Kationenaustauscher entfernt. In der so erhaltenen Lösung konnte papierchromatographisch eine geringe Verunreinigung des ADP- $N^1$ -Oxyds durch AMP- $N^1$ -Oxyd (etwa 4%) nachgewiesen werden.

Zur Berechnung der Gesamtausbeute an ADP- $N^1$ -Oxyd verwendeten wir den in der Literatur<sup>2</sup> für Adenosin- $N^1$ -Oxyd angegebenen Extinktionskoeffizienten:  $\epsilon_{232.5} = 40.8 \cdot 10^3$ . Die Berechtigung hierzu ergibt sich daraus, daß die Extinktionskoeffizienten von Nucleosiden und Nucleotiden mit gleichen Nucleobasen praktisch gleich sind<sup>34</sup>.

Wir berechneten eine Ausbeute von 48.7 % d.Th.für ADP- $N^1$ -Oxyd.

*Enzymatische Versuche*

Zu den Ansätzen, die ADP, ATP,  $MgCl_2$  and Tris-Puffer (1:1:0.5:20) sowie Rohextrakt enthielten, wurde ADP- $N^1$ -Oxyd in verschiedenen Verhältnissen gegeben (ADP:ADP- $N^1$ -Oxyd, 5:1, 1:1 und 1:5). Ein Ansatz enthielt kein ADP, ein weiterer kein ADP und kein ATP. Der Verlauf der Reaktion wurde papierchromatographisch verfolgt. Die am Start zurückbleibenden Substanzen wurden mit Tris-Puffer eluiert und ihre Spektren aufgenommen.

Unsere Ergebnisse zeigen daß der Rohextrakt neben ATP:AMP Phosphotransferase (EC 2.7.4.3)<sup>35</sup> auch Nucleosid-Diphosphatkinase (EC 2.7.4.6)<sup>36</sup> enthält, da in Ansätzen, die nur ATP und ADP- $N^1$ -Oxyd, aber kein ADP enthalten, bereits unmittelbar nach Zugabe des Rohextraktes relativ große Mengen ADP und ATP- $N^1$ -Oxyd papierchromatographisch gefunden werden. Das Gleichgewicht  $ATP + ADP-N^1-Oxyd \rightleftharpoons ATP-N^1-Oxyd + ADP$  stellt sich praktisch momentan ein. Um die Frage zu klären, ob ADP- $N^1$ -Oxyd enzymatisch in Polynucleotide eingebaut wird, wurden die Spektren der am Start zurückgebliebenen Substanzen aufgenommen. Dabei ergab sich, daß die Polymeren aus den Ansätzen 3 und 4 deutliche Maxima bei 233  $m\mu$  aufweisen. Bei Ansatz 3 war das Verhältnis  $A_{233}/A_{260} < 1$ , bei Ansatz 4  $> 1$ , vgl. Fig. 2.

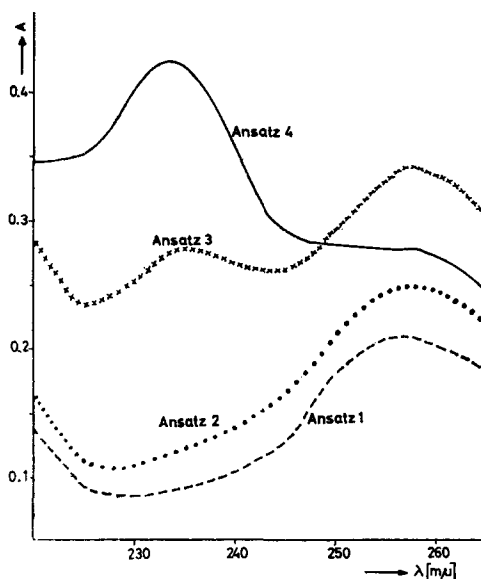


Fig. 2. Enzymatischer Einbau von Adenin- $N^1$ -Oxyd in Poly-A. Ultraviolett-Spektren der bei der Papierchromatographie am Start zurückbleibenden Substanzen. Ansatz 1: kein ADP- $N^1$ -Oxyd; Ansatz 2: ADP- $N^1$ -Oxyd: ADP = 1:5; Ansatz 3: ADP- $N^1$ -Oxyd: ADP = 1:1; Ansatz 4: ADP- $N^1$ -Oxyd: ADP = 5:1; Reaktionsdauer: 100 Std.

Die Reaktionslösung von Ansatz 4 wurde nach 100 Std Reaktionsdauer bei 0° gegen 3 l 0.01 M Tris-Puffer (pH 7.0) 30 Std dialysiert. Das Dialysat zeigte ein deutliches Maximum bei 233  $m\mu$ . Nach diesen Ergebnissen wird das  $N$ -Oxyd in das Polymer eingebaut. Inkubiert man ADP- $N^1$ -Oxyd ohne ADP und ATP unter unseren Bedingungen mit dem Rohextrakt (Ansatz 6), so läßt sich das Auftreten von Poly-

nucleotiden erst nach einer Latenzperiode von etwa 100 Std nachweisen. Die Spektren der am Start des Chromatogramms zurückbleibenden Substanzen zeigten deutliche Maxima bei 233 m $\mu$ . Bei Ansatz 5 tritt infolge der durch Nucleosid-Diphosphatkinase katalysierten ADP-Bildung nur eine kurze Latenzperiode (6 Stunden) der Polynucleotid-Synthese auf; bei Ansatz 4 dauert die Latenzperiode 50 Stunden.

Der Verlauf der Einbaureaktionen läßt sich nach alkalischem Abbau des Polynucleotids quantitativ verfolgen. Hierüber soll in einer späteren Arbeit berichtet werden.

## DANK

Die Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Bundesministerium für Atomkernenergie und Wasserwirtschaft unterstützt.

## ZUSAMMENFASSUNG

ADP- $N^1$ -Oxyd läßt sich aus ADP durch Oxydation mit Perphthalat bei pH 7 in 49%iger Ausbeute herstellen. Das N-Oxyd kann mit Hilfe von Rohextrakten aus *Azotobacter vinelandii* in Polyadenylsäure inkorporiert werden.

## LITERATUR

- <sup>1</sup> M. GRUNBERG-MANAGO, P. J. ORTIZ UND S. OCHOA, *Biochim. Biophys. Acta*, 20 (1956) 269.
- <sup>2</sup> M. A. STEVENS, D. I. MAGRATH, H. W. SMITH UND G. B. BROWN, *J. Am. Chem. Soc.*, 80 (1958) 2755.
- <sup>3</sup> G. B. BROWN, D. A. CLARKE, J. J. BIESELE, L. KAPLAN UND M. A. STEVENS, *J. Biol. Chem.*, 233 (1958) 1509.
- <sup>4</sup> G. B. BROWN, M. A. STEVENS UND H. W. SMITH, *J. Biol. Chem.*, 233 (1958) 1513.
- <sup>5</sup> M. A. STEVENS, H. W. SMITH UND G. B. BROWN, *J. Am. Chem. Soc.*, 81 (1959) 1734.
- <sup>6</sup> M. A. STEVENS, H. W. SMITH UND G. B. BROWN, *J. Am. Chem. Soc.*, 82 (1960) 3189.
- <sup>7</sup> M. A. STEVENS, A. GINER-SOROLLA, H. W. SMITH UND G. B. BROWN, *J. Org. Chem.*, 27 (1962) 567.
- <sup>8</sup> F. CRAMER UND K. RANDERATH, *Angew. Chem.*, 70 (1958) 571.
- <sup>9</sup> S. FREDERIKSEN UND H. KLENOW, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2 (1960) 329.
- <sup>10</sup> H. KLENOW UND S. FREDERIKSEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 52 (1961) 384.
- <sup>11</sup> S. FREDERIKSEN UND H. KLENOW, *Cancer Res.*, 22 (1962) 125.
- <sup>12</sup> M. F. SINGER, R. J. HILMOE UND L. A. HEPPLE, *J. Biol. Chem.*, 235 (1960) 751.
- <sup>13</sup> G. R. BARKER, J. B. LLOYD, M. D. MONTAGUE UND N. F. WOOD, *Biochem. J.*, 72 (1959) 9P.
- <sup>14</sup> J. A. CARBON, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 7 (1962) 366.
- <sup>15</sup> D. H. LEVIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 61 (1962) 75.
- <sup>16</sup> B. E. GRIFFIN, A. TODD UND A. RICH, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 44 (1958) 1123.
- <sup>17</sup> J. SKODA, J. KÁRA, Z. SORMOVÁ UND F. SORM, *Biochim. Biophys. Acta*, 33 (1959) 579.
- <sup>18</sup> J. SKODA, J. KÁRA UND Z. SORMOVÁ, *Collection Czech. Chem. Commun.*, 24 (1959) 3783.
- <sup>19</sup> J. SKODA UND J. KÁRA, unveröffentl. Ergebnisse, zit. nach Ref. 20.
- <sup>20</sup> J. KÁRA, J. SKODA UND F. SORM, *Collection Czech. Chem. Commun.*, 27 (1962) 1061.
- <sup>21</sup> W. SZER UND D. SHUGAR, *Acta Biochim. Polon.*, 8 (1961) 235, zit. nach Ref. 26.
- <sup>22</sup> P. LENGVEL UND R. W. CHAMBERS, *J. Am. Chem. Soc.*, 82 (1960) 752.
- <sup>23</sup> P. LENGVEL UND R. W. CHAMBERS, *Federation Proc.*, 19 (1960) 315.
- <sup>24</sup> P. LENGVEL UND C. BASILIO, unveröffentl. Ergebnisse, zit. nach Ref. 15.
- <sup>25</sup> P. LENGVEL, persönl. Mitteilung, zit. nach Ref. 27.
- <sup>26</sup> A. M. MICHELSON, J. DONDON UND M. GRUNBERG-MANAGO, *Biochim. Biophys. Acta*, 55 (1962) 529.
- <sup>27</sup> L. N. SIMON UND T. C. MYERS, *Biochim. Biophys. Acta*, 51 (1961) 178.
- <sup>28</sup> F. MALEY UND S. OCHOA, *J. Biol. Chem.*, 233 (1958) 1538.
- <sup>29</sup> G. B. PAYNE, *J. Org. Chem.*, 24 (1959) 1354.
- <sup>30</sup> N. ANAND, V. M. CLARK, R. H. HALL UND A. R. TODD, *J. Chem. Soc. (London)*, (1952) 3665.
- <sup>31</sup> A. MARTONOSI, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2 (1960) 12.
- <sup>32</sup> K. RANDERATH UND F. CRAMER, *Biochim. Biophys. Acta*, 61 (1962) 346.
- <sup>33</sup> A. G. GORNALL, C. S. BARDWILL UND M. M. DAVID, *J. Biol. Chem.*, 177 (1949) 751.
- <sup>34</sup> R. B. HURLBERT, in S. P. COLOWICK UND N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, Acad Press, New York, 1957, Vol. III, S. 803.
- <sup>35</sup> S. P. COLOWICK UND H. M. KALCKAR, *J. Biol. Chem.*, 148 (1943) 117.
- <sup>36</sup> H. A. KREBS UND R. HEMS, *Biochim. Biophys. Acta*, 12 (1953) 172.