

Guanina aminohidrolasa de hígado y de cerebro de cobaya

L. Martínez-Farnos, S. Gubert y J. Bozal

Departamento de Bioquímica
Facultad de Química
Universidad de Barcelona
Barcelona - 14

(Recibido el 3 de noviembre de 1977)

L. MARTINEZ-FARNOS, S. GUBERT and J. BOZAL. *Liver and Brain Guinea-pig Guanine Aminohydrolase*. Rev. esp. Fisiol., 34. 205-212. 1978.

Guinea-pig brain guanine aminohydrolase (E.C. 3.5.4.3) ($M = 120,000 \pm 5,000$ daltons) only exhibited one active electrophoretic band; its mobility is similar with that observed for the guinea-pig liver molecular form III.

Both forms appear to have coincident activity with pH, as well as an analogous thermal stability and K_m values with different substrates showing a different behaviour with the molecular form I of guinea-pig liver enzyme.

Brain guanine aminohydrolase and liver molecular form III have similar pK'_a values suggesting the participation of histidine and cysteine ($-SH$) in the enzymatic catalysis. The competitive inhibition by p-chloromercuribenzoate may corroborate the intervention of the last-one.

La guanina es un precursor metabólico de la xantina y constituye, por tanto, una fuente indirecta de ácido úrico en aquellos tejidos en los que predomina el catabolismo purínico. El estudio del comportamiento de la guanina aminohidrolasa (G.A.H.) (E.C. 3.5.4.3) presenta, por ello, especial interés.

La guanina aminohidrolasa de hígado de cobaya (14) aparece en cuatro formas moleculares que difieren en sus características cinéticas y electroforéticas, lo que indica la complejidad del enzima de esta procedencia. Por el contrario, el enzima de cerebro sólo presenta una banda electroforética, tal como se demuestra en el presente trabajo.

El papel metabólico del enzima de cerebro permanece todavía indeterminado pero su actuación parece estar dirigida más bien al empleo de la guanina en los procesos de síntesis de ácidos nucleicos (7, 9), que a su transformación en xantina.

El presente trabajo establece algunas de las analogías o diferencias existentes entre la guanina aminohidrolasa de hígado de cobaya y la de otros tejidos del mismo animal, lo que permite un mejor conocimiento de su modo de actuación. Se emplean las formas enzimáticas aisladas de hígado de cobaya (14) y el enzima presente en el cerebro. Se describe la localización celular del enzima de cerebro de cobaya, sus características electroforéticas

y la determinación de su masa molecular. Se incluye, también, evidencia experimental acerca de la identidad de la forma molecular de mayor migración electroforética presente en el hígado de cobaya (forma molecular III), con el enzima de cerebro. Por último, los estudios de la variación de los valores de K_m y V_{max} con el pH y la inhibición ejercida por el p-cloromercuribenzoato, han permitido formular algunas sugerencias acerca de los aminoácidos presentes en el centro activo de la guanina aminohidrolasa.

Material y métodos

La guanina aminohidrolasa procede de hígados y de cerebros de cobaya macho separados del animal recién sacrificado por paro cardíaco. Las proteínas empleadas en el cálculo de la masa molecular de la GAH del tejido cerebral de cobaya han sido: inhibidor triptico de la soja (SBTI, Fluka), adenosin desaminasa, ovoalbúmina, seroalbúmina bovina, fosfatasa alcalina, catalasa y ferritina (Boehringer) y azul de dextrano (Sigma).

Los sustratos empleados para la determinación de la actividad guanina aminohidrolasa de ambas procedencias han sido: guanina (Merck), 8-azaguanina (Sigma) y 1-metilguanina (Fluka).

Los geles de poliacrilamida utilizados en las electroforesis se prepararon con acrilamida (Merck), N,N'-metilenbisacrilamida (Eastman Kodak), dimetilamino-propionitrilo (Fluka) y ferricianuro potásico y persulfato amónico (UCB). En la coloración de los geles de poliacrilamida se han empleado: Negro amido (Merck), para el revelado general de proteínas, y p-yodonitrotetrazolio violeta (INT, Sigma) como revelador específico de la GAH.

Otros materiales especiales fueron: p-nitrofenilfosfato y adenosina (Merck), éster etílico de la benzoilarginina (BAEE, Boehringer) y p-cloromercuribenzoato (p-CMB, Fluka).

Obtención de preparados de GAH. Como fuente de GAH de cerebro se utilizan los homogeneizados obtenidos por trituración en un Potter-Elvehjen del tejido libre de cerebelo y de la médula espinal, en sacarosa 0,25 M (1/10, p/v) a 4° C y centrifugados a $50.000 \times g$, 2 h. Antes de su utilización se dializan a 4° C frente a tampón tris-HCl 0,05 M de pH 8,1, durante 24 h. La actividad específica de la preparación es de 3,70 unidades/mg proteína.

Como fuente de GAH de hígado de cobaya se han empleado las formas moleculares I y III obtenidas por cromatografía en DEAE-Sephadex según el método de purificación que se ha descrito previamente (14) y cuya actividad específica es de 2,7 U/mg prot. y 14,0 U/mg prot., respectivamente.

La actividad de la guanina aminohidrolasa se mide por el método de ROUSH y NORRIS (15). Las mezclas de reacción contienen: guanina (60 μ M), tampón (fosfatos sódicos 0,05 M, pH 7,4 para el enzima de hígado y tris-HCl 0,05 M, pH 8,1 para el enzima de cerebro) y el volumen de disolución del enzima hasta completar 3 ml. La determinación de actividad se efectúa por lectura directa de los decrementos de absorbancia a 245 nm en un espectrofotómetro Beckman K-25 provisto de inscriptor, a $37 \pm 0,1^\circ$ C, en cubetas de 1 cm de paso de luz. A esta longitud de onda, la relación entre los coeficientes de extinción molar de la guanina y la xantina son de 2,5 a pH 7,4 y de 1,45 a pH 8,1.

Una unidad de GAH se define como la cantidad de enzima que transforma en un minuto 1 μ mol de guanina en xantina a $37 \pm 0,1^\circ$ C (condiciones normalizadas).

La determinación de proteína se efectúa por el método de LOWRY *et al.* (12), tomando como referencia un patrón de seroalbúmina cristalizada.

El peso molecular de la guanina aminohidrolasa se determina por cromatografía en Sephadex G-200 (Pharmacia) superfino, según el método de ANDREWS

(1). Las actividades de las proteínas de referencia, SBTI, adenosin desaminasa, fosfatasa alcalina y catalasa, se obtienen por aplicación de los métodos propuestos por SCHWERT y TAKENAKA (16), KALCKAR y SHAFRAN (6), MALAMY y HORECKER (13) y BEERS y SIZER (2), respectivamente. La ovoalbúmina, la seroalbúmina y la ferritina se valoran por lectura directa de los eluidos cromatográficos a 230 nm.

El revelado específico de la GAH se efectúa por incubación de los geles de poliacrilamida a 37° C con guanina 4 μ M, 1 h, y seguidamente se mantienen en contacto, a la misma temperatura, con el revelador específico formado por guanina 400 μ M, xantinoxidasa de leche (E.C. 1.2.3.2) (Boehringer, 0,4 U/mg prot.), p-yodonitrotetrazolio violeta (1 mg/ml) y tampón tris-HCl 0,05 M, pH 8,1, hasta que aparezcan las bandas rojas características de la GAH. Se lavan con agua destilada hasta eliminar los reactivos reveladores y los geles se conservan sumergidos en agua bidestilada y en tubos cerrados.

La dependencia de la actividad guanina aminohidrolasa con el pH, para el enzima de ambos orígenes se ha examinado en el intervalo de pH 5,5-8,5, en tampón trifosfato-KCl 0,142 M, a $37 \pm 0,1^\circ$ C y con guanina como sustrato. Los parámetros cinéticos, K_m y V_{max} se calculan por el método gráfico de LINEWEAVER-BURK (11); para hallar los grupos ionizables en el centro activo del enzima, se representaron de acuerdo con el método de DIXON (3), el pK_m y el $\log V_{max}/K_m$ frente al pH.

El tipo de inhibición y las constantes de inhibición ejercidas por el p-cloromercuribenzoato se calculan mediante la representación doble recíproca de v vs $[S]$, para los sistemas inhibidos y el sistema en ausencia de inhibidor (11).

Resultados

Localización subcelular de la actividad en el tejido cerebral de cobaya. La localización del enzima se efectúa por el mé-

Tabla I. *Distribución de la actividad GAH en las fracciones celulares.*

Homogeneizado en sacarosa 0,25 M (1/10, p/v). Las distintas fracciones se tratan con una disolución hipertónica de tampón tris-HCl 0,2 M, pH 8,1, 30 min; se centrifuga a $15.000 \times g$, 30 min a 4° C y en los sobrenadantes se determina la actividad enzimática.

Fracción	Actividad total U.	Actividad específica U/mg prot.
Nuclear	37,5	7,8
Mitocondrial	48,5	8,5
Microsomal	7,5	1,2
Soluble	994,0	3,7



Fig. 1. *Electroforesis de GAH.* 5 mA/gel, 90 min, 4° C. Tampón: tris-glicina 0,01 M, pH 8,5. Revelado específico (véase métodos). Aplicación: 50-250 μ g proteína fracción soluble de cerebro y de hígado de cobaya. Poliacrilamida: 7 %. A) Fracción soluble de cerebro de cobaya. B) Fracción soluble de hígado de cobaya.

todo de centrifugación diferencial de HOGEBOOM *et al.* (5), modificado por KUMAR *et al.* (8).

La GAH de cerebro de cobaya se localiza casi exclusivamente en la fracción soluble de la célula (tabla I), que contiene un 92 % de la actividad total, al igual que lo observado para la GAH hepática de cobaya (14).

Características electroforéticas de la GAH de cerebro de cobaya. Se somete a electroforesis la fracción soluble obtenida a partir de homogeneizados de cerebro de cobaya en sacarosa 0,25 M. En el revelado específico de los ferogramas (fig. 1 A) aparece una sola banda con actividad guanina aminohidrolasa, cuya movilidad electroforética es aparentemente idéntica a la banda de mayor movilidad electroforética (forma molecular III) (figura 1 B) observada para el enzima purificado de hígado de cobaya. El hecho parece sugerir que la GAH de cerebro y la forma molecular III del hígado de cobaya corresponden a la misma forma molecular del enzima.

Peso molecular de la GAH de cerebro de cobaya. La determinación del peso molecular de la GAH se ha practicado por cromatografía en columna de Sephadex G-200. Se ha empleado un preparado purificado del enzima obtenido por centrifugación de los homogeneizados del tejido cerebral en sacarosa 0,25 M, a $50.000 \times g$ y calefacción del sobrenadante a $70 \pm 0,1^\circ \text{C}$, 15 min. Se separa el residuo por centrifugación a $15.000 \times g$, 20 min y el sobrenadante se precipita al 70 % de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y fraccionamiento final con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en los márgenes 45-70 % de saturación. La actividad específica del preparado fue de 66,7 U/mg prot. Por interpolación del volumen de elución de la GAH., en la recta de calibrado (fig. 2), se halla un peso molecular promedio de 120.000 ± 5.000 , que coincide exactamente con el encontrado para la

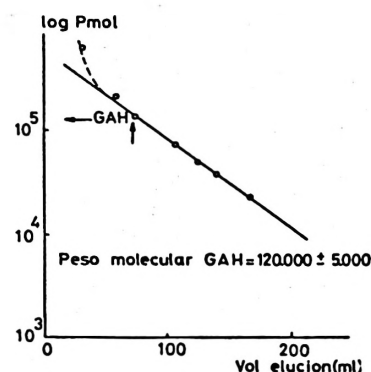


Fig. 2. *Peso molecular de la GAH de cerebro de cobaya.*

Columnas: 3×70 cm. La resina (Sephadex G-200) se equilibra con el tampón de elución tris-HCl 0,05 M (0,1 M en KCl), pH 8,1. Ritmo de elución = 0,3 ml/min. Proteínas de calibrado citadas en orden creciente de masa molecular: SBTI, adenosin desaminasa, ovoalbúmina, seroalbúmina bovina, fosfatasa alcalina, catalasa y ferritina. Proteínas control = 0,05-2 mg. El contenido proteico y la actividad enzimática de los eluyentes que permite localizar la posición de cada uno de los marcadores, se determina como se describe en Métodos. El volumen de exclusión de la columna se calcula mediante azul de dextrano ($M = 2 \times 10^6$).

GAH hepática de cobaya (formas moleculares I y III) (14).

Efecto del pH sobre la actividad de la GAH de hígado y cerebro de cobaya. La actividad de la guanina aminohidrolasa presente en los homogeneizados del cerebro de cobaya se ha determinado frente a tres sustratos ($66 \mu\text{M}$): guanina, 8-azaguanina y 1-metilguanina, en el margen de pH comprendido entre 5 y 9,8 a $37 \pm 0,1^\circ \text{C}$, con tampón Tris-fosfato-KCl 0,142 M. Las curvas de actividad vs. pH (fig. 3 A) muestran un máximo pronunciado a pH 8,1 para la guanina y una zona amplia con un máximo a pH 6,1 para la 8-azaguanina y a pH 8,1 para la 1-metilguanina.

Al determinar el efecto del pH sobre las formas moleculares separadas de hígado de cobaya se observa que el pH óp-

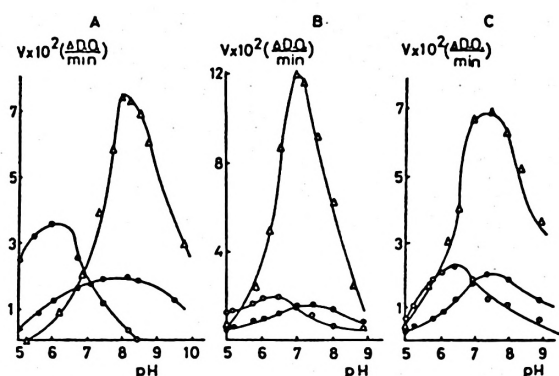


Fig. 3. Actividad enzimática respecto del pH de la GAH de hígado y cerebro de cobaya. Sustratos: Guanina (Δ), 8-azaguanina ($\circ$) y 1-metilguanina ($\bullet$), 66 μ M. A) Fracción soluble de cerebro de cobaya. B) Forma molecular I de hígado de cobaya. C) Forma molecular III de hígado de cobaya.

timo de la forma molecular I frente a guanina como sustrato es de 7,0, mientras que la forma molecular III (coincidente electroforéticamente con la GAH cerebral de cobaya) muestra un pH óptimo de 7,5 (figs. 3 B y 3 C). Ambas formas exhiben, en cambio, un pH óptimo de actuación idéntico de 6,5 para la 8-azaguanina y de 7,4 para la 1-metilguanina; este último valor difiere ligeramente del obtenido con el enzima de cerebro.

Parámetros cinéticos de la GAH de ambas procedencias. En la tabla II se ex-

presan los valores de K_m correspondientes a la fracción soluble de cerebro y a las formas moleculares I y III de hígado de cobaya, así como los datos referentes a las concentraciones de sustrato que producen inhibición del sistema enzimático.

Se puede observar que, al igual que en los experimentos de electroforesis, el comportamiento cinético del enzima de cerebro frente a los tres sustratos, tanto respecto a sus valores de K_m como a la inhibición por sus sustratos, es muy parecido al exhibido por la forma molecular de mayor movilidad electroforética (forma molecular III) y se aparta, sustancialmente, del exhibido por la forma molecular I. Asimismo, el valor de $K_m = 7 \mu$ M (a pH 7,4), tanto para el enzima de cerebro como para la forma molecular III de hígado de cobaya, confirma la similitud de comportamiento de ambas formas enzimáticas.

Efecto de la temperatura sobre ambas GAH. El efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la GAH de cerebro se determina como se indica a continuación: el homogeneizado en sacarosa 0,25 M se dializa frente a tampón tris-HCl 0,05 M de pH 8,1, 24 h, y el dializado se centrifuga a $50.000 \times g$, 20 min. El sobrenadante se somete a calefacción en el margen de temperaturas comprendido entre 37°C y 80°C , 15 min.

Tabla II. Valores de K_m de GAH de cerebro y de hígado de cobaya con varios sustratos. Temperatura: 37°C . Tampón: tris-fosfatos-KCl 0,142 M al pH óptimo de cada sustrato. [Guanina]: 15 a 200 μ M; [8-azaguanina]: 25 a 200 μ M; [1-metilguanina]: 15 a 200 μ M. [Enzima]: 5×10^{-3} U/mg (cerebro); $2,7 \times 10^{-3}$ U/mg (forma I); 9×10^{-3} U/mg (forma III).

Sustrato	GAH de cerebro		GAH de hígado			
	K_m	Inhib. por sustrato	Forma molecular I K_m	Inhib. por sustrato	Forma molecular III K_m	Inhib. por sustrato
Guanina	6,9	55	15	40	6,3	70
8-azaguanina	130	100	600	100	310	100
1-metilguanina	200	No	540	No	210	No

K_m y $[S]_{\text{sat.}}$ expresadas en μ M.

La actividad del enzima se mantiene inalterada hasta los 70° C, conservando, además, sus características cinéticas y electroforéticas. En cambio, al calentar a 70° C, 15 min, el preparado purificado de hígado que contiene las cuatro formas moleculares (14), en tampón fosfatos sódicos 0,05 M de pH 7,4, se observa la desaparición de la actividad de la forma de menor movilidad electroforética (forma molecular I); el sobrenadante resultante presenta, mayoritariamente, una sola banda electroforética que corresponde a la de la forma molecular III, exhibe un solo valor de K_m (6,0 μ M) frente a guanina y es inhibido por la propia guanina (50 μ M o superior). Estos datos coinciden, sensiblemente, con los observados para la forma molecular III aislada del purificado hepático por cromatografía en DEAE-Sephadex y con los que exhibe el enzima de cerebro. Tanto el purificado hepático como el enzima de cerebro experimentan una desnaturalización rápida y completa cuando se calientan a 80° C, 15 min.

Variación de K_m y V_{max} con el pH, para ambos sistemas enzimáticos. La representación gráfica según el método de DIXON (3) del pK_m y del $\log V_{max}/K_m$ frente al pH se muestran en las figuras 4 A para la GAH de cerebro y 4 B para la forma molecular hepática III. El análisis de los resultados indica que, en ambos sistemas, desempeñan papeles catalíticos grupos situados en el centro activo con valores de pK_a' de 6,2, 6,95 y 7,85. La ionización de la histidina con pK_a' de 6,1 y la primera ionización de la cisteína ($-SH$) (pK_a' 8,33) en la formación y disociación del complejo enzima-sustrato, parecen estar fuertemente implicados, con las limitaciones propias del método.

Inhibición por p-cloromercuribenzoato. Tanto la GAH de cerebro de cobaya como las formas moleculares separadas I y III de hígado de cobaya exhiben una

marcada sensibilidad a la inhibición por p-CMB. La inhibición es reversible, en ambos casos, cuando no se establece contacto previo entre el enzima y el inhibidor, tal como se comprueba por diálisis y en la representación de v vs. $[E]$ para concentraciones de p-CMB entre 50 y 200

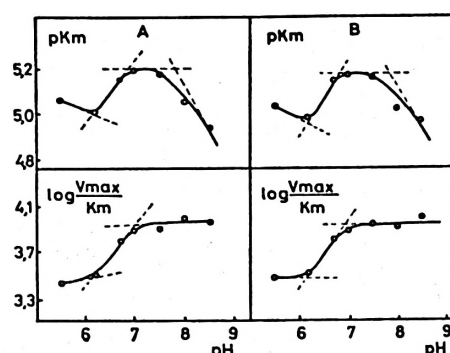


Fig. 4. Variación de V_{max} y K_m con el pH. Sustrato: guanina. Tampón: tris-fosfato-KCl 0,142 M; margen de pH: 5,5-8,5; K_m y V_{max} se calculan mediante la representación doble recíproca de v vs. $[S]$. Para cada valor de pH se tomaron el promedio de tres determinaciones. A) Fracción soluble de cerebro de cobaya. B) Forma molecular III de hígado de cobaya.

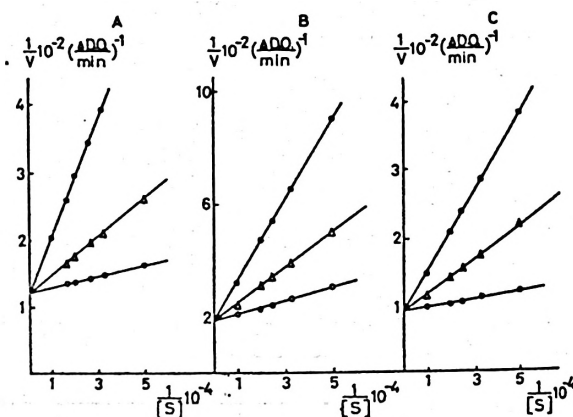


Fig. 5. Inhibición competitiva de la GAH de hígado y cerebro de cobaya, por p-CMB. [Guanina] μ M (O): 20 a 50; [p-CMB] μ M: 100 (Δ) y 300 ($\bullet$); [Enzima] U/mg: 5×10^{-2} (cerebro); $2,7 \times 10^{-2}$ (Forma I) y 9×10^{-2} (Forma III). A) Fracción soluble de cerebro de cobaya. B) Forma molecular I de hígado de cobaya. C) Forma molecular III de hígado de cobaya.

μM . Cuando se mantienen ambos en contacto previo se observa ya a los 20 min de contacto un incremento del porcentaje de inhibición, así como que la desnaturalización es irreversible. En las figuras 5 A, 5 B y 5 C se muestra el tipo de inhibición producido por el p-CMB, sin contacto previo con el enzima. Se deduce que, para ambos sistemas enzimáticos, el p-CMB es un inhibidor competitivo: K_i (enzima de cerebro) = $30 \mu\text{M}$; formas moleculares I y III de $61 \mu\text{M}$ y $35 \mu\text{M}$, respectivamente. Estos resultados contribuyen a sustentar la hipótesis, anteriormente expuesta, de que la cisteína pueda estar presente en el centro activo del enzima y su intervención en la actividad catalítica.

Discusión

La guanina aminohidrolasa soluble de cerebro de cobaya sólo presenta una forma molecular que por electroforesis posee igual movilidad anódica que la exhibida por la forma molecular predominante (forma molecular III) en el hígado de cobaya.

Los resultados obtenidos con la guanina aminohidrolasa de cerebro frente al pH (para tres sustratos distintos) y por tratamiento térmico indican que su comportamiento es muy similar al de la forma molecular III de hígado y muestra una clara diferencia con la forma molecular I. Los parámetros cinéticos de las tres formas moleculares de guanina aminohidrolasa (formas moleculares I y III de hígado y forma molecular de cerebro), frente a los sustratos guanina, 8-azaguanina y 1-metilguanina, tanto por lo que se refiere a los valores de K_m como respecto a las concentraciones de sustrato que producen inhibición, permiten apoyar la semejanza apuntada.

Las diferencias en el pH óptimo, frente a guanina, de las formas moleculares del enzima de hígado, pueden ser significativas en cuanto a que la actuación predominante de una de ellas, por efecto de

un medio óptimo, permita ejercer algún tipo de control de la actividad catalítica, que podría estar asociado a su distinto comportamiento cinético en lo concerniente a su diferente capacidad de transformación del sustrato y a la distinta inhibición ejercida por la guanina sobre ambas formas moleculares.

Los estudios de la variación de K_m y de V_{max} frente al pH, para ambas fuentes enzimáticas (hígado y cerebro), proporcionan suficiente evidencia para sugerir la participación de la histidina y posiblemente de la cisteína ($-\text{SH}$) en la catálisis enzimática. EDSALL y WYMAN (4) han indicado que el pK_a' de la cisteína está muy influenciado por los grupos iónicos vecinales, disminuyendo sensiblemente su valor si el entorno está cargado positivamente. Como han sugerido LEWIS y GLANTZ (10), en el caso de la guanina aminohidrolasa hepática de conejo, este papel lo ejercería la histidina protonada presente en el centro activo del enzima. La inactivación de la guanina aminohidrolasa por p-CMB y el carácter competitivo de la inhibición que produce dicho reactivo de grupos $-\text{SH}$, parecen confirmar el papel de la cisteína en el centro activo del enzima.

Resumen

La guanina aminohidrolasa de cerebro de cobaya (E.C. 3.5.4.3.) ($M = 120.000 \pm 5.000$ daltons) exhibe una sola banda activa por electroforesis, de movilidad análoga a la forma molecular III de hígado de la misma procedencia.

La actividad de ambas formas con el pH es coincidente, así como su termoestabilidad y sus valores de K_m frente a diversos sustratos; en ello difieren de la forma molecular I del enzima de hígado de cobaya.

La guanina aminohidrolasa de cerebro y la forma molecular III de hígado de cobaya poseen valores de pK_a' análogos que sugieren la participación de la histidina y de la cisteína ($-\text{SH}$) en la catálisis enzimática. La inhibición competitiva que produce el p-cloromercuribenzoato puede contribuir a confirmar la intervención de esta última.

Bibliografía

1. ANDREWS, P.: *Biochem. J.*, **91**, 222-233, 1964.
2. BEERS, R. F. y SIZER, I. W.: *J. Biol. Chem.*, **195**, 133-140, 1952.
3. DIXON, M.: *Biochem. J.*, **55**, 161-171, 1953.
4. EDSALL, J. T. y WYMAN, J.: *Biophysical Chemistry*, Academic Press, New York, 1958.
5. HOGEBOM, G. A., SCHNEIDER, W. C. y STRIEBICH, M. J.: *J. Biol. Chem.*, **196**, 111-120, 1952.
6. KALCKAR, H. M. y SHAFRAN, M.: *J. Biol. Chem.*, **167**, 429-443, 1947.
7. KELLEY, W. N., ROSENBLOOM, F. M., HENDERSON, J. F. y SEEGLER, J. E.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **28**, 340-345, 1957.
8. KUMAR, S., TEWARI, K. K. y KRISHNAN, P. S.: *Biochem. J.*, **95**, 797-802, 1965.
9. KUMAR, K. S. y KRISHNAN, P. S.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **39**, 600-608, 1970.
10. LEWIS, A. S. y GLANTZ, M. D.: *J. Biol. Chem.*, **249**, 3862-3866, 1974.
11. LINEWEAVER, H. y BURK, D.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **56**, 658-666, 1934.
12. LOWRY, P. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. y RANDALL, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, 1951.
13. MALAMY, M. H. y HORECKER, B. L.: *Biochemistry*, **3**, 1893-1897, 1964.
14. MARTÍNEZ-FARNÓS, L., GUBERT, S. y BOZAL, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, **34**, 73-80, 1978.
15. ROUSH, A. y NORRIS, E. R.: *Arch. Biochem.*, **29**, 124-129, 1950.
16. SCHWERT, G. W. y TAKENAKA, Y.: *Biochem. Biophys. Acta*, **16**, 570-575, 1955.