

CHROM. 6386

RESYNTHESE UND WIEDERGEWINNUNG VON KRISTALLINEM INSULIN AUS DEM REKOMBINATIONSANSATZ NATÜRLICHER A- UND B-KETTE

J. JENTSCH*

Institut für Physiologische Chemie, Universität Tübingen, 74 Tübingen (B.R.D.)

(Eingegangen am 27. September 1972)

SUMMARY

Resynthesis and recovery of crystalline insulin from the recombination mixture of natural A and B chains

The quantitative recovery of biologically active crystalline bovine insulin from recombination products of natural A and B chains is described.

S-Sulfonated A chain from bovine insulin was reduced with mercaptoethanol to the corresponding sulfhydryl form followed by recombination with natural S-sulfonated B chain in a 2:1 weight ratio and neutralization of the recombination mixture to pH 7.0. The insulin activity was found to be 34 % in the recombination mixture, based on the amount of B chain used, as shown in the mouse convulsion test. The solution was immediately lyophilized to a small volume and acidified. The precipitate and supernatant were chromatographed by gel filtration on Sephadex G-50 with 1 N acetic acid and the original amount of insulin (34 %) was recovered. The activities of the two insulin portions were: after purification of the supernatant 100 %, after purification of the precipitate 90 %. The insulin isolated by this method is identical with the natural hormone with respect to gel chromatographic mobility, cellogel electrophoretic mobility, biological activity, crystalline form and amino acid composition. The method is simple and reproducible.

It was not possible to separate a hybrid insulin from the heterogeneous protein mixture synthesized by the Merrifield method. The possible causes are discussed.

EINLEITUNG

Seit der Synthese des Insulins¹⁻⁶ im Jahre 1963 arbeitet man intensiv an der Verbesserung der Insulinausbeute bei der A- und B-Ketten-Rekombination⁷⁻⁹. Die Vereinigung reduzierter natürlicher Ketten durch oxydative Regenerierung führt nur in sehr geringem Masse zu aktivem Insulin; hauptsächlich entstehen dabei Kettenpolymerisationsprodukte und Insulin-Isomere. DIXON UND WARDLAW¹⁰ sowie DU und Mitarb.¹¹ überführten die vollständig getrennten Ketten in die S-Sulfonate, nach Reinigung in die SH-Ketten und vereinigten diese oxydativ bei pH 9 zu einem Rekombinat mit 1-2 % Insulingehalt. Den chinesischen Autoren gelang

* Gegenwärtige Adresse: Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Abteilung Biochemische Pharmakologie, Hermann-Rein-Str. 3, 34 Göttingen, B.R.D.

es später, Insulin in 10–12 % Ausbeute zu erhalten (bei 50 %-igem A-Ketten-Überschuss und einem extrem hohen pH-Wert von 10.6 während der Rekombination)¹².

Bisher sind mehrere Verfahren zur Abtrennung des Insulins von dem bei der Kettenrekombination entstandenen Proteingemisch bekannt. Das von BANTING und Mitarb.¹³ erstmals zur Insulingewinnung aus Pankreas verwendete und von DU und Mitarb.¹¹, modifizierte saure Extraktionsverfahren ist sehr verlustreich und hat sich nach neueren Untersuchungen von ZAHN und Mitarb.¹⁴ nicht bewährt. KATSOYANNIS und Mitarb.^{16,10} setzten natürliche reduzierte A-Kette mit S-sulfonierter B-Kette bei pH 9.6–10 im Molverhältnis 5:1 um und erhielten Rohinsulin in 60–80 % Ausbeute, das durch Kombination von Pikrat- und Hydrochlorid-Fällung, Chromatographie an Carboxymethylcellulose in 8 M Harnstofflösung und Gelchromatographie in kristallines Insulin übergeführt wurde. Die Ausbeute betrug ca. 50 %, bezogen auf die eingesetzte S-sulfonierte B-Kette. ZAHN und Mitarb.¹⁴ isolierten halbsynthetisches kristallines Insulin einfacher durch direkte CM-Cellulose- und Gelchromatographie. In beiden Fällen müssen aber grosse Mengen Harnstoff unter Verlust an Insulin-Material abgetrennt werden. Ausserdem ist bekannt, dass das im Harnstoff enthaltene Cyanat bei längerer Einwirkung funktionelle Gruppen in Polypeptiden und Proteinen durch Carbamylierung irreversibel blockiert¹⁷.

In der vorliegenden Arbeit wird eine einfache Methode beschrieben, die es erlaubt, Insulin von den während der Rekombination in grosser Menge entstandenen oligomeren und polymeren Kettenprodukten abzutrennen und in kristalliner Form zu gewinnen.

MATERIAL UND METHODEN

Cellogeelektrophorese-Streifen (40 × 170 mm, Nr. 44215) stammten von der Firma Serva, Heidelberg; Sephadex G-50 (fine) wurde von der Pharmacia, Frankfurt, bezogen. Alle anderen Chemikalien von analytischem Reinheitsgrad waren von der Firma E. Merck AG, Darmstadt.

Rekombination

In Anlehnung an die Methode von KATSOYANNIS und Mitarb.¹⁰ wurden drei Rekombinationen durchgeführt. Pro Ansatz wurden 20 mg S-Sulfonat-A-Kette aus Rinderinsulin nach Reduktion mit Mercaptoäthanol zu 10 mg S-Sulfonat-B-Kette hinzugegeben. Nach beendeter Reaktion wurde die Rekombinationslösung auf pH 7.0 gebracht. Die Insulinausbeute der Lösung betrug 34 %, bezogen auf die im Unterschuss zugegebene B-Kette. Die biologische Aktivität wurde mit dem Mäusekrampftest nach YOUNG UND LEWIS¹⁸ bestimmt. Die maximale Ausbeute an Insulin, das in der Rekombinationslösung entstanden sein kann, errechnet sich aus der zugegebenen S-sulfonierten B-Kette. Die Aktivitäten beziehen sich auf kristallines Rinderinsulin, mit dem auch die Eichkurve gewonnen wurde (Tabelle I).

Reinigung des Insulins

Drei Rekombinationslösungen wurden vereinigt, sofort bis auf ca. 4 ml lyophilisiert (klare Lösung), mit vier Tropfen Essigsäure und acht Tropfen konz. Salzsäure bis pH 1.8 angesäuert und vom Präzipitat abzentrifugiert. Die Gelfiltration des Überstandes erfolgte an einer mit Rinderinsulin geeichten (Fig. 1a) 1 × 193 cm

Sephadex G-50-Säule in 1 *N* Essigsäure. Nach Abtrennung eines kleinen Vorgipfels wurde reines Insulin gewonnen (Fraktion 2 in Fig. 1b). Ausbeute: 8 mg (= 16.8%), klar löslich in 1 *N* Essigsäure. Die Identität mit Rinderinsulin wurde durch den Mäusekrampf test (Tabelle I) und Cellogelelektrophorese (Fig. 2) bewiesen. Als Elektrophoreseapparatur diente die Mikrozonenkammer R-100 (Firma Beckman). Auf Cellogelstreifen wurde aus einer Lösung von 1 mg chromatographiertem Insulin in 0.1 ml 1 *N* Essigsäure zehnmal aufgetragen. Der Elektrophorese-Puffer (pH 2.0) bestand aus 4 *M* Harnstoff, 3 *M* Ameisensäure und Wasser. Gearbeitet wurde 25–30 min bei 250 V, 5–8 mA und einer Temperatur von 2°. Der Streifen wurde danach 5 min mit Ponceau S angefärbt und der Untergrund mit 5 % Essigsäure entfärbt. Die weitere Behandlung erfolgte nach der Vorschrift der Firma Beckman.

Das Präzipitat der angesäuerten Rekombinationslösung wurde in 8 *M* Harnstoff–0.2 *M* Ammoniumformiat-Puffer, pH 3.6, gelöst (Bereitung des Puffers: eine 8 *M* Harnstofflösung wurde mit 0.2 *M* Ameisensäure versetzt und mit Ammoniak auf pH 3.6 eingestellt) und an derselben Sephadex G-50-Säule in 1 *N* Essigsäure in vier Fraktionen aufgetrennt (Fig. 3). Die Cellogelelektrophorese (Fig. 4) zeigt die Identität des Insulins in Peak 4 mit Rinderinsulin (Fig. 4a): es löst sich klar in 1 *N* Essigsäure auf und erscheint in der Chromatographie nach einem Elutionsvolumen von 104.3 ml (siehe Fig. 1). Die biologische Aktivität beträgt 90 % (Tabelle I).

Biologische Aktivität des Insulins (Mäusekrampf test)

Jeweils zehn weissen weiblichen Mäusen wurde 1 μ g Insulin/100 μ l 0.9 % NaCl-Lösung i.p. injiziert. Sie wurden in eine schräg gestellte, langsam rotierende Trommel gesetzt und liefen dort bis zum einsetzenden Krampf. Nach maximal 60 min wurden die heruntergefallenen Tiere gezählt. Die Eichkurve wurde mit kristallinem Rinderinsulin erhalten (Tabelle I).

Kristallisation

Die Kristallisation erfolgte nach der Vorschrift von ZAHN und Mitarb.¹⁴. Ein Milligramm chromatographiertes Insulin wurde in 1 ml Citratpuffer gelöst.

TABELLE I

REINIGUNG VON INSULIN NACH REKOMBINATION NATÜRLICHER A- UND B- KETTE (RIND)

Protein aus	Ausbeute (mg)	Insulinaktivität im Mäusekrampf test Mittelwert (%)	Zahl der eingesetzten Mäuse
Rekombinationslösung	—	34	50
Sephadex G-50, Überstand	—	—	—
Fraktion 1	—	—	—
Fraktion 2	8	100	170
Fraktion 3	—	—	—
Sephadex G-50, Präzipitat	—	—	—
Fraktion 1	49	0*	30
Fraktion 2	5	—	—
Fraktion 3	3.5	—	—
Fraktion 4	8	90	60

* 20 und 50 μ g Protein/100 μ l 0.9 % NaCl-Lösung wurden i.p. injiziert.

Die Lösung wurde mit 1.5 *N* Ammoniaklösung auf pH 8.0 eingestellt und anschliessend mit 5% Zitronensäurelösung auf pH 6.0. Im Kühlschrank fiel das Insulin kristallin aus.

Aminosäureanalyse

Die Aminosäureanalyse wurde mit 1 mg Insulin nach 23.5 Std. Hydrolyse mit 6 *N* HCl bei 105° im evakuierten Röhrchen durchgeführt. Als Analysator diente der Unichrom-Autoanalyser der Firma Beckman, München.

ERGEBNISSE

Rekombination

S-Sulfonierte A-Kette aus Rinderinsulin wurde nach Reduktion mit Mercaptoäthanol in zweifachem Gewichtsüberschuss mit S-sulfonierter Rinderinsulin-B-Kette kombiniert. Die Insulinausbeute in der Rekombinationslösung betrug 34 %, bezogen auf die im Unterschuss zugegebene B-Kette (Primäraktivität = biologische Aktivität ohne Reinigung). Drei Rekombinationslösungen wurden vereinigt und, wie bei Material und Methoden beschrieben, weiterverarbeitet.

Reinigung des Insulins

In einer früheren Mitteilung¹⁹ wurde über die Reinigung einer grösseren Menge kristallinen Rinderinsulins (Handelspräparat) an Sephadex G-50 in 1 *N* Essigsäure berichtet. Dabei wurde auch Proinsulin²⁰ abgetrennt. Da nach früheren Untersuchungen^{14, 21} die Wiedergewinnung von Insulin aus trockenen Rekombinationsgemischen durch saure Extraktion nicht gelingt, wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, die Rekombinationslösung so weit wie möglich durch Lyophilisation einzuengen, ohne damit Insulin und andere Rekombinationsprodukte auszufällen; aus mehreren Vorversuchen ging hervor, dass durch Ansäuern konzentrierter, klarer Rekombinationslösungen das Insulin zum Teil im Überstand gelöst bleibt. Dieses wurde durch Gelfiltration¹⁰ des Überstandes an Sephadex G-50 mit 1 *N* Essigsäure rein erhalten. Das Elutionsdiagramm ist in Fig. 1b wiedergegeben. Zum Vergleich wurde an derselben Säule kristallines Rinderinsulin gelfiltriert (Fig. 1a). Peak 2 enthielt 8 mg Insulin (16.8 % bezogen auf die zugegebene B-Kette); es besass im Mäusekrampf test eine Aktivität von 100 % (Tabelle I). Die Identität mit kristallinem Rinderinsulin wurde durch die Wanderungsgeschwindigkeit bei der Gelfiltration (Fig. 1a), Cellogelelektrophorese (Fig. 2), Kristallform und quantitative Aminosäureanalyse (Tabelle II) bewiesen.

Die Reinigung der zweiten Hälfte Insulin im Präzipitat erfolgte nach Auflösen in einem sauren Harnstoff-Puffer (siehe MATERIAL UND METHODEN) an derselben Sephadex G-50-Säule durch Elution mit 1 *N* Essigsäure. Dadurch kam das Insulin nur kurze Zeit mit Harnstoff in Berührung (siehe EINLEITUNG). Die Säulentrennung lieferte vier Fraktionen. Die nach 104.3 ml eluierte Fraktion 4 enthielt 8 mg reines Insulin (16.8 %, bezogen auf die zugegebene B-Kette) (siehe Fig. 3); es besass eine Aktivität von 90 % (Tabelle I). Die Identität mit kristallinem Rinderinsulin wurde ausserdem durch Cellogelelektrophorese bewiesen (Fig. 4). Die anderen Fraktionen erbrachten keine Aktivität (Tabelle I). Die Reinigung des Insulins ist aus dem Schema in Fig. 5 ersichtlich.

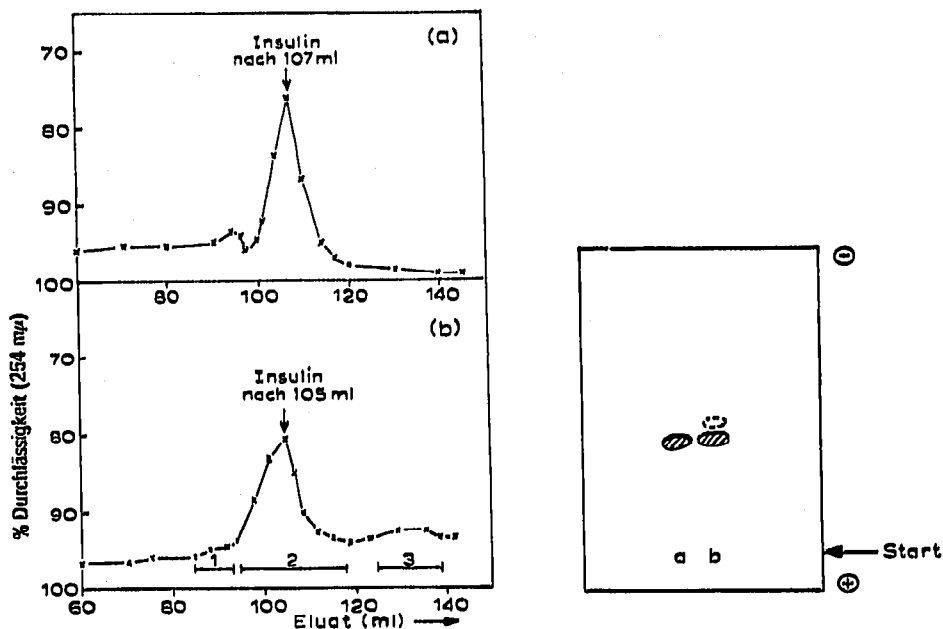


Fig. 1. (a) Chromatographie von kristallinem Rinderinsulin an Sephadex G-50 (fine) zur Bestimmung des Eichwertes. Elutionsmittel: 1 N Essigsäure. Säule: 1×193 cm. Durchflusgeschwindigkeit: 21 ml/Std. (b) Chromatographie des Insulins im Überstand aus drei Rekombinationsansätzen an Sephadex G-50 unter denselben Bedingungen.

Fig. 2. Cellogelelektrophorese von chromatographiertem Insulin aus dem Überstand (Peak 2) (a) und kristallinem Rinderinsulin (Handelspräparat mit 27 E/mg) (b). Elektrophoresebedingungen siehe MATERIAL UND METHODEN.

TABELLE II

AMINOSÄUREANALYSE VON CHROMATOGRAPHIERTEM INSULIN NACH REKOMBINATION NATÜRLICHER A- UND B-KETTE (RIND)

	μMol	Molverhältnis	
		Gef.	Ber.
Lys	0.049	1.03	1
His	0.100	2.10	2
Arg	0.047	0.99	1
Asp	0.131	2.76	3
Thr	0.047	0.99	1
Ser	0.130	2.74	3
Glu	0.325	6.85	7
Pro	0.044	0.93	1
Gly	0.201	4.23	4
Ala	0.143	3.01	3
Cys	0.252	5.31	6
Val	0.190	4.00	5
Ile	0.021	0.44	1
Leu	0.293	6.16	6
Tyr	0.173	3.65	4
Phe	0.153	3.22	3

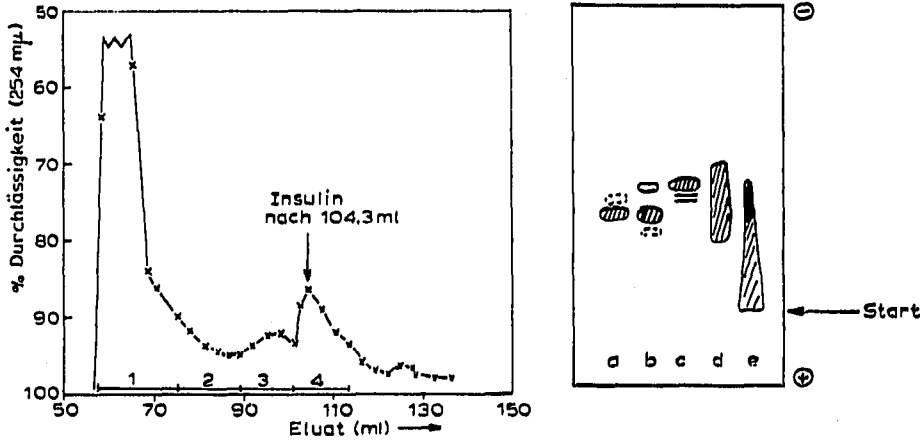


Fig. 3. Chromatographie des Insulins im Präzipitat aus drei Rekombinationsansätzen an Sephadex G-50 in 1 N Essigsäure. Säule: 1×193 cm. Durchflussgeschwindigkeit: 18.5 ml/Std.

Fig. 4. Cellogelelektrophorese von Rinderinsulin (Handelspräparat) (a); Fraktion 4 (= Insulin) (b), Fraktion 3 (c), Fraktion 2 (d) und Fraktion 1 (e) aus der Gelchromatographie (Fig. 3). Elektrolysebedingungen: siehe MATERIAL UND METHODEN.

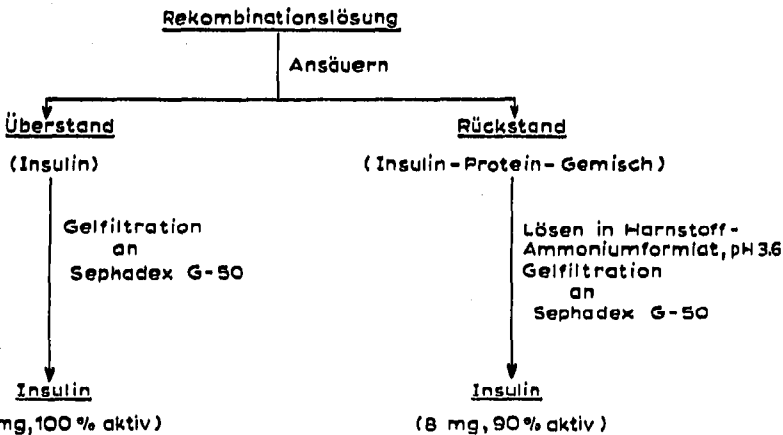


Fig. 5. Wiedergewinnung von Insulin aus den Rekombinationsprodukten.

Versuch zur Reinigung eines Hybridinsulins

Die Reinigung der nach Merrifield synthetisierten, vierfach variierten A-Kette erfolgte nach der Methode von SHIMONISHI UND ZAHN²². Die Kombination der synthetischen A-Kette mit natürlicher Rinderinsulin-B-Kette zum Hybridinsulin wurde, wie oben beschrieben, im Gewichtsverhältnis 2:1 durchgeführt. Die Rekombinationslösung hatte 17.4% Primäraktivität. Nach Fällung mit Säure und Chromatographie des Überstandes an Sephadex G-50 in 1 N Essigsäure wurde kein Insulin-positiver Peak eluiert. Das Präzipitat löste sich auch nach halbstündigem Verreiben mit 8 M Harnstoff/0.2 M Ammoniumformiat-Puffer, pH 3.6, nur unvollständig. Die grösste Menge Protein aus dem Präzipitat wurde nach Gelfiltration an derselben Säule im Ausschlussbereich eluiert; der Peak enthielt 10% Insulin-Aktivität.

Im Insulinbereich wurde keine Aktivität gefunden. Nach der hier beschriebenen Methode war es nicht möglich, die Insulin-Aktivität aus dem Proteingemisch abzutrennen.

DISKUSSION

In dem hier beschriebenen Verfahren ist es gelungen, nach Rekombination von reduzierter A-Kette (aus dem S-Sulfonat durch Reduktion mit Thiol) mit S-sulfonierter B-Kette des Rinderinsulins im Gewichtsverhältnis 2:1 ca. 100 % der im Rekombinationsprodukt enthaltenen Insulin-Aktivität als vollwirksames kristallines Insulin wiederzugewinnen. Das Rekombinat enthielt 34 % Insulin-Aktivität, bezogen auf die im Unterschuss eingesetzte S-sulfonierte B-Kette. Die Insulin-Reinigung ist sehr einfach und gut reproduzierbar. Sie besteht aus folgenden Einzelschritten: Einengen der Rekombinationslösung, Ansäuern, Chromatographie des Überstandes an Sephadex G-50 in 1 N Essigsäure, Auflösen des Präzipitates in wenig saurem Harnstoff-Puffer und Gelfiltration des Insulins an derselben Säule. Ionenaustauschchromatographie und hochmolare Harnstoff-Puffer für die Elution waren nicht erforderlich. Nach KATSOYANNIS UND TOMETSKO¹⁵ war bei analogen Versuchen mit natürlichem Insulin für die Gewinnung von 50 % der Insulin-Aktivität ein molares Verhältnis von 5:1 notwendig.

Die Ursache für die misslungene Reinigung eines Hybridinsulins, dessen A-Kette nach der Merrifield-Methode synthetisiert worden war, könnten die bei der Festkörpersynthese entstandenen Kettenstümpfe sein, die durch einmalige Austauschchromatographie vor der Rekombination höchstwahrscheinlich nicht abzutrennen sind. Die andere Abweichung vom natürlichen Rinderinsulin betrifft vier Sequenzvariationen in der A-Kette des Hybridinsulins, in der zwei Gln durch zwei Glu und zwei andere hydrophile Aminosäuren durch Ala ersetzt sind. Damit ergibt sich ein erheblicher Unterschied in der negativen Nettoladung des Hybridinsulins, der dafür verantwortlich sein könnte, dass durch Ansäuern der Rekombinationslösung das gesamte Insulin mitgefällt wird. Vielleicht könnte die Ausbeute an Insulin-Aktivität im Rekombinat wesentlich verbessert werden, wenn die A-Kette im grossen Überschuss, z.B. im Verhältnis 5:1, eingesetzt wird. Das wäre allerdings im Hinblick auf die Kombination synthetischer Ketten nicht rationell.

DANK

Den Farbwerken Hoechst AG danken wir für die Überlassung von Rinderinsulin. Herrn Prof. Dr. G. WEITZEL sei für die Förderung der Arbeit gedankt, Frau E. HOFMANN sind wir für die Durchführung der Tierversuche und Frau Dr. A.-M. FRETZDORFF für die quantitativen Aminosäureanalysen zu Dank verpflichtet. Die Insulin-freien A- und B-Ketten verdanken wir Herrn Dr. U. WEBER, der auch die Rekombinationen durchführte.

ZUSAMMENFASSUNG

Die quantitative Wiedergewinnung von biologisch aktivem kristallinem Rinderinsulin aus den Rekombinationsprodukten natürlicher A- und B-Kette wird beschrieben.

S-Sulfonat-A-Kette aus Rinderinsulin wurde nach Reduktion mit Mercapto-äthanol in zweifachem Gewichtsüberschuss mit natürlicher S-Sulfonat-B-Kette kombiniert. Nach beendeter Reaktion wurde die Kombinationslösung auf pH 7.0 eingestellt. Die Insulinausbeute betrug 34 %, bezogen auf die im Unterschuss zugegebene B-Kette (Mäusekrampfpest). Die Lösung wurde sofort eingeeengt, angesäuert und der Überstand vom Präzipitat abgetrennt. Aus beiden Fraktionen wurde die gesamte Menge Insulin, die in der Kombinationslösung enthalten war, durch Gelfiltration an Sephadex G-50 in 1 N Essigsäure wiedergewonnen. Die Chromatographie erbrachte folgende Aktivitäten: nach Reinigung des Überstandes 100 %, nach Reinigung des Präzipitats 90 %. Die Identität mit Rinderinsulin wurde bewiesen durch die Wanderungsgeschwindigkeit bei der Gelfiltration, Cellogel-elektrophorese, Mäusekrampfpest, Kristallisation und quantitative Aminosäureanalyse. Die Methode ist einfach und gut reproduzierbar.

Es war nicht möglich, ein nach Merrifield synthetisiertes Hybridinsulin aus dem sehr heterogenen Proteingemisch, das bei der Festkörpersynthese anfiel, abzutrennen. Die möglichen Ursachen werden diskutiert.

LITERATUR

- 1 J. MEIENHOFER, E. SCHNABEL, H. BREMER, O. BRINKHOFF, R. ZABEL, W. SROKA, H. KLOSTERMEYER, D. BRANDENBURG, T. OKUDA UND H. ZAHN, *Z. Naturforsch.*, 18b (1963) 1120.
- 2 H. ZAHN, *Naturwissenschaften*, 52 (1965) 99.
- 3 P. G. KATSOYANNIS, A. TOMETSKO UND K. FUKUDA, *J. Amer. Chem. Soc.*, 85 (1963) 2863.
- 4 P. G. KATSOYANNIS, K. FUKUDA, A. TOMETSKO, K. SUZUKI UND M. TILAK, *J. Amer. Chem. Soc.*, 86 (1964) 930.
- 5 C. I. NIU, Y. T. KUNG, W. T. HUANG, L. T. KE, C. C. CHEN, Y. C. CHEN, Y. C. DU, R. Q. JIANG, C. L. TSOU, S. C. HU, S. Q. CHU UND K. Z. WANG, *Sci. Sinica*, 14 (1965) 1386.
- 6 G. H. DIXON, *Excerpta Medica Int. Congr. Ser.*, 83 (1964) 1207.
- 7 H. KLOSTERMEYER UND R. E. HUMBEL, *Z. Angew. Chem.*, 78 (1966) 871.
- 8 A. C. TRAKATELLIS UND G. P. SCHWARTZ, *Fortschr. Chem. Org. Naturst.*, 26 (1968) 120.
- 9 K. LÜBKE UND H. KLOSTERMEYER, *Advan. Enzymol.*, 33 (1970) 445.
- 10 G. H. DIXON UND A. C. WARDLAW, *Nature (London)*, 188 (1960) 721.
- 11 Y. C. DU, Y. S. ZHANG, Z. X. LU UND C. L. TSOU, *Sci. Sinica*, 10 (1961) 84.
- 12 C. I. NIU, Y. T. KUNG, W. T. HUANG, L. T. KE, C. C. CHEN, Y. C. CHEN, Y. C. DU, R. Q. JIANG, C. L. TSOU, S. C. HU, S. Q. CHU UND K. Z. WANG, *Sci. Sinica*, 15 (1966) 231.
- 13 F. G. BANTING, C. H. BEST, J. B. COLLIP UND J. J. R. MACLEOD, *Proc. Trans. Roy. Soc. Can.*, 16 (1922) 27.
- 14 H. ZAHN, W. DANHO, H. KLOSTERMEYER, H. G. GATTNER UND J. REPIN, *Z. Naturforsch.*, 24b (1969) 1127.
- 15 P. G. KATSOYANNIS UND A. TOMETSKO, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 55 (1966) 1554.
- 16 P. G. KATSOYANNIS, A. C. TRAKATELLIS, S. JOHNSON, C. ZALUT UND G. P. SCHWARTZ, *Biochemistry*, 6 (1967) 2642.
- 17 G. R. STARK, W. H. STEIN UND S. MOORE, *J. Biol. Chem.*, 235 (1960) 3177.
- 18 D. M. YOUNG UND A. H. LEWIS, *Science*, 105 (1947) 368.
- 19 J. JENTSCH, *Z. Naturforsch.*, 24b (1969) 1290.
- 20 C. C. YIP, *Arch. Biochem. Biophys.*, 127 (1968) 741.
- 21 J. JENTSCH, unveröffentlichte Ergebnisse.
- 22 Y. SHIMONISHI UND H. ZAHN, *Biochim. Biophys. Acta*, 154 (1968) 598.