

ANGEWANDTE CHEMIE

FORTSETZUNG DER ZEITSCHRIFT »DIE CHEMIE«

HERAUSGEGEBEN VON DER GESELLSCHAFT DEUTSCHER CHEMIKER

84. JAHRGANG 1972

HEFT 8

SEITE 319–368

Träger-gebundene, biologisch aktive Substanzen und ihre Anwendung

Von Hans Dieter Orth und Wolfgang Brümmer^[*]

Durch Bindung von Enzymen an geeignete Träger lassen sich stabile Katalysatoren gewinnen. Es werden die wichtigsten Methoden ihrer Herstellung sowie ihre Eigenschaften erläutert. Besonders interessant erscheint die Anwendungträger-gebundener Enzyme in der biochemischen Routineanalytik als „unlösliche Reagentien“ für Analysenautomaten und für Enzymelektroden. Für präparative Stoffumwandlungen und Synthesen bieten die träger-gebundenen Enzyme den Vorteil, die bisher meist diskontinuierlichen Prozesse in kontinuierliche umwandeln und proteinfreie Reaktionsprodukte erhalten zu können. Durch Verwendung träger-gebundener Proteasen als spezifische Adsorbentien läßt sich eine Reihe natürlich vorkommender Inhibitoren in einfacher Weise isolieren. Dieses Prinzip, das der Affinitätschromatographie zugrunde liegt, wird heute umgekehrt auch zur Reinigung von Enzymen und anderen biologisch aktiven Substanzen an entsprechenden träger-gebundenen Effektoren ausgenutzt.

1. Einleitung

In den letzten Jahren entwickelte sich eine biochemische Arbeitsrichtung, das „enzyme engineering“, das eine erweiterte Ausnutzung der spezifischen katalytischen Fähigkeiten von Enzymen zum Ziel hat. Zunächst wurde versucht, Enzyme durch Einschluß in oder Bindung an wasserunlösliche Träger so zu stabilisieren, daß sie mehrfach wieder verwendet werden können. Derartige polymer-gebundene Enzyme lassen sich nicht nur als spezifische Reaktionskatalysatoren, sondern auch als selektive Adsorbentien verwenden, zum Beispiel für natürlich vorkommende Inhibitoren. Nach dieser neuen, als Affinitätschromatographie bezeichneten Technik können umgekehrt viele Enzyme durch selektive Adsorption an entsprechenden unlöslichen Inhibitoren oder anderen spezifischen Effektoren (Substrat- oder Coenzymanaloga, Antikörper) in hoher Reinheit isoliert werden.

Die Aufgabe dieses Fortschrittsberichtes soll es sein, die Anwendungsmöglichkeiten träger-gebundener Enzyme für Stoffumwandlungen und träger-gebundener Effektoren für Stoffisolierungen an ausgewählten Beispielen darzustellen.

2. Bindung von Proteinen an Träger

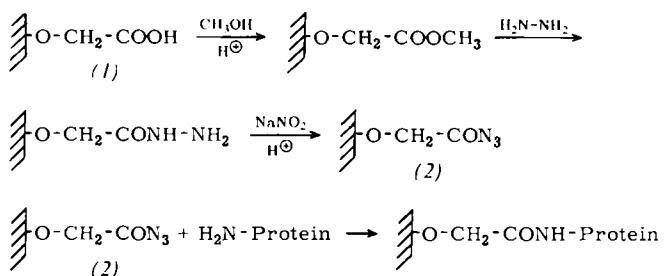
2.1. Methoden

In den letzten Jahren erschien eine große Zahl von Publikationen, die sich mit der Bindung biologisch aktiver Proteine an unlösliche Träger befassen. Wesentliche Beiträge zur Entwicklung dieses neuen Gebietes der Enzymologie stammen aus den Arbeitskreisen von Katchalski, Goldstein, Manecke, Porath, Axen, Kay, Hornby, Lilly, Crook, Cuatrecasas und Anfinsen. (Übersichtsaufsätze siehe^[11–15].)

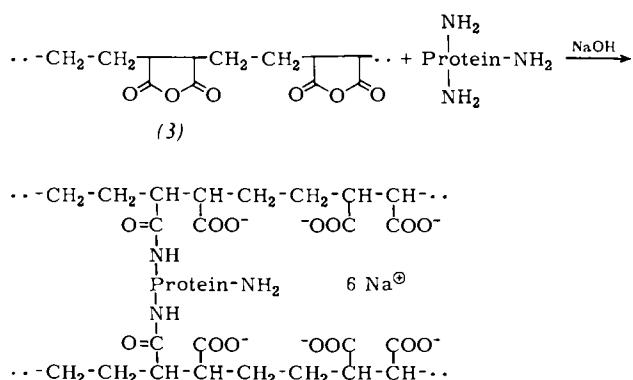
Für die Herstellung träger-gebundener Proteine gibt es kein Standardverfahren. Zur weitgehenden Erhaltung der biologischen Aktivität eines zu bindenden Proteins sind jeweils besondere Reaktionsbedingungen und oft spezielle „maßgeschneiderte“ Trägersubstanzen erforderlich. Zur Fixierung von Proteinen, insbesondere von Enzymen, werden heute drei Prinzipien am häufigsten angewendet:

1. Adsorption an hydrophile Ionenaustauscher^[16–20]. Bei Einhaltung bestimmter Ionenstärken und pH-Werte bleiben zum Beispiel Enzyme mit einem relativ hohen Gehalt an sauren Aminosäuren, wie die später zu besprechende Aminoacylase aus *Aspergillus oryzae*, auch bei hoher Substratkonzentration fest an DEAE-Cellulose oder DEAE-Sephadex gebunden^[16, 17].

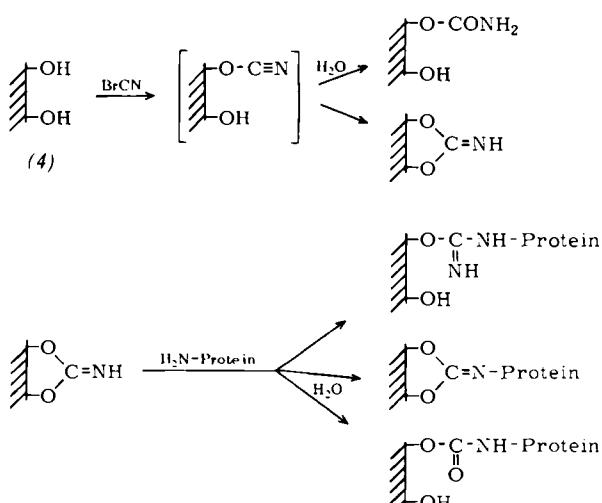
[*] Dr. H. D. Orth und Dr. W. Brümmer
E. Merck, Biochemische Abteilung
61 Darmstadt 2, Postfach 4119



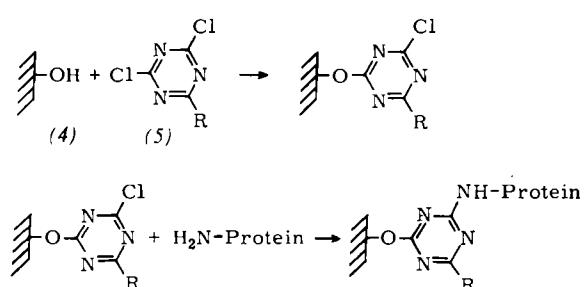
Schema 1. Überführung von Carboxymethylcellulose (1) in die reaktive Azidform (2) und deren Umsetzung mit Proteinen [29, 39, 40].



Schema 2. Bindung von Proteinen an ein Copolymerisat von Äthylen und Maleinsäureanhydrid (3) (EMA) [31, 32].



Schema 3. Aktivierung von Polysacchariden (4) wie Agarose und Cellulose mit BrCN und Umsetzung mit Proteinen [25].



Schema 4. Aktivierung von Polysacchariden (4) wie Agarose und Cellulose mit Cyanursäure-Derivaten (5), $\text{R} = \text{z.B. } \text{NH}_2$ (2-Amino-4,5-dichlor-s-triazin), und Umsetzung mit Proteinen [28, 29].

2. Einschluß in hydrophile Gele durch photokatalysierte Copolymerisation von Acrylamid und *N,N'*-Methylenbis(acrylamid) in Gegenwart des Enzyms^[21–23]. Die Anwendung dieser Methode ist jedoch nur bei Enzymen, die niedermolekulare Substrate umsetzen, sinnvoll, da hochmolekulare Substrate die Poren des Gels nicht mehr passieren und deshalb nicht zu den in der Gelmatrix eingeschlossenen Enzymmolekülen gelangen können. Eine kritische Diskussion der Methode, ausgehend von Untersuchungen an Cholinesterase-Einschlußverbindungen, legten Degan und Miron vor^[23].

3. Bindung an hydrophile natürliche^[24–29] oder synthetische^[30–34] Polymere oder an anorganische Substanzen wie Glas^[35–38] durch kovalente Verknüpfung über funktionelle Gruppen des Enzymproteins, die für die enzymatische Aktivität nicht essentiell sind. Außer für die terminale(n) α -Aminogruppe(n) des Enzymmoleküls trifft dies häufig für die basischen ϵ -Aminogruppen der Lysine, die Hydroxyphenylseitenketten der Tyrosine, die Guanidylseitenketten der Arginine und die Imidazolylgruppen mancher Histidine zu, die deshalb als bevorzugte Verknüpfungsstellen in Frage kommen^[9].

Vor der Umsetzung mit den Proteinen muß der Träger meist noch in eine aktive Form überführt werden. In den Schemata 1–4 werden einige typische Trägersubstanzen aufgeführt.

Es sei hier noch kurz eine in jüngster Zeit von Novais entwickelte, interessante Methode angemerkt, Enzyme komplexchemisch an Oberflächen von Cellulose oder Glas zu binden, die durch Behandlung mit chelatbildenden Übergangsmetallsalzen, insbesondere Titansalzen, aktiviert wurden^[41].

2.2. Sterische Bedingungen

Beim Fixieren von biologischen Makromolekülen muß unter schonenden Bedingungen gearbeitet werden, damit die räumliche Struktur dieser Moleküle, die für ihre Wirksamkeit unbedingt erforderlich ist, erhalten bleibt. Dazu ist gute Hydrophilie und hohe Porosität der Trägermatrix erforderlich^[25, 40, 42]. Als Reaktionsbedingungen kommen mäßige Ionenstärke, pH-Werte zwischen etwa 4 und 10 und Temperaturen zwischen 0 und etwa 35°C in Frage. Um die Erhaltung der räumlichen Struktur sowie die freie Zugänglichkeit des aktiven Zentrums zu garantieren, ist es auch oft günstig, das Makromolekül nicht unmittelbar, sondern unter Zwischenschaltung einer Seitenkette („spacer“) an den Träger zu binden. Dies kann zum Beispiel durch ein α,ω -Diaminoalkan oder eine ω -Aminocarbonsäure bewirkt werden^[14, 15, 42].

Außerdem ist es für einen sterisch ungehinderten Kontakt mit Substraten und Effektoren nötig, daß nicht zu viele Gruppen des Makromoleküls kovalent an den Träger geknüpft sind. Da die Bindung meist über NH_2 -Gruppen erfolgt und sich bei Peptiden die pK-Werte der endständigen NH_2 -Gruppen deutlich von den pK-Werten der NH_2 -Gruppen in den Lysinseitenketten unterscheiden, läßt sich durch Variation des pH-Wertes erreichen, daß die Bindung vorwiegend über die endständige $\alpha\text{-NH}_2$ -Gruppe zustande

kommt, vorausgesetzt, daß diese nicht durch die räumliche Anordnung der Peptidkette verdeckt ist. So nahm Immunglobulin, das bei pH = 9 an aktivierte Agarose gekuppelt worden war, nur 7% der berechneten Insulinmenge auf, während das bei pH = 6.5 fixierte Immunoglobulin 77% band^[14].

3. Eigenschaften unlöslicher Enzyme

3.1. Stabilität

Die Mehrzahl der bisher beschriebenen träger-gebundenen Enzyme ist wesentlich stabiler als die entsprechenden löslichen Enzyme^[9], so daß man, unter der Voraussetzung eines geeigneten Trägers und schonender Kupplungsbedingungen, diese Eigenschaft als für gebundene Enzyme charakteristisch ansehen darf. Offenbar wird die native Konformation des Enzyms durch Bindung an einen unlöslichen Träger besser vor denaturierenden Einwirkungen geschützt. Bei kontinuierlicher Anwendung kommt dazu noch der stabilisierende Einfluß des Substrates.

Als Beispiel für die Stabilisierung träger-gebundener Proteasen infolge herabgesetzter Autolyse ist in Abbildung 1 der zeitliche Verlauf der Restaktivität von Rindertrypsin in löslicher und gebundener Form nach Vorinkubation bei 55°C dargestellt^[39].

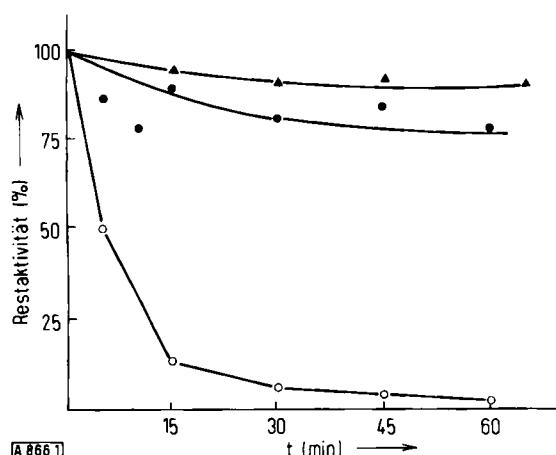


Abb. 1. Restaktivität von Trypsin (Rind) (○), CMC-gebundenem Trypsin (●) und MA-gebundenem Trypsin (▲) nach Vorinkubation bei 55°C gemessen gegen Casein als Substrat [39]. CMC = Carboxymethylcellulose, MA = vernetztes Copolymeres aus 1,4-Bis(vinyloxy)butan und Maleinsäureanhydrid.

3.2. Aktivität

Träger-fixierte Enzyme sind im allgemeinen weniger aktiv als die entsprechenden nativen Enzyme. Bei Enzymen, die auf niedermolekulare Substanzen einwirken, findet man nach der Fixierung durchschnittlich 40–80% Restaktivität^[9], während polymer gebundene Hydrolasen gegen ihre hochmolekularen Substrate nur noch zu 5–40% aktiv sind^[25, 27]. In Einzelfällen wurden hier auch höhere Werte angegeben^[24, 26]. Dieser partielle Aktivitätsverlust wird jedoch durch die vielfache Wiederverwendbarkeit unlöslicher Enzyme aufgewogen. Einige Gründe für die veränderte Aktivität der gebundenen Enzyme werden im folgenden diskutiert.

4. Parameter, die die Eigenschaften unlöslicher Enzyme beeinflussen

4.1. Sterische Hinderung

Die Kupplung eines Enzymmoleküls an den Träger geschieht in der Regel nicht über eine, sondern über mehrere Bindungsstellen. Damit tritt eine gewisse Vernetzung ein, die zusammen mit einer möglichen intramolekularen Vernetzung der aktivierte Matrix selbst den Zugang eines Substrates zu einem gebundenen oder eingeschlossenen Enzymmolekül behindert. Dies gilt insbesondere für Enzyme wie Proteasen, Amylasen und Nucleasen, die hochmolekulare Substrate abbauen^[1, 4, 5, 9]. Cresswell und Sanderson untersuchten diesen Effekt an einer unlöslichen mikrobiellen Protease (Pronase aus *Streptomyces griseus*), die an ein diazotiertes Copolymerisat von Leucin und *p*-Aminophenylalanin^[43] gebunden war^[44]. Dabei stellten sie eine lineare Abhängigkeit der proteolytischen Restaktivitäten vom Logarithmus des Molekulargewichtes des Substrates fest: Die proteolytische Aktivität wird mit zunehmendem Molekulargewicht des Substrates immer kleiner. Nur die direkt an der Oberfläche der porösen Partikel fixierten Enzymmoleküle sind schließlich noch aktiv. Dasselbe gilt sinngemäß für Protease-Inhibitoren, die mit steigendem Molekulargewicht einen immer kleineren Anteil des gebundenen Enzyms hemmen können^[27, 32, 45]. Die Verhältnisse sind ähnlich wie bei der Ausschlußchromatographie von Proteinen an vernetzten Dextrans, bei denen der Anteil des jeweiligen Porenvolumens, das für ein Protein zugänglich ist, vom Molekulargewicht des Proteins abhängt.

4.2. Elektrostatische Wechselwirkungen

Ausschließlich sterische Hinderung ist nur bei ungeladenen Trägern oder ungeladenen Substraten zu beobachten. Bei ionischen Trägersubstanzen kommt die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Träger und gleich- oder gegenseitig geladenen Enzymsubstraten hinzu. Dieser Effekt konnte zum Beispiel bei der Aktivierung von Chymotrypsinogen A und Chymotrypsinogen B durch Trypsin demonstriert werden, das an einen Träger mit anionischen Gruppen (Carboxymethylcellulose, siehe Schema 1) gebunden war^[39]. Beide Proenzyme besitzen nämlich das gleiche Molekulargewicht (25 000), aber verschiedene elektrische Ladungen (isoelektrische Punkte bei pH = 9.5 bzw. pH = 5.2). Zur Aktivierung von Chymotrypsinogen B, das unter den Reaktionsbedingungen negativ geladen ist, war die siebenfache Menge an gebundenem Trypsin erforderlich wie für das positiv geladene Chymotrypsinogen A^[39]. Bei ungleicher Ladung von Trägermatrix und Substrat bildet sich an der Trägeroberfläche eine höhere Substratkonzentration als in der Außenlösung aus. Entsprechend resultiert bei gleicher Ladung von Träger und Substrat durch die elektrostatische Abstoßung eine Substratverarmung in der Mikroumgebung des gebundenen Enzyms. Außerhalb des Substratsättigungsbereichs wirkt eine solche ungleiche Substratverteilung zwischen Außen- und Innenphase im

Sinne einer Erhöhung bzw. Erniedrigung der Aktivität des gebundenen Enzyms. Es zeigt scheinbar eine größere bzw. kleinere Affinität zu seinem Substrat^[4, 46].

Analog verhalten sich auch die H⁺-Ionen. Wie McLaren zeigte, konzentrieren sie sich an negativ geladenen Oberflächen und bewirken dadurch einen „Oberflächen-pH“, der bis zu zwei Einheiten tiefer liegen kann als in der Außenphase^[47, 48]. Diese Effekte wurden später von Goldstein et al. an EMA-gebundenem Trypsin und Chymotrypsin eingehend untersucht^[3, 4] (siehe auch Schema 2). Die elektrostatische Wechselwirkung kann im Falle ungleichnamiger Ladung von Träger und Enzymsubstrat durchaus vorteilhaft sein. Wenn nämlich im Laufe einer enzymatischen Umsetzung die Substratkonzentration abnimmt, dann fällt die Reaktionsgeschwindigkeit des träger-fixierten Enzyms in wesentlich geringerem Maße ab als beim gelösten Enzym^[49].

4.3. Diffusion

Ein weiterer Faktor, der die Substratkonzentration in der Mikroumgebung eines gebundenen Enzyms und damit seine Aktivität beeinflußt, ist die Diffusion. Dies macht sich schon dadurch bemerkbar, daß unlösliche Enzyme ihre maximale Aktivität nur bei ausreichend hohen Rührgeschwindigkeiten des Reaktionsansatzes entfalten^[50–52]. Der Einfluß der Diffusion auf die Aktivität eines gebundenen Enzyms hängt dabei ab von der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit V_{max} des einzelnen Enzyms, dem Diffusionskoeffizienten des Substrates und der Dicke der Diffusionszone^[46].

Betrachtet man jedoch nicht nur einstufige enzymatische Umsetzungen, sondern auch durch mehrere Enzyme in geordneter Reihenfolge katalysierte Reaktionssequenzen, wie sie dem physiologischen Geschehen in der Zelle weitgehend entsprechen, dann kann die durch limitierte Diffusion bewirkte lokale Anreicherung eines Metaboliten in der Mikroumgebung einer struktur-gebundenen Enzymsequenz gerade zu einer besonderen Effektivität des Gesamtsystems führen.

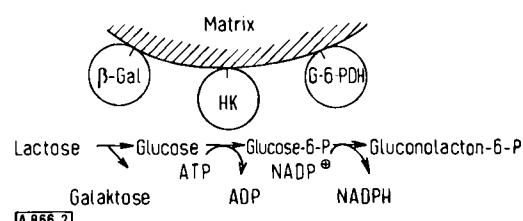


Abb. 2. Schematische Darstellung einer dreistufigen Sequenz mitträger-gebundenen Enzymen [β-Galaktosidase (β-Gal) – Hexokinase (HK) – Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G-6-PDH)] (nach [53]).

Mosbach und Mattiasson^[53] haben dies an einem träger-gebundenen Drei-Komponenten-System untersucht, wobei β-Galaktosidase, Hexokinase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase zusammen an BrCN-aktiviertes Sephadex gebunden wurden (siehe Abb. 2). An diesem System, in dem die Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration der Intermediärprodukte abhängt, konnte eine den drei Einzel-

enzymen in Lösung überlegene Effektivität des träger-gebundenen „Multienzymsystems“ demonstriert werden, da die zunächst gebildete Glucose nicht sofort in die Außenphase abdiffundiert, sondern in hoher Konzentration den folgenden enzymatischen Reaktionsschritten zur Verfügung steht.

Es zeigt sich hier, daß das Studium der Eigenschaften träger-gebundener Enzyme auch zur vertieften Einsicht in die physiologische Wirkungsweise vieler membran- und struktur-gebundener Enzyme der Zelle beitragen kann.

5. Bindung von Enzymeffektoren an Träger

5.1. Knüpfen der kovalenten Bindung

Die Effektoren werden mit den Trägerharzen ausschließlich durch kovalente Bindungen verknüpft. Bindungen durch Adsorption, ionische Wechselwirkung oder durch Einschluß in poröse Polymere halten den drastischen Elutionsbedingungen (hohe Ionenstärke, extreme pH-Werte etc.), die zur Elution der affinitätschromatographisch gereinigten Substanzen häufig notwendig sind, nicht stand. Physikalisch belegte Träger bluten dabei aus, d. h. ihre Kapazität wird vermindert und ihre Eignung für die Affinitätschromatographie schließlich aufgehoben.

Die kovalente Bindung kommt in vielen Fällen über Aminogruppen der Effektoren zustande; dazu dienen die bereits für die Proteinbindung (in Abschnitt 2.1) beschriebenen Methoden. Zur Herstellung einer Carbonsäureamidbindung wird neben der Azidmethode häufig die Carbodiimidaktivierung verwendet, wobei sich die Carbonylgruppe am Träger (siehe Abschnitt 2.1), aber auch am Effektor befinden kann. Aminogruppenhaltige Träger erhält man durch Anbringen geeigneter Seitenketten (siehe Abschnitt 2.2). Am freien Ende der Seitenkette kann auch eine aromatische Aminogruppe stehen, so daß ein aromatischer Effektor durch Diazokupplung fixiert werden kann. Im Gegensatz zu Proteinen müssen niedermolekulare Effektoren nicht unbedingt in wäßrigem Milieu, sondern können auch in organischen Lösungsmitteln an den Träger gebunden werden^[5, 14, 15, 54, 55].

5.2. Adsorption, Elution und Einfluß der Seitenkette

Die Adsorption der zu reinigenden Substanz, z. B. eines Enzyms, kann aus Rohextrakten oder vorgereinigten Lösungen erfolgen. Die Affinitätsharze werden im Satz- und im Säulenchromatographieverfahren angewendet. Im Satzverfahren („batch“-Verfahren) kann nur gearbeitet werden, wenn die Dissoziationskonstante des Komplexes, den die beiden Reaktionspartner bilden, klein, d. h. der Komplex fest ist. Das Säulenverfahren ist dagegen auch anwendbar, wenn die Dissoziationskonstante des Komplexes groß ist. In diesem Fall wird der gelöste Partner während der Chromatographie nicht festgehalten, sondern nur retardiert, und die Elution ist problemlos.

Das Zerlegen von Komplexen, die durch kleine Dissoziationskonstanten charakterisiert sind, erfordert dagegen

meist drastische Milieuänderungen wie Erwärmung, extreme pH-Werte, große Ionenstärken oder hohe Konzentrationen an Denaturierungsmitteln. Die zu desorbierten Makromoleküle werden dabei häufig irreversibel inaktiviert^[14, 15]. Mildere Elutionsbedingungen reichen aus, wenn die Stärke des Komplexes herabgesetzt werden kann. Dies ist durch eine Verkürzung der Seitenkette möglich, über die der eine Reaktionspartner an den Träger gebunden ist. Allerdings geht hierbei zugleich die Kapazität des belegten Trägers zurück.

Mikrobielle β -Galaktosidase wird von *S*-(*p*-Aminophenyl)- β -D-1-thiogalaktopyranosid gehemmt. Der agarose-gebundene Inhibitor hält das Enzym in Abhängigkeit von der Seitenkettenlänge unterschiedlich stark zurück. Das Enzym wird von Träger A kaum und von Träger B nur wenig besser zurückgehalten. Zur Elution sind in beiden Fällen keine verschärften Bedingungen nötig. Sind die Säulen dagegen

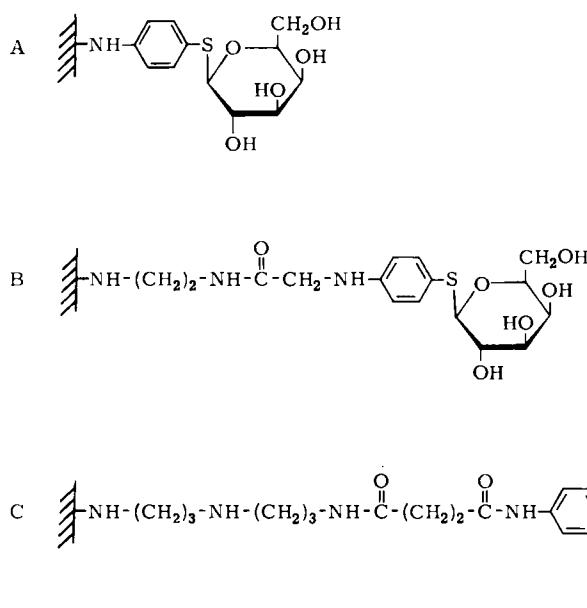


Abb. 3. Agarose-gebundenes *S*-(*p*-Aminophenyl)- β -D-thiogalaktopyranosid [42]. A direkt gebunden, B über *N*'-Acetyl-lathylendiamin gebunden, C über *N*'-Succinyl-bis(aminopropyl)amin gebunden.

mit Träger C (Abb. 3) gefüllt, so wird die β -Galaktosidase sehr fest gebunden. Zur Elution ist 0.1 M Boratpuffer (pH = 10) nötig^[42, 56].

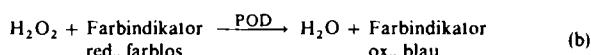
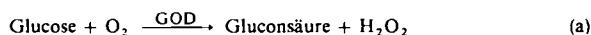
Die Abhängigkeit der Trägerkapazität von der Seitenkettenlänge wurde für den agarose-gebundenen *Staphylococcus*-Nuclease-Inhibitor 3'-(*p*-Aminophenyl-phosphoryl)-desoxythymidin-5'-phosphat gemessen^[42]. Sie beträgt bei direkter Bindung (entsprechend Abb. 3, A) 2 mg Nuclease/ml Gel. Wird als Seitenkette *N*'-Acetyl-lathylendiamin (entsprechend Abb. 3, B) eingeführt, so steigt das Bindungsvermögen auf 8 und mit *N*'-Succinyl-bis(aminopropyl)amin als Seitenkette (entsprechend Abb. 3, C) auf 10 mg Nuclease/ml Gel. In allen drei Fällen enthielten die Säulen 2 μ mol Inhibitor/ml gepacktes Gel.

Es wurde auch über die Elution mit Effektorlösung berichtet, beispielsweise die Elution von L-Asparaginase mit D-Asparagin^[57] (siehe auch Abschnitt 8.1).

6. Anwendung unlöslicher Enzyme in der Analytik

6.1. Analysenautomaten und Enzymelektroden

Hicks und *Updike* verwendeten unlösliche Enzyme, die in vernetztes Polyacrylamidgel einpolymerisiert waren, zur Bestimmung oxidierbarer Substrate in einem automatisierten Analysensystem^[22]. Sie benutzten dabei mit granuliertem Enzymgel gefüllte Mikrosäulen, die von den Analysenlösungen durchströmt wurden. Die Glucosebestimmung wurde zum Beispiel mit unlöslicher Glucose-Oxidase entsprechend Schema 5 durchgeführt.



Schema 5. Glucosebestimmung mit Glucose-Oxidase (GOD) und Peroxidase (POD).

Das entstandene H_2O_2 oxidiert in Gegenwart von Peroxidase einen im reduzierten Zustand farblosen Farbindikator wie *o*-Tolidin. Die Intensität der dabei auftretenden Färbung entspricht der Glucosekonzentration in der Analysenlösung. Wird anstelle der Indikatorreaktion (b) eine empfindliche Sauerstoff-Elektrode verwendet, dann hat man ein reagenslos arbeitendes Analysensystem^[58].

Um von der Strömungsgeschwindigkeit unabhängig zu werden, entwickelten *Hicks* und *Updike* eine Enzymelektrode^[59]. Sie besteht aus einer hochempfindlichen O_2 -

Elektrode, umhüllt mit einer 25–50 μm dicken Gelschicht mit einpolymerisierter Glucose-Oxidase. Wird diese Sonde in Körper- oder Gewebsflüssigkeit getaucht, so diffundieren O_2 und Glucose in die Enzymschicht, wo die O_2 -Konzentration durch die enzymatische Glucoseoxidation herabgesetzt wird und als Veränderung des Elektrodenpotentials registriert werden kann. Das Prinzip ist also ähnlich wie bei der Messung der H^+ -Konzentration mit der pH-Elektrode.

Guilbault und *Montalvo* haben eine Enzymelektrode, zur kontinuierlichen Bestimmung von Harnstoff beschrieben, die nach dem gleichen Prinzip arbeitet^[60]. Hierbei wird eine NH_4^+ -Ionen-empfindliche, kationische Glaselektrode mit einer dünnen Schicht von vernetztem Polyacrylamidgel, in dem Urease eingeschlossen ist, umgeben. Der aus der Analysenlösung in das Enzymgel diffundierende Harnstoff wird dort zu HCO_3^- und NH_4^+ -Ionen umgesetzt, deren

Konzentration mit der Elektrode potentiometrisch gemessen wird.

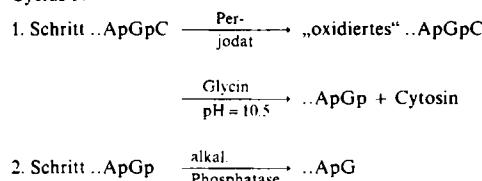
Wird anstelle von Urease L-Aminosäure-Oxidase in das Gel einpolymerisiert^[61], so erhält man eine Enzymelektrode, die für L-Aminosäuren spezifisch ist.

6.2. Sequenzanalyse von Nucleotiden und Peptiden

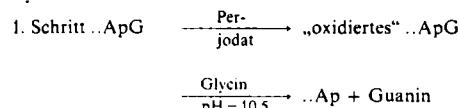
Auch die Automatisierung komplizierter und schwieriger analytischer Untersuchungen wie etwa die Sequenzermittlung von längeren Oligoribonucleotiden könnte mit trägergebundenen Enzymen gelingen.

Für die Sequenzanalyse von t-RNA schlugen *Neu* und *Heppel* eine Methode vor, die im Gegensatz zum üblichen Verfahren – der enzymatischen Fragmentierung der RNA mit spezifischen Endo- und Exonucleaseen – einen schrittweisen Abbau vom freien 3'-OH-Ende des jeweils terminalen Nucleosids gestattet^[62]. Dieser Abbau verläuft in zwei Stufen. Der erste Schritt besteht in der Perjodat-Oxidation der exponierten vicinalen OH-Gruppen der freien Ribose des terminalen Nucleosids und anschließender Eliminierung der terminalen Base. Im zweiten Schritt wird der neu gebildete Phosphatmonoester mit alkalischer Phosphatase abgespalten; damit werden die vicinalen OH-Gruppen der vorletzten Ribose freigesetzt. Die Reaktionsfolge wiederholt sich dann, wie in Schema 6 dargestellt.

Cyclus I:



Cyclus II:



etc.

Schema 6. Stufenweise Sequenzierung eines Oligonucleotids.
A = Adenin, G = Guanin, C = Cytosin (nach [62], verändert).

Wenn jedoch nach dem zweiten Reaktionsschritt die Phosphatase nicht quantitativ entfernt wurde, wird beim nächsten Cyclus schon während des ersten Reaktionsschrittes teilweise auch die schützende Phosphatgruppe am vorletzten Nucleosid, das dann ebenfalls reagiert, abgespalten. Nach wenigen Reaktionsfolgen werden die Ergebnisse unbrauchbar^[63]. *Zingaro* und *Uziel* haben diese Schwierigkeit durch Verwendung unlöslicher Phosphatase, die kovalent an copolymerisiertes Äthylen-Maleinsäureanhydrid (EMA) gebunden war, weitgehend überwunden^[64]. Das träger-fixierte Enzym ist gegen native RNA noch ausreichend aktiv. Die Autoren versuchen nun, einen nach diesem Prinzip arbeitenden automatischen RNA-Sequenator zu bauen^[64].

Lee berichtet über die erfolgreiche Bindung von Ribonuclease T₁ an BrCN-aktivierte Sepharose^[65]. Der Vorteil bei der Verwendung des gebundenen Enzyms besteht darin, daß man die spezifische Fragmentierung der RNA durch einfache Zentrifugation zu jedem Zeitpunkt, der für die Trennung der Spaltprodukte oder ihre anschließende Sequenzierung günstig ist, unterbrechen kann.

Prinzipiell gilt dies auch für die hydrolytische Spaltung von Proteinen mit träger-fixierten spezifischen Endo- und Exopeptidasen. Erfolgversprechende erste Versuche zur Sequenzierung von Peptiden mit einer unlöslichen Leucin-Aminopeptidase führte *Schwabe*^[66] durch. Das Enzym war jedoch nicht kovalent an einen Träger gebunden, sondern wurde in Form eines Adsorbats an Calciumphosphat-gel verwendet.

7. Anwendung unlöslicher Enzyme zur Gewinnung von Reaktionsprodukten

7.1. Stoffumwandlungen

Von den etwa 2000 bis jetzt bekannten Enzymen haben nur wenige, vorwiegend Hydrolasen, industrielle Anwendung gefunden. Neben Bakterienproteasen für die Waschmittelindustrie werden heute zum Beispiel Proteasen, Amylasen und Amyloglucosidases im Tonnenmaßstab für die Lebensmittelindustrie erzeugt^[67]. Natürlich muß es sich bei diesen technischen Enzymen als „Industriekalien“ um stabile und billige Produkte handeln. Für eine eventuelle Ablösung dieser Enzyme durch träger-gebundene Typen werden in besonderem Maße wirtschaftliche Gesichtspunkte maßgebend sein. Nur billige Träger und einfache Verfahren zur Enzymfixierung können hierbei in Frage kommen.

7.1.1. Gewinnung von L-Methionin

Tosa et al. haben ein Verfahren zur kontinuierlichen Racemattrennung von acetylierten D,L-Methionin durch an DEAE-Cellulose oder DEAE-Sephadex adsorbierte Aminoacylase aus *Aspergillus oryzae* entwickelt^[16, 17]. Sie arbeiten mit einer auf 50°C erwärmten Enzymsäule, die von unten nach oben mit der Racematlösung durchströmt wird. Dabei wird durch das Enzym nur die L-Form entacetyliert; sie kann abgetrennt und in kristalliner Form isoliert werden. Erst nach einer Laufzeit von 4 Wochen verliert die Säule 40% ihrer Aktivität. Durch Einspeisen einer entsprechend dosierten Menge löslichen Enzyms, das nun wieder fixiert wird, kann dieser Verlust kompensiert werden, ohne die Säulenfüllung wechseln zu müssen. Die Anlage, die schematisch in Abbildung 4 dargestellt ist, soll eine Produktion bis zu 20 Tonnen im Monat ermöglichen^[68].

Die Überlegenheit des kontinuierlichen Verfahrens mit träger-gebundenem Enzym gegenüber dem „batch“-Verfahren mit löslichem Enzym ergibt sich aus der Tatsache, daß bei Verwendung jeweils gleicher Enzimmengen und unter jeweils optimalen Bedingungen im Verfahren nach Abbildung 4 die zehnfache Menge L-Methionin wie beim „batch“-Verfahren gewonnen werden konnte^[17].

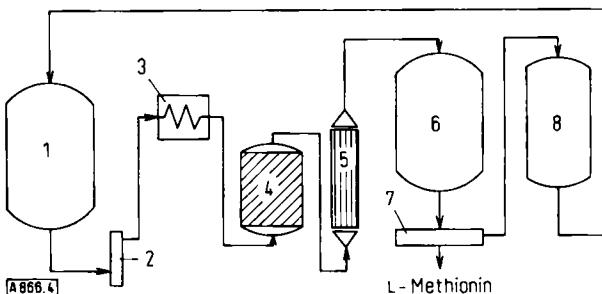


Abb. 4. Schema der kontinuierlichen Gewinnung von L-Methionin aus racemischem Acetyl-D,L-methionin durch Aminacylase aus *Aspergillus oryzae*, adsorbiert an DEAE-Sephadex [68]. 1 Acetyl-D,L-methionin, 2 Filter, 3 Wärmetauscher, 4 Enzymsäule, 5 Verdampfer, 6 Kristallisationsgefäß, 7 Separator, 8 Racemisierungsgefäß.

7.1.2. Stärkeverzuckerung und Invertzuckergewinnung

Smiley et al. untersuchten die Eignung von unlöslicher Amyloglucosidase aus Aspergillen zur kontinuierlichen Verzuckerung von partiell hydrolysierten Stärkelösungen. Da beim Säulenverfahren die Durchlaufgeschwindigkeit der viskosen Substratlösung nicht ausreichte^[19], wurde im Suspensionsverfahren gearbeitet, wobei eine 30-proz. Substratlösung bei 55°C unter Rühren in ein Reaktionsgefäß mit träger-gebundener Amyloglucosidase eingespeist und die durch hydrolytische Spaltung nahezu quantitativ entstandene Glucoselösung über Filter kontinuierlich wieder abgezogen wurde^[20]. Das an DEAE-Cellulose adsorbierte Enzym zeigte während einer Betriebszeit von 3–4 Wochen praktisch keinen Aktivitätsverlust. Wilson und Lilly verwendeten das gleiche Enzym, das jedoch kovalent an 2-Amino-4,6-dichlor-s-triazinaktivierte DEAE-Cellulose gebunden war, ebenfalls zur Stärkeverzuckerung^[49] (siehe auch Schema 4). Der im Säulenverfahren bei 55°C durchgeführte Prozeß lieferte bei einer Säulendiffusionsdimension von nur 5 × 13 cm 3.8 kg Glucose/100 Stunden Betriebszeit, ohne daß die Aktivität des gebundenen Enzyms nachließ. In den technischen Maßstab ist dieses Verfahren jedoch noch nicht übertragen worden. Smiley arbeitet neuerdings an einem Verfahren zur Gewinnung von Invertzucker durch Isomerisierung von Glucose mit träger-gebundener Glucose-Isomerase aus Streptomyces^[69]. Da Glucose als Rohstoff billiger ist als Saccharose, könnte dieser Weg wirtschaftlicher sein als z. B. die Invertierung von Rohrzucker durch Saccharase aus Hefe.

7.1.3. Gewinnung von 6-Aminopenicillansäure

6-Aminopenicillansäure, Ausgangsstoff zahlreicher synthetischer Penicilline, wird heute industriell in einem mikrobiologischen Verfahren vorwiegend durch Spaltung von Benzylpenicillin mit dem in Coli-Bakterien enthaltenen Enzym Penicillin-Amidase gewonnen^[70]. Self, Kay und Lilly untersuchten die Möglichkeit, diesen diskontinuierlichen Prozeß durch ein kontinuierliches Verfahren auf der Basis des isolierten, träger-fixierten Enzyms zu ersetzen^[71]. Damit wäre man von der komplizierten mikrobiologischen Umsetzung unabhängig, der Prozeß wäre leichter zu optimieren und das Reaktionsprodukt frei von Nebenprodukten und Verunreinigungen.

Das aus *E. coli* in einfacher Weise isolierbare Enzym wurde kovalent an DEAE-Cellulose gebunden, die mit einem

Cyanursäurederivat, 2,4-Dichlor-6-carboxymethylamino-s-triazin, aktiviert worden war. Im Gegensatz zum relativ labilen nativen Enzym zeigte das unlösliche im kontinuierlichen Säulenverfahren bei 37°C selbst nach 11 Wochen keinen Aktivitätsverlust. Es ist ein besonderer Vorteil, daß die dabei gewonnene 6-Aminopenicillansäure frei von löslichem, kontaminierendem Enzym ist; nachträgliche Reinigungsoperationen sind überflüssig. Das durch mikrobiologische Umsetzung gewonnene Material muß dagegen noch sorgfältig von Proteinverunreinigungen befreit werden, die bei der späteren therapeutischen Anwendung von Penicillinen allergische Reaktionen hervorrufen könnten. Einen interessanten Vorschlag dazu machten Shaltiel et al., nämlich träger-gebundene unspezifische Proteasen zum Abbau dieser Proteine in immunologisch inaktive Bruchstücke zu verwenden^[72].

7.1.4. Steroidumwandlungen

Eine andere therapeutisch wichtige Substanzklasse, bei der mikrobiologische Stoffumwandlungen eine entscheidende Rolle spielen, sind die Steroide. Die Anwendung trägerfixierter Enzyme erscheint hier jedoch wegen der Instabilität der steroid-transformierenden Enzyme wesentlich schwieriger. Mosbach und Larsson versuchten Enzymeinschlußverbindungen in Polyacrylamidgel für die 11β-Hydroxylierung von Reichsteins „Verbindung S“ (17α,21-Dihydroxy-4-pregn-3,20-dion, 11-Desoxycortison) zu Hydrocortison und für die Dehydrierung von Hydrocortison zu Prednisolon (11β,17α,21-Trihydroxy-1,4-pregnadien-3,20-dion) zu verwenden^[31].

Da die Isolierung der für die erste Reaktion benötigten 11β-Hydroxylase aus dem Pilz *Curvularia lunata* wegen der Instabilität des Enzyms nicht gelang, wurden als „Zwischenlösung“ intakte Zellen in das Gel einpolymerisiert und als solche in die Reaktion eingesetzt. Die für den zweiten Reaktionsschritt benötigte Δ¹-Dehydrogenase wurde aus *Corynebacterium simplex* angereichert, wies aber nach Einpolymerisieren in das Gel nur noch 7% ihrer ursprünglichen Aktivität auf.

7.2. Synthesen

7.2.1. Synthese von Poly-I:C

Eine besonders erfolgreiche Anwendung eines träger-gebundenen synthetisierenden Enzyms, der Polynucleotid-Phosphorylase aus *Micrococcus luteus*, gelang Hoffmann et al.^[74] bei der Synthese des Interferoninduktors Poly-I:C, einer gegen Virusinfektionen hochwirksamen Substanz. Für die pharmakologische und klinische Prüfung wurden größere Mengen dieser aus je einem Strang von Polyinosylsäure und Polycytidylsäure bestehenden Ribonucleinsäure benötigt. Die beiden homopolymeren Nucleotide werden durch enzymatische Polymerisation der Nucleosid-5'-diphosphate mit Polynucleotid-Phosphorylase synthetisiert. Die Gewinnung größerer Mengen des Enzyms erwies sich aber als sehr aufwendig. Auch die Isolierung der gebildeten Polynucleotide aus größeren Inkubationsansätzen durch erschöpfende Phenolextraktion, wobei das Enzym jedesmal zerstört wird, machte infolge Emulsionsbildung große Schwierigkeiten.

Die Lösung der Probleme brachte die kovalente Bindung des Enzyms an einen Träger, BrCN-aktivierte Cellulose. In den sechs Monaten, in denen das unlösliche Enzym zu 40 Polymerisationsansätzen benutzt wurde, nahm die Syntheseleistung nicht ab. Zur Trennung von Enzym und Reaktionsprodukt war nur noch eine einfache Zentrifugation erforderlich. Die durch das cellulose-gebundene Enzym synthetisierten Homopolymeren entsprachen den mit löslichem Enzym hergestellten in allen Eigenschaften.

7.2.2. Synthese von Trinucleotiden

In ähnlicher Weise hat Gassen die synthetische Fähigkeit der Ribonuclease, die kovalent an eine hochsubstituierte Carboxymethyl-Cellulose gebunden war, ausgenutzt, um die bisher nur durch schwierige chemische Synthese herstellbaren Trinucleotide UAA, UAG und UGA zu gewinnen^[75]. Diese Trinucleotide, die Terminationscodons der Proteinbiosynthese, werden für spezielle Untersuchungen über den Ablauf der zellfreien Proteinsynthese benötigt. Normalerweise katalysiert Ribonuclease zwar nur Abbaureaktionen, doch läßt sie sich in Gegenwart eines cyclischen Nucleosidphosphats als Donor und eines Nucleosids als Acceptor auch für Synthesen heranziehen^[76, 77]. Diesen Effekt zur Gewinnung von Oligonucleotiden präparativ auszunutzen, ist aber praktisch nicht möglich, da das Enzym aus dem Reaktionsansatz nur sehr schwer quantitativ entfernt werden kann^[77]. Dies ist jedoch unerlässlich, da sonst die synthetisierten Oligonucleotide während der Aufarbeitung hydrolysiert werden. Fest an den Träger gebundene Ribonuclease wird dagegen einfach abzentrifugiert und kann vielfach wiederverwendet werden.

8. Anwendungträger-gebundener, biologisch aktiver Substanzen als spezifische Adsorbentien

Die genannten Adsorbentien eignen sich hervorragend zur Isolierung von Proteinen durch Affinitätschromatographie, die wegen ihrer hohen Spezifität den herkömmlichen Methoden überlegen ist.

8.1. Enzymreinigung und -isolierung

Das erste Beispiel einer affinitätschromatographischen Enzymreinigung stammt von Lerman^[78], der auch Coautor der ersten Publikation über affinitätschromatographische Antikörperisolierung ist^[79]. Bereits 1910 beobachtete Starkenstein^[80] die feste Bindung von Amylase an unlösliche Stärke, und Holmbergh^[81] berichtete 1933 über die Trennung von α - und β -Amylase durch Adsorption an Stärke. Bis zur Einführung der Agarose als Trägermaterial (1967/68)^[82] sind nur relativ wenig affinitätschromatographische Enzymreinigungen beschrieben worden, z.B. die Reinigung der Flavokinase aus Leber an Flavin-cellulose^[83], die Reinigung flavinmononucleotid-(FMN)-abhängiger Enzyme an Flavinphosphat-cellulosen^[84] und die Reinigung von DNA-Polymerase an DNA-Cellulose, wobei die DNA unter UV-Bestrahlung an die Cellulose gebunden worden war^[85].

Carboxypeptidase A, α -Chymotrypsin und *Staphylococcus*-Nuclease waren die ersten Enzyme, die an Agarose-Derivaten affinitätschromatographisch gereinigt wurden^[82]. Die agarose-gebundenen Inhibitoren waren L-Tyrosin-D-tryptophan für Carboxypeptidase A, D-Tryptophan-methylester oder N- ϵ -Aminocaproyl-D-tryptophan-methylester für α -Chymotrypsin und 3'-(4-Aminophenylphosphoryl)desoxythymidin-5'-phosphat für die Nuclease. Zur Elution diente in allen drei Fällen verdünnte Essigsäure (pH = 3).

Die hohe Spezifität der Methode zeigte sich bei der Nuclease dadurch, daß Phosphodiesterase aus Milz, die ähnlich der Nuclease Nucleinsäuren zu 3'-phosphorylierten Spaltstücken hydrolysiert, von der mit dem *Staphylococcus*-Nuclease-Inhibitor belegten Säule nicht festgehalten wurde^[82]. Da auch mit diazotiertem 3'-(4-Aminophenylphosphoryl)desoxythymidin-5'-phosphat inaktivierte Nuclease nicht adsorbiert wurde, konnte mit derselben Säule geklärt werden, worauf die Restaktivität der inaktivierten Nuclease zurückzuführen ist: auf einen Restgehalt an nativem Enzym^[86].

Daß starke sterische Hinderung die Komplexbildung häufig erschwert, wurde dadurch deutlich, daß α -Chymotrypsin von dem Träger, bei dem die Bindung des Inhibitors über den ϵ -Aminocapronsäurerest erfolgte, viel stärker adsorbiert wurde als von dem Träger, an dem der Inhibitor direkt gebunden war. Auch in diesem Fall wurde das durch Diisopropylfluorophosphat inaktivierte Enzym nicht mehr adsorbiert. Wurde das Enzym bei geringerer Ionenstärke chromatographiert, so wurde es fester gebunden. Dies brachte jedoch keinen Vorteil, da gleichzeitig die Möglichkeit größer wurde, daß andere Proteine unspezifisch adsorbiert wurden^[82].

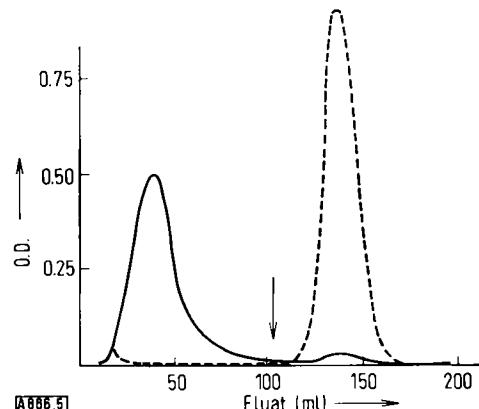


Abb. 5. Isolierung von Asparaginase durch Affinitätschromatographie eines *E. coli*-Extrakts an agarose-gebundenem ϵ -Aminocaproyl-D-asparagin. Zur Desorption der Asparaginase (Pfeil) dient 0.001 M D-Asparagin-Lösung in Puffer [57]. —: Protein (gemessen bei 280 nm), ---: Asparaginase (gemessen bei 570 nm).

Therapeutisch angewandte Enzyme können im allgemeinen nicht oral appliziert werden. Für die erforderliche intravenöse Applikation müssen diese Enzyme von höchster Reinheit sein, um die immunologische Abwehrreaktion möglichst niedrig zu halten.

Asparaginase aus *E. coli* wurde in aufwendigen, vielstufigen Reinigungsprozessen (Hitzedenaturierung, Lösungsmittelfällung, Gelfiltration, Säulenchromatographien) isoliert.

Man erhielt Produkte mit spezifischen Aktivitäten von 270–400 Einheiten/mg^[87, 127]. Durch Affinitätschromatographie ließ sich die Asparaginase aus *E.-coli*-Extrakten an ϵ -Aminocaproyl-D-asparaginagarose in einem Schritt in weitaus höherer Reinheit gewinnen (spezifische Aktivität 10000 Einheiten/mg) (Abb. 5). Die Elution erfolgte mit Effektorlösung (1 mmol/l D-Asparagin).

Obwohl die Asparaginase den optischen Antipoden (D-Asparagin) des natürlichen Substrats L-Asparagin bei pH=8.6 (pH-Wert bei der Chromatographie) mit 5.5% der

Hydrolysegeschwindigkeit des L-Asparagins hydrolysiert, konnte die D-Asparagin-agarose mehr als zehnmal ohne merklichen Kapazitätsverlust verwendet werden^[57]. Asparaginase ist gegen mehrere Leukämiearten therapeutisch wirksam.

Die affinitätschromatographische Reinigung von Papain gelang an einem agarose-gebundenen Inhibitorpeptid^[88] und an agarose-gebundenem 4-Aminophenyl-quecksilber(II)-acetat^[89]. Im letztgenannten Fall wurde mit HgCl₂-Lösung eluiert. Da Quecksilber generell mit SH-Proteinen

Tabelle 1. Affinitätschromatographische Enzymisolierungen.

Enzym	Träger	Effektor	Lit.
an träger-gebundenen Inhibitoren:			
Acetylcholin-Esterase	Agarose	4-Ammoniophenyl-trimethylammoniumdibromid	[92]
	Agarose	4-Ammoniophenyl-trimethylammoniumdichlorid	[93]
	Agarose	Trimethyl-[N-methyl-N-(4-aminophenyl)-3-carbamoyloxyphenyl]ammoniumchlorid	[93]
L-Asparaginase	Agarose	D-Asparagin	[57]
Carboxypeptidase A	Agarose	L-Tyrosyl-D-tryptophan	[82]
	Agarose	D-Tryptophan	[94]
	Cellulose	Glycyl-D-phenylalanin	[95]
Carboxypeptidase B	Agarose	D-Alanyl-L-arginin	[96]
	Agarose	D-Tryptophan	[94]
	Carboxymethyl-Sephadex	D-Arginin	[97]
	Carboxymethyl-Sephadex	D-Phenylalanin	[97]
	Cellulose	Glycyl-D-arginin	[95]
Chymotrypsin	Agarose	D-Tryptophan-methylester	[82]
	Cellulose	Glycyl-D-phenylalanin	[95]
	Äthylen-Maleinsäureanhydrid-Copolymerisat	Trypsin-Kallikrein-Inhibitor	[128]
Dihydrofolat-Reduktase	Agarose	4-Amino-10-methyl-pteroyl-glutaminsäure	[98]
	Aminoäthyl-Biogel P-150	4-Amino-10-methyl-pteroyl-glutaminsäure	[99]
β -Galaktosidase	Agarose	4-Aminophenyl- β -D-galaktofuranosid	[56]
Kallikrein	Polyacrylamid	4-Aminophenyl- β -D-galaktofuranosid	
Neuraminidase	Äthylen-Maleinsäureanhydrid-Copolymerisat (modifiziert)	Trypsin-Kallikrein-Inhibitor	[129]
Papain	Agarose	N-(4-Aminophenyl)oxamsäure	[100]
Pepsin	Agarose	Glycyl-glycyl-(O-benzyl)-L-tyrosin-L-arginin	[88]
Plasmin	Agarose	Poly-L-lysin	[101]
Plasminogen	Äthylen-Maleinsäureanhydrid-Copolymerisat (modifiziert)	Trypsin-Kallikrein-Inhibitor	[129]
RNase (aus Pankreas)	Agarose	L-Lysin	[102]
Staphylococcus-Nuclease	Agarose	5-(4-Aminophenyl-phosphoryl)uridin-2',3'-cyclophosphat	[103]
		3'-(4-Aminophenyl-phosphoryl)desoxythymidin-5'-phosphat	[82]
Thrombin	Agarose	4-Chlorbenzylamin	[104]
Trypsin	Agarose	Ovomucoid	[105, 106]
	Cellulose	4-(4'-Aminophenoxypropoxy)benzamidin	[107]
Tyrosin-Hydroxylase	Äthylen-Maleinsäureanhydrid-Copolymerisat	Trypsin-Kallikrein-Inhibitor	[128]
	Agarose	3-Jod-tyrosin	[108]
an träger-gebundenen Substraten:			
DNA-Polymerase	Cellulose	DNA	[85]
	Agarose	DNA	[109]
Flavokinase	Cellulose	Flavin	[83]
Phosphomonoesterasen	Cellulose	Phosphat	[110]
Phosphodiesterasen	Cellulose	Glycerophosphat	[110]
Proteasen (aus Weizen)	Agarose	Hämoglobin	[91]
Tyrosinase	Cellulose	Phenol	[78]
an träger-gebundenen Coenzymen:			
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	Cellulose	NAD	[90]
Glykolat-Apooxidase	Cellulose	FMN	[84]
Lactat-Dehydrogenase	Cellulose	NAD	[90]
NADPH-Cytochrom-c-Aporeduktase	Cellulose	FMN	[84]
Pyridoxinphosphat-Apooxidase	DEAE-Cellulose	FMN	[84]
Threonin-Dehydrogenase	Cellulose	NAD	[90]
an träger-gebundenen allosterischen Effektoren:			
Chorismat-Mutase	Agarose	L-Tryptophan	[111]
3-Desoxy-D-arabinohexitulonat-7-phosphat-Synthetase	Agarose	L-Tyrosin	[112]
an träger-gebundenen gruppenspezifischen Reagentien:			
Papain	Agarose	4-Aminophenyl-quecksilber(II)-acetat	[89]

reagiert, kann das Quecksilber-Harz als gruppenspezifisches Chromatographie-Harz verwendet werden.

Die Affinitätschromatographie an träger-gebundenen Co-enzymen ermöglicht die Adsorption aller Enzyme, deren katalytische Aktivität von diesem Coenzym abhängig ist. Da diese Enzyme verschieden starke Komplexe mit dem gebundenen Coenzym bilden, werden sie durch eine Lösung mit Konzentrationsgradient nacheinander eluiert und können auch mehr oder weniger vollständig voneinander

ander getrennt^[90]. Dabei wurde die NADP-abhängige Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase am wenigsten retardiert (Abb. 6).

Die Isolierung der Proteasen aus Weizenmalz bereitete Schwierigkeiten, da die Proteasen mit anderen Proteinen aggregieren. Die Affinitätschromatographie an kovalent gebundenem Substrat (Hämoglobin) führte zu einem Präparat, das bei der Disc-Elektrophorese nur noch proteolytisch aktive Banden ergab (Abb. 7)^[91].

In Tabelle 1 wird ein Überblick über weitere wichtige Arbeiten zu diesem Thema gegeben.

Neben der Isolierung von Enzymen können mit der Affinitätschromatographie auch andere enzymologische Probleme bearbeitet werden. Carboxypeptidase B vom Schwein besitzt neben seiner bekannten Spezifität gegen basische Aminosäuren eine geringe Spezifität, die der von Carboxypeptidase A ähnelt und eine Verunreinigung mit diesem Enzym vermuten lässt. Die affinitätschromatographische Reinigung an agarose-gebundenem Inhibitor erhöht die spezifische Aktivität, ohne die carboxypeptidase-A-ähnliche Aktivität abzutrennen. Ein Kontrollexperiment ergab, daß Carboxypeptidase A von der Säule nicht zurückgehalten wird. Es handelt sich also um eine Nebenaktivität^[96].

Auch Ribosomen, die für die Proteinbiosynthese im zellfreien System eingesetzt werden, können affinitätschromatographisch soweit angereichert werden, daß ein bestimmtes Protein bevorzugt synthetisiert wird. Der Einbau radioaktiver Aminosäuren in Tyrosin-Aminotransferase wurde durch Verwendung von Ribosomen aus Hepatomazellen, die an Pyridoxaminphosphat-agarose, dem träger-gebundenen Coenzym der Transaminierung, angereichert waren, auf mehr als das zehnfache erhöht^[113].

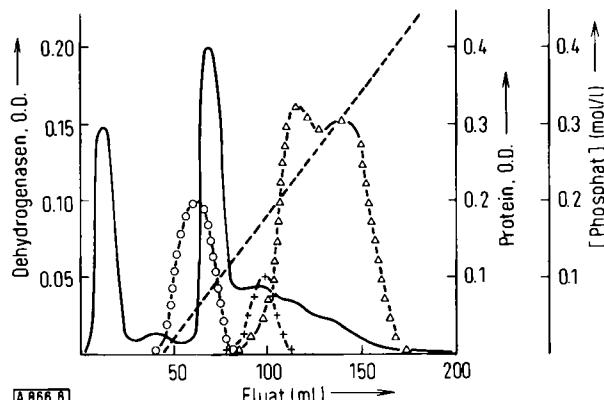


Abb. 6. Isolierung von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (○), Lactat-Dehydrogenase (+) und Threonin-Dehydrogenase (△) durch Affinitätschromatographie eines dialysierten *Ps.-oxalaticus*-Extrakts an NAD-Cellulose [90]. Dehydrogenasen (s. o.) (gemessen bei 366 nm); —: Protein (gemessen bei 280 nm); - - -: Phosphatgradient (mol/l).

getrennt werden. So wurden an NAD-Cellulose Glucose-6-phosphat-, Lactat- und Threonin-Dehydrogenase aus einem *Ps.-oxalaticus*-Extrakt adsorbiert und durch Elution mit zunehmend konzentrierterem Phosphatpuffer vonein-

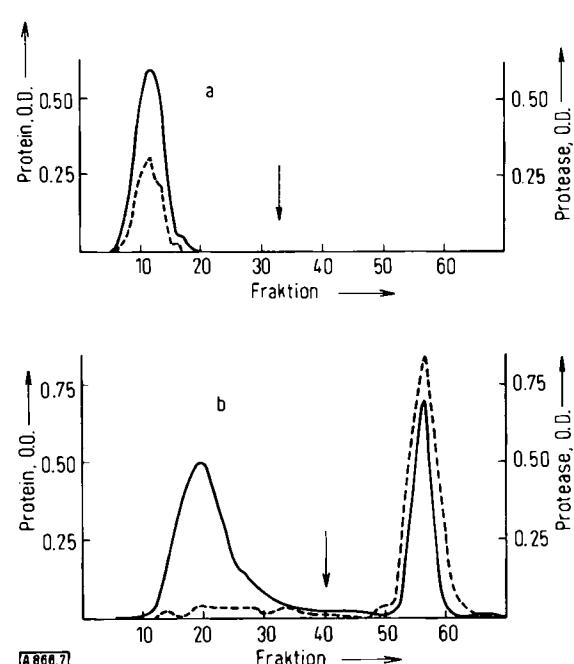


Abb. 7. a) Chromatographie von vorgereinigtem Weizenmalzextrakt an unsubstituierter Agarose. b) Affinitätschromatographische Isolierung der Proteasen aus demselben Weizenmalzextrakt an einer Hämoglobin-Agarosesäule. Zur Elution der Proteasen (Pfeil) dient 0.1 N Essigsäure [91]. —: Protein (gemessen bei 280 nm). - - -: Protease (gemessen bei 670 nm).

8.2. Isolierung natürlich vorkommender Inhibitoren

Die Gewinnung natürlicher Enzyminhibitoren durch Affinitätschromatographie von Rohextrakten und angereicherten Inhibitorlösungen an kovalent gebundenen Enzymen ist mehrfach beschrieben worden.

Die meisten Arbeiten hierüber stammen von *Fritz, Werle* u.a., die Proteaseinhibitoren an unlöslichen Proteasen reinigten^{[114]–[118]}. Tabelle 2 gibt Beispiele für die Isolie-

Tabelle 2. Präparative Isolierung einiger natürlich vorkommender Proteaseinhibitoren durch Affinitätschromatographie an unlöslichen Trypsinen. EMA = Äthylen-Maleinsäureanhydrid-Copolymerisat; CM = Carboxymethyl.

Inhibitor aus	Träger	Lit.
Pankreas (Schwein)	EMA, modifiziert	[114]
Pankreas (Schaf)	EMA, modifiziert	[114]
Lunge, Leber (Rind)	EMA	[114]
Blutegel	EMA, modifiziert	[114]
Blutegel	CM-Cellulose	[114]
Samenblase (Meerschweinchen)	EMA, modifiziert	[114]
Seminalplasma (Eber)	Polyacrylamid	[114]
Seminalplasma (Mensch)	CM-Cellulose	[116]
Weizen	CM-Cellulose	[117]
Erdnüsse	CM-Cellulose	[117]
Seelilien	CM-Cellulose	[118]

rung von Proteaseinhibitoren mit unlöslichen Trypsinen. Aus Kalbthymusextrakten wurde ein DNase-I-Inhibitor an agarose-gebundener DNase I isoliert^[119]. Zur Reinigung eines RNase-Inhibitors aus Rattenleber wurde an CM-Cellulose gebundene RNase verwendet^[120].

8.3. Anwendung in der Immunologie

Wasserunlösliche Antigene werden zur Isolierung der zugehörigen Antikörper verwendet, die auf diese Weise frei von anderen Serumbestandteilen und frei von Antigenen erhalten werden^[5]. Auch nicht präzipitierbare, inkomplette Antikörper sowie Antikörper, die wegen ihrer geringen Konzentration im Serum nicht fällbar sind, können affinitätschromatographisch isoliert und quantitativ bestimmt werden^[5].

Die meisten natürlichen Antigene haben mehrere Zentren, über die sie mit Antikörpern Komplexe bilden können. Für jedes Zentrum existiert ein eigener Antikörper. Durch die kovalente Bindung des Antigens an den Träger wird möglicherweise das eine oder andere Zentrum für seinen Antikörper unzugänglich, so daß die Komplexbildung unterbleibt. In diesem Fall gewinnt man affinitätschromatographisch eine Antikörperpopulation, deren Spektrum sich von dem der Antikörperpopulation im Vollblut unterscheidet. Da die verschiedenen Antikörper mit den verschiedenen Zentren des Antigens auch unterschiedlich starke Komplexe bilden, kann auch eine uneinheitliche Elution der Antikörper vom unlöslichen Antigen das Spektrum der Antikörperpopulation verändern. In der Regel werden dann die leicht eluierbaren Anteile angereichert sein^[5].

Campbell et al.^[79] waren die ersten, die kristallisiertes Rinderalbumin an einen unlöslichen polymeren Träger, an ρ -Aminobenzyl-cellulose, durch Diazokupplung kovalent banden. An diesem fixierten Antigen reinigten sie Rinderalbumin-Antiserum vom Kaninchen. Nach der Adsorption wurde der Komplex mit 1-proz. NaCl-Lösung proteinfrei gewaschen und anschließend bei pH = 3.2 zerlegt. Die Verweilzeit des Antikörpers am unlöslichen Antigen beeinflußte die Ausbeute. Der präzipitierbare Antikörper, der vom unlöslichen Antigen adsorbiert worden war, konnte bei sofortiger Elution zu 86% zurückgewonnen werden, 12 Stunden später dagegen nur noch zu 56%.

Ein weiteres Beispiel ist die Reinigung von Insulin-Antikörpern an agarose-gebundenem Insulin^[121]. Dabei zeigt sich, daß verschiedene Insulin-Agarose-Derivate verschiedenen guten Immunreaktivität zeigen:

Insulin-Phe(B1)-Agarose	38%
Insulin-Lys(B29)-Agarose	59%
Acetylimsulin-Lys(B29)-Agarose	72%

Als Immunoadsorbens für Antikörper können auchträgergebundene Haptene dienen^[122]. Die umgekehrte Anwendung, nämlich die Isolierung eines Antigens an einem kovalent gebundenen Antikörper, wurde seltener beschrieben. Ein Beispiel ist die Isolierung von Insulin aus Serum an agarose-gebundenem Insulin-Antikörper^[123].

8.4. Anwendung in der Nucleinsäurechemie

Auch die als Hybridisierung bekannte Wechselwirkung zwischen DNA und komplementärer RNA, zwischen komplementären Oligonucleotiden und zwischen Nucleotiden und Nucleosiden kann affinitätschromatographisch genutzt werden. So wurde T₄-spezifische RNA an cellulose-gebundener T₄-DNA chromatographiert^[124]. Phe-tRNA und Lys-tRNA wurden an pT- und pU-Cellulose bzw. an pA-Cellulose angereichert^[125]. Thymidylat-cellulose hielt vor allem Adenosin und Polyadenylyl fest^[126]!*

Eingegangen am 17. Dezember 1971 [A 866]

[*] Anmerkung: Während der Drucklegung dieser Arbeit erhielten wir Kenntnis von: R. H. Reiner u. A. Walch, Chromatographia 4, 578 (1971).

- [1] R. Goldman, L. Goldstein u. E. Katchalski in G. R. Stark: Biochemical Aspects of Reactions on Solid Supports. Academic Press, New York 1971.
- [2] E. Katchalski in P. Desnuelle, H. Neurath u. M. Ottesen: Structure-Function Relationships of Proteolytic Enzymes. Munksgaard, Copenhagen 1970, S. 198ff.; E. Katchalski, I. H. Silman u. R. Goldman, Advan. Enzymol. 34, 445 (1971).
- [3] L. Goldstein in D. Perlman: Fermentation Advances. Academic Press, New York 1969, S. 391ff.
- [4] L. Goldstein u. E. Katchalski, Z. Anal. Chem. 243, 375 (1968).
- [5] I. H. Silman u. E. Katchalski, Annu. Rev. Biochem. 35, 873 (1966).
- [6] A. D. McLaren u. L. Packer in F. F. Nord: Advan. Enzymol. 33, 269 (1970).
- [7] F. Friedberg, Chromatogr. Rev. 14, 121 (1971).
- [8] K. Mosbach, Sci. Amer. 224 (3), 26 (1971).
- [9] G. J. H. Melrose, Rev. Pure Appl. Chem. 21, 83 (1971).
- [10] J. Gryszkiewicz, Folia Biol. 19, 119 (1971).
- [11] G. Kay, Proc. Biochem. 3 (8), 36 (1968).
- [12] G. Manecke, Pure Appl. Chem. 4, 507 (1962).
- [13] G. Manecke, Naturwissenschaften 51, 25 (1964).
- [14] P. Cuatrecasas u. C. B. Anfinsen in S. P. Colowick u. N. O. Kaplan: Methods in Enzymology. Academic Press, New York 1971, Bd. 22, S. 345ff.
- [15] P. Cuatrecasas u. C. B. Anfinsen, Annu. Rev. Biochem. 40, 259 (1971).
- [16] T. Tosa, T. Mori, N. Fuse u. I. Chibata, Agr. Biol. Chem. 33, 1047 (1969).
- [17] T. Tosa, T. Mori u. I. Chibata, Agr. Biol. Chem. 33, 1053 (1969).
- [18] H. Suzuki, Y. Ozawa u. H. Maeda, Agr. Biol. Chem. 30, 807 (1966).
- [19] M. J. Bachler, G. W. Strandberg u. K. L. Smiley, Biotechnol. Bioeng. 12, 85 (1970).
- [20] K. L. Smiley, Biotechnol. Bioeng. 13, 309 (1971).
- [21] P. Bernfeld u. J. Wan, Science 142, 678 (1964).
- [22] G. P. Hicks u. S. J. Updike, Anal. Chem. 38, 726 (1966).
- [23] Y. Degan u. T. Miron, Biochim. Biophys. Acta 212, 362 (1970).
- [24] L. Goldstein, M. Pecht, S. Blumberg, D. Atlas u. Y. Levin, Biochemistry 9, 2322 (1970).
- [25] R. Axen u. S. Ernback, Europ. J. Biochem. 18, 351 (1971).
- [26] D. Gabel u. B. v. Hofsten, Europ. J. Biochem. 15, 410 (1970).
- [27] C. K. Glassmeyer u. J. D. Ogle, Biochemistry 10, 786 (1971).
- [28] G. Kay u. M. D. Lilly, Biochim. Biophys. Acta 198, 276 (1970).
- [29] E. M. Crook, K. Brocklehurst u. C. H. Wharton in S. P. Colowick u. N. O. Kaplan: Methods in Enzymology. Academic Press, New York 1971, Bd. 19, S. 963ff.
- [30] G. Manecke, Biochem. J. 107, 2 P (1968).
- [31] L. Goldstein in S. P. Colowick u. N. O. Kaplan: Methods in Enzymology. Academic Press, New York 1971, Bd. 19, S. 935ff.
- [32] L. Goldstein, Y. Levin u. E. Katchalski, Biochemistry 3, 1913 (1964).
- [33] S. A. Barker u. R. Epton, Proc. Biochem. 5 (8), 14 (1970).
- [34] A. Conte u. K. Lehmann, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 352, 533 (1971).
- [35] H. H. Weetall, Science 166, 615 (1969).
- [36] H. H. Weetall, Biochim. Biophys. Acta 212, 1 (1970).

- [37] W. F. Line, A. Kwong u. H. H. Weetall, Biochim. Biophys. Acta 242, 194 (1971).
- [38] P. J. Robinson, P. Dunnill u. M. D. Lilly, Biochim. Biophys. Acta 242, 659 (1971).
- [39] W. Brümmer, N. Hennrich, M. Klockow, H. Lang u. H. D. Orth, Europ. J. Biochem. 25, 129 (1972).
- [40] M. A. Mitz u. L. J. Summaria, Nature 189, 576 (1961).
- [41] S. A. Barker, A. N. Emery u. J. M. Norais, Proc. Biochem. 6 (10), 11 (1971).
- [42] P. Cuatrecasas, J. Biol. Chem. 245, 3059 (1970).
- [43] J. J. Cebra, D. Givol, I. H. Silman u. E. Katchalski, J. Biol. Chem. 236, 1720 (1961).
- [44] P. Cresswell u. A. R. Sanderson, Biochem. J. 119, 447 (1970).
- [45] R. Haynes u. K. A. Walsh, Biochem. Biophys. Res. Commun. 36, 235 (1969).
- [46] W. E. Hornby, M. D. Lilly u. E. M. Crook, Biochem. J. 107, 669 (1968).
- [47] A. D. McLaren, Enzymologia 21, 356 (1960).
- [48] A. D. McLaren, Advan. Enzymol. 29, 28 (1966).
- [49] J. H. Wilson u. M. D. Lilly, Biotechnol. Bioeng. 11, 349 (1969).
- [50] M. D. Lilly u. A. K. Sharp, The Chem. Eng. 215, CE 12 (1968).
- [51] W. E. Hornby, M. D. Lilly u. E. M. Crook, Biochem. J. 98, 420 (1966).
- [52] I. H. Silman, M. Albu-Weissenberg u. E. Katchalski, Biopolymers 4, 441 (1966).
- [53] B. Mattiason u. K. Mosbach, Biochim. Biophys. Acta 235, 253 (1971).
- [54] G. Feinstein, Naturwissenschaften 58, 389 (1971).
- [55] J. K. Inman u. H. M. Dintzis, Biochemistry 8, 4074 (1969).
- [56] E. Steers jr., P. Cuatrecasas u. H. B. Pollard, J. Biol. Chem. 246, 196 (1971).
- [57] T. Kristiansen, M. Einarsson, L. Sundberg u. J. Porath, FEBS-Lett. 7, 294 (1970).
- [58] S. J. Updike u. G. P. Hicks, Science 158, 270 (1967).
- [59] S. J. Updike u. G. P. Hicks, Nature 214, 986 (1967).
- [60] G. G. Guilbault u. J. G. Montalvo, J. Amer. Chem. Soc. 92, 2533 (1970).
- [61] G. G. Guilbault u. E. Hrabankova, Anal. Lett. 3, 53 (1970).
- [62] H. Neu u. L. Heppel, J. Biol. Chem. 239, 2927 (1964).
- [63] M. Uziel u. J. X. Khym, Biochemistry 8, 3254 (1969).
- [64] R. A. Zingaro u. M. Uziel, Biochim. Biophys. Acta 213, 371 (1970).
- [65] J. C. Lee, Biochim. Biophys. Acta 235, 435 (1971).
- [66] C. Schwabe, Biochemistry 8, 795 (1969).
- [67] H. Uhlig, Naturwissenschaften 57, 261 (1970).
- [68] M. D. Lilly u. P. Dunnill, Proc. Biochem. 6 (8), 29 (1971).
- [69] K. L. Smiley, Chem. Engng. News 49 (7), 86 (1971).
- [70] M. Cole, Proc. Biochem. 2 (4), 35 (1967).
- [71] D. A. Self, G. Kay, M. D. Lilly u. P. Dunnill, Biotechnol. Bioeng. 11, 337 (1969).
- [72] S. Shaltiel, R. Mizrahi, Y. Stupp u. M. Sela, Europ. J. Biochem. 14, 509 (1970).
- [73] K. Mosbach u. P. Larsson, Biotechnol. Bioeng. 12, 19 (1970).
- [74] C. H. Hoffman, E. Harris, S. Chodroff, S. Michelson, J. W. Rothrock, E. Peterson u. W. Reuter, Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 710 (1970).
- [75] H. G. Gassen, Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 1410 (1971).
- [76] M. R. Bernfield, J. Biol. Chem. 241, 2014 (1966).
- [77] H. G. Gassen, FEBS-Lett. 14, 225 (1971).
- [78] L. S. Lerman, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 39, 232 (1953).
- [79] D. H. Campbell, E. Lüscher u. L. S. Lerman, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 37, 575 (1951).
- [80] E. Starkenstein, Biochem. Z. 24, 210 (1910).
- [81] O. Holmbergh, Biochem. Z. 258, 134 (1933).
- [82] P. Cuatrecasas, M. Wilchek u. C. B. Anfinsen, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 61, 636 (1968).
- [83] C. Arsenis u. D. B. McCormick, J. Biol. Chem. 239, 3093 (1964).
- [84] C. Arsenis u. D. B. McCormick, J. Biol. Chem. 241, 330 (1966).
- [85] R. M. Litman, J. Biol. Chem. 243, 6222 (1968).
- [86] P. Cuatrecasas, J. Biol. Chem. 245, 574 (1970).
- [87] H. A. Whelan u. J. C. Writon jr., Biochemistry 8, 2386 (1969).
- [88] S. Blumberg, I. Schechter u. A. Berger, Europ. J. Biochem. 15, 97 (1970).
- [89] L. A. AE. Sluyterman u. J. Wijdenes, Biochim. Biophys. Acta 200, 595 (1970).
- [90] C. R. Lowe u. P. D. G. Dean, FEBS-Lett. 14, 313 (1971).
- [91] G. K. Chuah u. W. Bushuk, Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 545 (1969).
- [92] N. Kalderon, I. H. Silman, S. Blumberg u. Y. Dudai, Biochim. Biophys. Acta 207, 560 (1970).
- [93] J. D. Berman u. M. Young, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 395 (1971).
- [94] G. R. Reeck, K. A. Walsh, M. A. Hermodson u. H. Neurath, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 1226 (1971).
- [95] J. R. Uren, Biochim. Biophys. Acta 236, 67 (1971).
- [96] M. Sokolovsky u. N. Zisapel, Biochim. Biophys. Acta 250, 203 (1971).
- [97] H. Akanuma, A. Kasuga, T. Akanuma u. M. Yamasaki, Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 27 (1971).
- [98] B. T. Kaufman u. J. V. Pierce, Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 608 (1971).
- [99] J. S. Erickson u. C. K. Mathews, Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 1164 (1971).
- [100] P. Cuatrecasas u. G. Illiano, Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 178 (1971).
- [101] B. Nevaldine u. B. Kassell, Biochim. Biophys. Acta 250, 207 (1971).
- [102] D. J. Deutsch u. E. T. Mertz, Science 170, 1095 (1970).
- [103] M. Wilchek u. M. Gorecki, Europ. J. Biochem. 11, 491 (1969).
- [104] A. R. Thompson u. E. W. Davie, Biochim. Biophys. Acta 250, 210 (1971).
- [105] G. Feinstein, FEBS-Lett. 7, 353 (1970).
- [106] N. C. Robinson, R. W. Tye, H. Neurath u. K. A. Walsh, Biochemistry 10, 2743 (1971).
- [107] G. W. Jameson u. D. T. Elmore, Biochem. J. 124, 66P (1971).
- [108] W. N. Poillon, Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 64 (1971).
- [109] M. S. Poonian, A. J. Schlabach u. A. Weissbach, Biochemistry 10, 424 (1971).
- [110] P. D. G. Dean, S. R. Willetts u. J. E. Blanch, Anal. Biochem. 41, 344 (1971).
- [111] B. Sprossler u. F. Lingens, FEBS-Lett. 6, 232 (1970).
- [112] W. W. C. Chan u. M. Takahashi, Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 272 (1969).
- [113] J. V. Miller jr., P. Cuatrecasas u. E. B. Thompson, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 1014 (1971).
- [114] H. Fritz, B. Brey, M. Müller u. M. Gebhardt in H. Fritz u. H. Tschesche: Proceedings of the First International Research Conference on Protein Inhibitors. De Gruyter, Berlin 1971, S. 28ff.
- [115] M. Laskowski jr. u. R. W. Sealock in P. D. Boyer: The Enzymes. Academic Press, New York 1971, Bd. 3, S. 375ff.
- [116] E. Fink, E. Jaumann, H. Fritz, H. Ingrisch u. E. Werle, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 352, 1591 (1971).
- [117] H. Fritz, M. Gebhardt, R. Meister, K. Illchmann u. K. Hochstrasser, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 351, 571 (1970).
- [118] H. Fritz, B. Brey u. L. Beress, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 353, 19 (1972).
- [119] U. Lindberg u. S. Eriksson, Europ. J. Biochem. 18, 474 (1971).
- [120] A. A. M. Grihenau, J. G. G. Schoenmakers, M. van Kraalamp u. H. Bloemendal, Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 1064 (1970).
- [121] P. Cuatrecasas, Biochem. Biophys. Res. Commun. 35, 531 (1969).
- [122] L. Wofsy u. B. Burr, J. Immunol. 103, 380 (1969).
- [123] Y. Ahanuma, T. Kuzuya, M. Hayashi, T. Ide u. N. Kuzuya, Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 947 (1970).
- [124] E. K. F. Bautz u. B. D. Hall, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 48, 400 (1962).
- [125] S. Erhan, L. Northrup u. F. A. Leach, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 53, 646 (1969).
- [126] E. G. Sander, D. B. McCormick u. L. D. Wright, J. Chromatogr. 21, 419 (1966); siehe hierzu auch: H. Schott u. G. Greber, Angew. Chem. 82, 448 (1970); Angew. Chem. internat. Edit. 9, 465 (1970).
- [127] A. Arens, E. Rauenbusch, E. Irion, O. Wagner, K. Bauer u. W. Kauffmann, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 351, 197 (1970).
- [128] H. Fritz, H. Schult, M. Neudecker u. E. Werle, Angew. Chem. 78, 775 (1966); Angew. Chem. internat. Edit. 5, 735 (1966).
- [129] H. Fritz, B. Brey, A. Schnal u. E. Werle, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 350, 617 (1969).