약학회지 제32권 제6호 420~427 (1988)
Yakhak Hoeji Vol. 32, No. 6

Euglena의 Cytochrome C552 Methylation에 관한 연구

이 향 우 · 백 운 기
성균관대학교 약대 · 미국 Temple대 Fels연구소
(Received November 25, 1988)

Studies on the possible existence of methylarginine in cytochrome C552 isolated from Euglena gracilis

Hyang Woo Lee and Woon Ki Paik
College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-746, Korea and
**Fels research Institute, Temple University School of Medicine, Philadelphia, Pa.* 19140, U.S.A.

Abstract—Post-translational modification of protein amino acid residues is a well known metabolic phenomenon. One such side chain modification, protein methylation, occur ubiquitously in nature, in organism ranging from prokaryotic to eukaryotic and the biological significance of protein methylation has begun to emerge. The observation that cytochrome C methylation facilitates the binding of this hemoprotein to mitochondria could be placed as the one of the examples along this line. However, the detail biological meaning of cytochrome C methylation is remained to be clarified. In the aspect of such reason this research was done. The results of this experiment were; 1) pure Euglena gracilis cytochrome C552 was isolated, 2) methylarginine and methylmethionine were not found in cytochrome C552 sequence, 3) however, Unknown Peak at 20.78min of retention time was found, and 4) this Unknown Peak was found only from Euglena cytochrome C552, so far.

단백질 methylation의 정확한 생화학적 의미는 많은 연구에도 불구하고 아직 확실히 밝혀지지 않고 있다, 그러나 박테리아의 chemotaxis, gene regulation, myelin 형성등 많은 생화학적 현상과 깊은 관계가 있음이 지금까지 연구결과 밝혀졌다.[1~5] 최근에는 cytochrome C methylation을 통한 단백질 methyl화 현상의 생화학적 의미를 밝히고져 많은 연구가 이루어지고 있다.[6]

1969년 DeLange 등은[7,8] Neurospora와 Saccharomtyce으로부터 cytochrome C를 순수정제하여 아미노산 조성을 검색한 결과 72번 위치에 trimethyllysine이, wheat germ cytochrome C는 72번 및 86번 위치에 두 분자의 trimethyllysine이 존재한다고 보고하였다. 그 후 1974년 Pettgrew[9]는 처음으로 Euglena로부터 cytochrome C558를 순수정제하여 이 단백질의 아미노산 조성 및 배열을 검색하여 cytochrome C558는 108개의 아미노산으로 구성되어 있으며 86번 위치에 한 분자의 trimethyllysine이 존재함을 확인하였고, 다시 cytochrome C552를 순수정제하여 이 단백질은 cycochrome C558와 달리 87개의 아미노산으로 구성되어 있으며 methyl 아미노산은 존재하지 않는다고 보고 하였다.[9]

최근에는 Euglena gracilis로부터 새로운 methylating enzyme이 정제되었는데[10] 이 효소는 시험관내에서 horse heart cytochrome C를 methyl화하여 그 결과 methylarginine과 methylmethionine을 생성하는 새로운 성질의 최초의 Euglena효소라고 보고되었다.

고로 본 연구에서는 우선 protein methylase의 천연기질인 Euglena cytochrome C552를 순수정제하였으며, 그 아미노산 조성내에 과연 methylarginines, methyllysines 등 methylation된 아미노산이 존재하지 않는지 그 존재 유무를 검색하였다.

실 험 방 법

실험재료—S-Adenosyl-L-(methyl-^{14}C) methionine은 Amersham Radiochemicals로부터 구입하였으며, chymotrypsin-TLCK, trypsin-TPCK, histone(*calf thymus type II-A*), *o*-phthaldialdehyde, CM-cellulose, DEAE-cellulose등은 Sigma Chemical Comp.에서, methanol, acetonitrile, tetrahydrofuran 등은 HPLC grade를 Baker Comp.에서 구입하였으며 yeast extract, bactopeptone은 DIFCO Laboratories로부터 구입사용하였고 그 외의 시약은 시판 순수 grade를 구입 실험에 사용하였다.

Euglena cytochrome C552의 순수정제—Euglena gracilis를 yeast extract 5%, bactopeptone 0.5%, glucose 1%를 함유하는 배양내에서 교반하면서 약 4일간 배양한 후 다시 큰 배양용기로 옮겨 약 일주일간 진탕하면서 배양후 harvest하였다. 이 harvest한 Euglena로 부터 Petigrew방법[9]으로 다음과 같이 Cytochrome C552를 순수 정제하였다.

즉 harvest한 Euglena cell(800g)을 1 volume의 0.01M-phosphate buffer(pH7.0)에 현탁한 후 bead-beater를 사용하여 세포를 파괴한 후 25,000 g에서 약 30분간 원심분리하여 그 상등액을 취하였다. 이 상등액에 초산을 가하여 산도를 약 pH5.0로 조정한 후 침전되는 침전물을 원심분리 후 그 그침전물을 제거하고 남은 상등액을 정제원으로 하였다.

① DEAE-Cellulose Column Chromatography Sephadex G-25 column을 통과하여 나온 시료(약 1.2L)를 다시 pH7.0로 조절한 DEAE-cellulose column(4×6cm)에 통과시켜 시료내 cytochrome C를 DEAE-cellulose에 흡착케하였다. 이와 같은 조작의 결과로 음이온 교환수지 상층에 담황색층이 형성되는데 그 층만을 긁어모아 phosphate buffer에 현탁시킨 후 다른 column (2×10cm)으로 packing시켰다. 이 column을 약 100ml의 0.001M-phosphate buffer로 washing한 후 0.1M-NaCl을 함유하는 0.1M-phosphate buffer 100ml로 용출시켰다. 용출된 시료에 ammonium sulfate(60%w/v)를 가한후 약 1시간 동안 냉소에서 방치한 후 침전된 분홍색 단백질을 원심분리하여 취하였다. 침전된 단백질을 10ml의 물에 용해한 후, 혼재한 염을 제거하기 위하여 약 24시간동안 투석시켰다. 투석한 시료를 위와 똑같은 방법으로 DEAE-Cellulose column에 흡착, 용출 과정을 3회 반복하였다. 마지막 용출은 5ml의 0.2M-NaCl을 사용하였으며 물에서 투석시켜 완전히 염을 제거한후 동결건조하였다.

② HPLC에 의한 정제

Ion-exchange chromatography로 부분 정제된 시료를 더 순수정제하기 위하여 HPLC를 사용하였다. HPLC *column*으로는 단백질을 분리하는 Protein-pak I-125(Waters)를 사용하였으며, mobile phase로서 pH6.8의 0.1M-sodium sulfate, 0.02M-sodium phosphate(monobasic)를, flow rate는 1ml/min.로 isocratic condition을 이용하였으며 파장 280nm에서 흡광도를 측정하였다.

즉 용해된 시료를 Centrex(0.25μm) filter에 통과시켜 이물질을 제거한 후 200μl를 HPLC에 적용시켰으며, 5회 적용하여 얻은 정제된 시료를 모두 모아 다시 동결건조하였다. 이 동결건조한 시료를 다시 HPLC에 rechromatography하여 순수한 Euglena cytochrome C552를 얻었다.

Cytochrome C552의 순도검색—정제된 Euglena cytochrome C552의 순도를 검색하기 위하여 cytochrome C552 환원형의 흡광성질을, spectrophotometer를 이용하여 a-band, b-band, Soret band, 그리고 d-band 등의 유무를 검색하였고 그 흡광비율을 계산하여 다른 문헌과 비교하였다.[11]

Peptide Mapping—위의 방법으로 정제한 순수 Euglena cytochrome C552를 trypsin, chymotrypsin 등으로 가수분해하여 아래와 같이 peptide mapping을 행하였다.

① Tryptic peptide의 분리

Trypsin으로 가수분해된 peptide의 분리는 Sasagawa방법[12]을 이용하여 HPLC로 분리하였다. HPLC조건은 아래와 같다.

Column : C18-μBondapak(Waters, 3.9×15cm)

Mobile phase(A sol.) : 1% Trifluoroacetic acid (TFA)

Mobile phase modifier (B sol.) : 60% Acetonitrile in 0.07% TFA

Flow rate : 2ml/min.

Gradient table for peptide mapping

Time	Flow rate	%A	%B	Curve
Initial	0ml/min	100	0	—
1.00min.	0.1 〃	100	0	1
1.50	1.0 〃	100	0	1
2.00	2.0 〃	100	0	6
62.00	2.0 〃	0	100	6
63.00	1.0 〃	100	0	11
64.00	2.0 〃	100	0	11
75.00	0 〃	100	0	11

② Chymotryptic peptide의 분리

Chymotrypsin으로 가수분해된 peptide의 분리도 HPLC를 사용하였으며 그 조건은 상기조건과 대동소이하나 다만 gradient table만 약간 다른 조건으로 분리하였다.

Amino acid 조성—Amino acid조성검사는 Park등[13] 의방법을 이용하였다. 즉 peptide를 6N-HCl을 가하고 110°C에서 약 24시간동안 진공밀폐한 시험관 내에서 가열하여 완전히 가수분해 시킨 후 과량의 HCl을 완전 제거한 다음 OPA방법으로 HPLC로 조성검사를 하였다. HPLC조건은 다음과 같다.

Column : Resolve C18 column(3.9mm×15cm)

Mobile phase : Methanol:THF:water(2 : 2 : 96) with 50mM-Sod. acetate, 50mM-Sod. phosphate(dibasic) pH7.5

Mibile modifier : Methanol:water(65 : 35)

O-Phthaldialdehyde(OPA) 용액은 methanol 0.2ml 중 10mg의 OPA 및 0.1ml의 2-mercaptoethanol을 함유하는 용액으로서 사용바로전에 제조하였고, 45°C의 수욕상에서 amino acid와 OPA의 반응으로 생성되는 형광도를 excitation wave length 338nm, emission wave length 425 nm에서 측정하였다.

실 험 결 과

Cytochrome C552의 정제—약 800g의 Euglena cell로부터 gel filtration, ion-exchange chromatography, 그리고 HPLC등 정제과정을 거쳐 약 5mg의 순수한 cytochrome C552를 얻었다(Fig. 1). 순수정제한 cytochrome C552의 순도검색을 위하여 spectrophotometer로 spectrum을 검색한 결과 a-band(552nm), b-band (523nm), Soret band(416nm), 그리고 d-band(319nm)를 나타냈으며(Fig. 2) 각 band간의 흡광도 비율은 다른 보문과 유사하여 cytochrome C552의 순수성을 확인할 수 있었다.

Tryptic peptide의 분리—Trypsin으로 가수분해한 cytochrome C552를 HPLC에 적용한 결과 4개의 peptides profile을 나타냈으며 각 peptide의

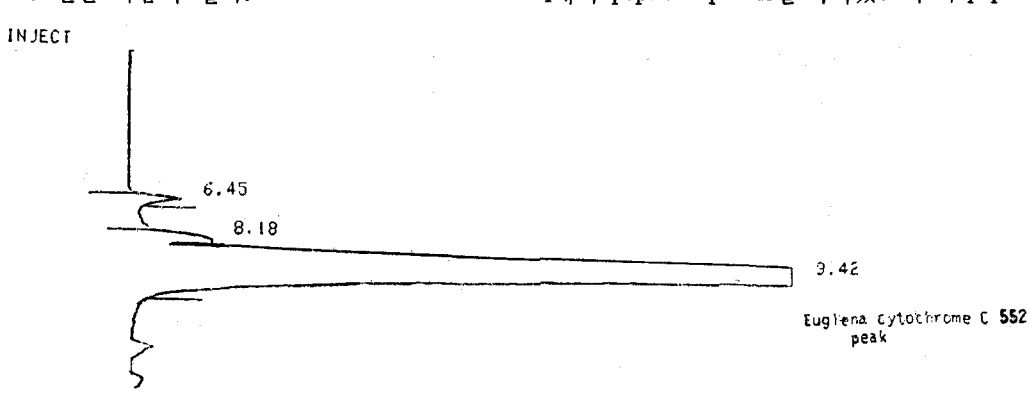

Fig. 1—Purification of Euglena Cytochrome C552 by HPLC system

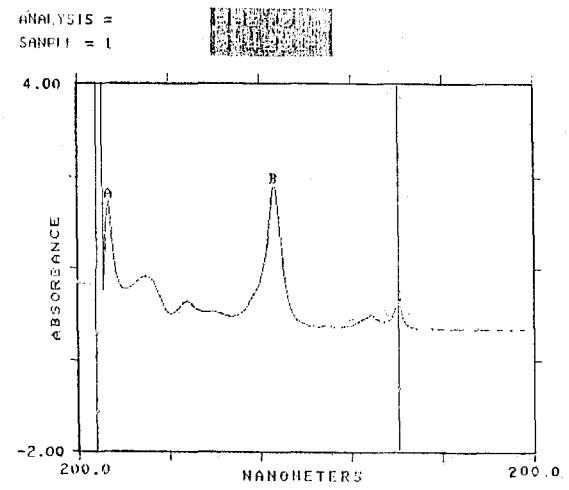

Fig. 2—Spectral Patterns of the Purified Euglena Cytochrome C552

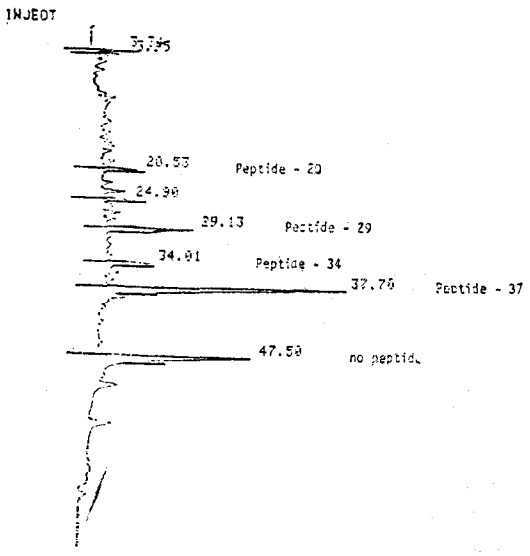

Fig. 3—Tryptic Peptide Patterns in HPLC Analysis

retention time에 따라 각각 peptide-20, peptide-29, peptide-34, 그리고 peptide-37로 명명하였다(Fig. 3).

Petigrew등[9]에 의하면 Euglena cytochrome C552는 83개의 amino acids로 구성되어 있으며 그 중 1분자의 arginine과 3분자의 lysine을 함유하고 있으며 trypsin 가수분해로 얻어질 수 있는 가능한 peptide와 예상 amino acid sequence를 표시하였다(Fig. 4).

Asn-Gly-Lys	Not found
Glu-Ala-Ile-Glu-Tyr-Gln-Val-Arg	Peptide-20
Thr-Ala-Ile-Glu-Glu-Tyr-Leu-Asp-Gly-Gly-Tyr-Thr-Lys	Peptide-29
Gly-Pro-Met-Pro-Ala-Trp-Glu-Gly-Val-Leu-Ser-Glu-Asp-Glu-Ile-Val-Ala-Val-Thr-Asp-Tyr-Val-Tyr-Thr-Gln-Ala-Gly-Gly-Ala-Trp-Ala-Asn-Val-Ser	Peptide-34
Gly-Gly-Ala-Asp-Val-Phe-Ala-Asp-Asn-Cys-Ser-Thr-Cys-His-Val-Asn-Gly-Gly-Asn-Val-Ile-Ser-Ala-Gly-Lys	Peptide-37

Fig. 4—Tryptic Peptides in Euglena Cytochrome C552 (According to Petigrrew's sequence)

Sasagawa방법에 의한[12] 구성 amino acid에 따른 peptide retention time추정에 의하면, peptide-20, -29, -34, 그리고 peptide-37은 그 각각의 구성 amino acid에 의하여 계산된 retention time이 정확히 일치하지는 않으나 유사한 값을 나타냈다. 이와 같이 trypsin 가수분해로 얻어진 peptide 중 arginine residue가 포함되어있을 peptide는 아마도 peptide-20로 추측되었으며, peptide-37은 약한 분홍빛을 나타내어 heme을 함유하고 있는 peptide로 확인되었다.

Peptide-20의 Amino Acid 조성—Arginine을 함유하는 것으로 추정되는 peptide-20의 amino acid 조성을 검사하였다. Petigrew등[9]에 의하면 peptide-20은 그 amino acid배열이 Glu-Ala-Ile-Glu-Tyr-Gln-Val-Arg인 8개의 amino acid로 된 peptide이나, 본 실험 결과와는 다소 차이점을 보였다. 즉 valine, isoleucine이 확인되지 않는 반면 aspartic acid 및 glycine이 관찰되었으며 alanine은 2분자로 나타났다. 그러나 기대했던 methylated arginine은 arginine 한분자가 확인되었음에도 불구하고 발견할 수 없었다.

Methylated Amino Acid의 검색—Euglena cytochrome C552 중 methylarginine 이외에 다른 methylated amino acids의 존재 유무를 확인

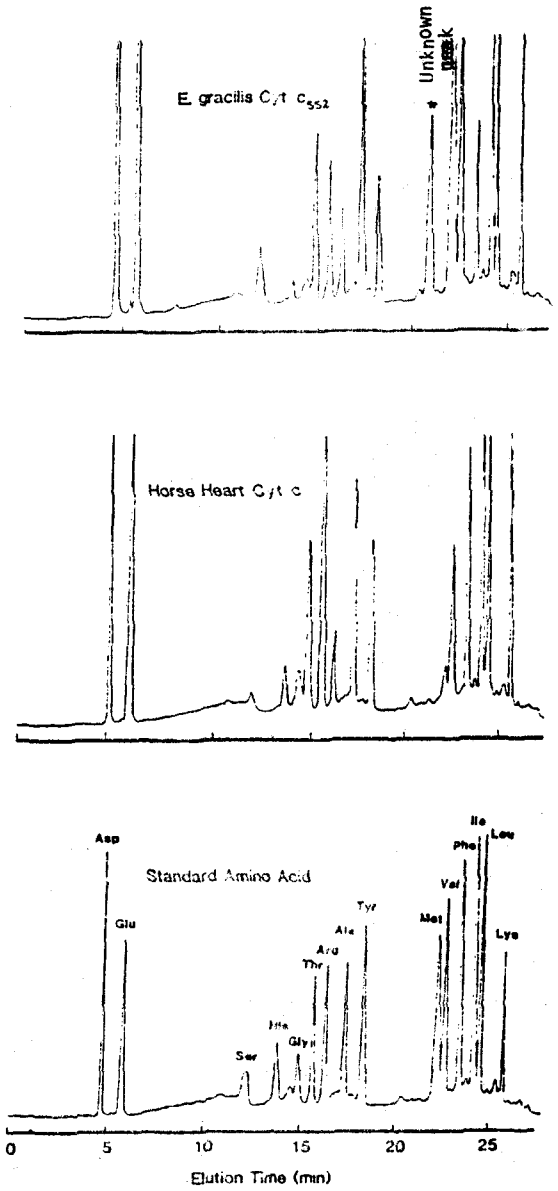

Fig. 5—Separation of Amino Acids in the Hydrolyzate of Euglena Cytochrome C552

코져 순수정제 cytochrome C552를 완전 가수분해 후 horse cytochrome C와 총 amino acid 조성을 조사 비교하였다(Fig. 5). 그림에서 보는 바와 같이 특이하게도 Euglena cytochrome C552에서는 horse cytochrome C에서 발견되지 않는 retention time 20.78min.의 확인되지 않는 amino acid의 peak를 나타냈다.

Park등[13]의 보고에 의하면 dimethyllysine은 17.30min., dimethylarginines(symmetric or asymmetric)은 17.57min., 또한 monomethyllysine은 보다 빨리 15.79min.에 그리고 monomethylarginine은 16.97min.에 peak가 나타나므로 retention time 20.78min.인 compound는 아마도 methylated basic amino acid는 아닌 것으로 추측된다.

The Unknown Peak의 확인—Retention time 20.78min.인 Unknown Peak를 확인하기 위하여 methylated basic amino acids외의 다른 종류의 methylamino acids의 retention time과 비교하였다(Table I). 표에서 보는 바와 같이 o-methylthreonine은 17.80min., o-methylserine은 15.58 min., 그리고 o-methyltyrosine은 21.72min.으로서 Unknown Peak와 일치하지 않았다.

Unknown Peak함유 단백질—Euglena cytochrome C552외에 retention time 20.78min.를 나타내는 Unknown Peak를 함유하는 단백질의 유무를 검색하였다(Table II). 그러나 horse cytochrome C, wheat germ histone H4 fraction,

Table I—Retention times of the Unknown Peak and the Various Methylated amino acids

Compounds	Retention Time(min.) (HPLC system)
The Unknown from Euglena cytochrome C552	20.78min.
S-methylmethionine	11.10 〃
O-mothyl-threonine	17.80 〃
O-methyl-serine	15.58 〃
O-methyl-tyrosine	21.72 〃
Monomethyllysine	15.79 〃
Trimethyllysine	15.79 〃
Dimethyllysine	17.30 〃
Monomethylarginine	16.97 〃
Dimethylarginine	17.57 〃
Sarcosine(N-methylglycine)	No fluorescene
N-dimethylglycine	No fluorescene
Betaine(N-trimethylglycine)	No fluorescene

One hundred picomoles each of various methylamino acids were processed in the exactly same conditions as described in Fig. 5.

Table II—Checking the Presence of the Unknown Peak in Various Proteins

Proteins	The Unknown Peak
Cytochrome C552 from Euglena	20.78min.
Horse Heart CytochromeC	Not found
Wheat Germ H4 Fraction	Not found
Histone H4(Calf thymus)	Not found
Histone H2A(Calf thymus)	Not found
Histone H2B(Calf thymus)	Not found

calf thymus histone H4, H2A, H2B 등은 Unknown Peak를 나타내지 않았다.

고 찰

세포내에서 합성된 단백질은 합성 후 구조의 변형이 일어난다는 것은 잘알려진 생화학적 현상으로서 이와 같은 현상에는 methylation, phosphorylation, acetylation 등 그외에 많은 종류가 알려져 있는데, 그 중에서도 근래 단백질의 methyl화현상은 그 생화학적 의미가 점차 밝혀짐으로서 많은 연구자들의 연구대상이 되고 있다. Protein의 methyl화현상은 bacteria에서 고등동물의 세포에 까지 두루 넓게 일어나며 단백질내의 arginine, lysine, glutamic acid, aspartic acid, histidine등의 amino acids가 enzyme에 의하여 methylation 되는 현상이다.[14]

지금까지 알려진 단백질 methyl화현상의 세포내 생화학적 작용은 유전인자의 기능조절,[15~18] myelin형성[5] bacterial chemotaxis,[1~3] 마이토콘드리아와 cytochrome C와의 결합력강화[6] 등 그 외에도 많은 작용이 비교적 깊게 연구되었다. Cytochrome C는 세포내 mitochondria에 존재하는 단백질로서 약 100여종의 생물체에서 분리정제하여 amino acid조성이 밝혀진 매우 소상히 연구된 단백질로서 진화과정을 거치는 동안에도 그 기능은 변화가 없었으나 amino acid조성을 보면 큰 변화를 볼 수 있으며 특히 amino acid 조성 중 특정한 위치에 특정한 amino acid가 methyl화 되어 있는 현상이다.[8,19]

서론에서도 언급한 바와 같이, wheat germ cytochrome C는 72 및 86번 위치에, neurospora 나 saccharomyces는 72번에만 trimethyllysine이 존재하나 horse heart cytochrome C로 부터는 methylated amino acid가 전혀 발견되지 않았다고 보고 되었다.[7,8] 또한 지금까지 Euglena gracilllis로부터 cytochrome C552, C554, C557, C558 등 많은 종류의 cytochrome C species가 발견, 정제되었으나[20] C557과 C558에서 trimethyllysine이 확인되었을 뿐이다. 특히 methylated amino acids 중에서도 methylarginine이나 methylmethionine는 어떠한 종류의 cytochrome C에서도 아직까지 발견되지 않고 있다. 그러나 최근 Farooqui등[10] 연구보고에 의하면, Euglena로 부터 정제한 효소인 protein methylase는 horse heart cytochrome C를 기질로 하였을 때 methylarginine과 methylmethionine을 그의 product로 생성 하였다고 보고하였다. 이와 같은 현상은 Euglena cytochrome C에 methylated amino acids의 존재가능성을 암시하여 주고 있다.

본 실험에서는 우선 그 첫단계 실험으로서 Euglena gracillis로부터 5mg의 순수 cytochrome C552를 얻었으며, 순수 cytochrome C552는 cytochrome C의 전형적 흡광 spectrum인 a-band, b-band, Soret band, 및 d-band를 보여 주었으며 각 spectrum간의 흡광도비율이 보고된 문헌[11]의 흡광도비율과 거의 유사하여 순수정제 되었음을 알 수 있었다.

Petigrew 및 그의 공동연구자[9]에 의하면 Euglena cytochrome C552는 총 83개의 amino acids로 구성된 단백질로서 그 중 basic amino acid는 arginine 1분자와 lysine 2분자가 포함되어 있으나, methyl화된 methylated amino acid는 발견되지 않았다고 보고하였다. 또한 cytochrome C 557 및 C558에서는 trimethyllysine만 발견되었을 뿐 Farooqui등[10]의 in vitro 실험결과가 암시하는 methylarginine의 존재는 확인되지 않고 있다. 본 실험에서는 arginine을 함유하는 것으로 추측되는 peptide-20을 HPLC system으로 분리정제 후 그의 amino acid composition을 검색한 결과 Asp 1, Glu 및 Gln 3, Gly 1, Ala 2, Tyr

1 그리고 Arg은 1분자로서 기존의 보고와는 약간 차이를 나타내었다. 그러나 arginine 한분자가 확인되었음에도 불구하고 methylarginine의 존재는 확인할 수 없었다.

기대하였던 methylarginine이 cytochrome C552의 예상 peptide fragment, 즉 peptide-20로부터 확인 불가능하였으므로 다른 종류의 methylated amino acids의 존재 유무를 검색한 결과 그림 5에서와 같이 retention time 20.78min.에 확인되지 않는 amino acid peak를 관찰하였다. 이 retention time 20.78min.의 Unknown Peak는 methylated basic amino acids인 mono-, di-, trimethyllysine, mono-, dimethylarginine 등과는 retention time의 큰 차이를 나타내어 적어도 methylated basic amino acids는 아닌 것으로 추측되었다. 또한 S-methylmethionine의 retention time도 11.10min.으로서 Unknown Peak가 S-methylmethionine일 가능성은 희박하였으며, 기타 o-methyl compounds 및 methylglycines의 가능성도 검색하였으나 그 결과는 부정적이었다.

이 retention time 20.78min.의 Unknown Peak는 위에서도 언급한 바와 같이 많은 종류의 amino acids들과 비교하였으나 그 본체를 확인하기 어려웠으며, 또한 표 II에서 보는 바와 같이 오직 Euglena cytochrome C552에서만 발견할 수 있었다. 즉 horse heart cytochrome C, wheat germ H4 fraction, calf thymus histone H4, H2A, H2B 등의 산 가수분해물로 부터 amino acid composition을 검색하였으나 문제의 Unknown Peak는 나타나지 않았다.

결 론

1. Euglena gracillis 약 800g으로부터 약 5mg의 순수한 cytochrome C552를 얻었다.

2. 예상했던 methylarginine이나 methylmethionine은 확인할 수 없었다.

3. 그러나 Euglena cytochrome C552에서 retention time 20.78min.의 Unknown Peak를 발견하였다.

4. 아직까지 Unknown Peak의 본체를 확인할 수 없었으며 이 Peak는 오직 Euglena cytochrome C552에서만 발견할 수 있었다.

감사의 말씀

본 연구는 과학재단 연구비로 이루워졌으며 이에 감사드립니다.

문 헌

1) Adler, J. and Dahl, M.M.: J. Gen. Microbiol. 46:161, 1967.
2) Amstrong, J.B. and Adler, J.: Genetics 61:61, 1969.
3) Amstrong, J.B.: Can. J. Microbiol. 18:1695, 1972.
4) Eylar, E.H.: Ann. N.Y. Acad. Science 195:481, 1972.
5) Baldwin, G.S. and Carnegie, P.R.: Science 171: 579, 1971.
6) Polastro, E., Deconinck, M.M., Devogel, M.R., Mailier, E.L., Looze, Y.B., Schneck, A.G., and Leonis, J.: Biochem. Biophys. Res. Comm. 81: 920, 1978.
7) DeLange, R.J., Glazer, A.N. and Smith, E.L.: J. Biol. Chem. 245:3325, 1970.
8) DeLange, R.J., Glazer, A.N., and Smith, E.L.: J. Biol. Chem. 244:1385, 1969.
9) Pettigrew, G.W.: Biochemical J. 139:449, 1974.
10) Farooqui, J., Tuck, M. and Paik, W.K.: J. Biol. Chem. 260:537, 1985.
11) Porra, R.J. and Jones, O.T.J.: Biochem. J. 87: 186, 1963.
12) Sasagawa, T., Okuyama, T. and Teller, D.C.: J. Chromato. 240:329, 1982.
13) Park, K.S., Hong, S.Y., Lee, H.W., Kim, S. and Paik, W.K.: Arch. Pharma. Research 9:15, 1986.
14) Paik, W.K. and Kim, S.: Protein Methylation. A Wiley-Interscinece Publication, New York 1980.
15) Lee, H.W., Paik, W.K., and Borun, T.W.: J. Biol. Chem. 248:4149, 1973.

16) Lee, H.W. and Paik, W.K.: Biochim. Biophy. Acta 277:107, 1973.
17) Paik, W.K., Kim, S. and Lee, H.W.: Biochem. Biophys. Res. Comm. 46:933, 1972.
18) Paik, W.K., Lee, H.W. and Lawson, D.: Exp. Gerontol. 6:271, 1971.
19) Malgoliash, E. and Schejter, A.: in Advances in Protein Chemistry. vol. 21, Academic Press, New York, p. 113, 1966.
20) Pettigrew, G., Leaver, J.L., Mayer, T.E. and Ryle, A.P.: Biochem. J. 147:291, 1975.
21) Paik, W.K. and Kim, S.: Science 174:114, 1971.