

Die Mikroanalysen verdanken wir unserem Mikroanalytischen Laboratorium, Leitung Herr Dr. H. WAGNER, die Chromanalysen unserem Analytischen Laboratorium, Leitung Herr Dr. K. STAMMBACH. Die Spektren wurden auf einem Spektrographen Typ BECKMAN DK 2 unter Leitung von Herrn Dr. R. ZBINDEN aufgenommen.

SUMMARY

Pentacyclic chromium complexes are produced from the bisazo dyestuffs 1,2- (resp. 3)-(2-amino-benzenesulfonamido)-ethane (resp. propane) \rightarrow β -naphthol. It is concluded from their absorption spectra that their steric arrangement corresponds to a «1:2-sandwich complex» linked internally, preference being given to one of the possible coordination arrangements. Because of the great similarity of their spectra to that of a previously described «1:2-chromium-sandwich complex» from anthranilic acid \rightarrow β -naphthol, it is concluded that they are arranged in the same way as the latter.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] G. SCHETTY & H. ACKERMANN, *Angew. Chem.* **70**, 222 (1958).
 [2] Zusammenfassende Darstellung: G. SCHETTY, *Chimia* **18**, 244 (1964).
 [3] G. SCHETTY, *Helv.* **45**, 1095 (1962).
 [4] G. SCHETTY & W. KUSTER, *Helv.* **44**, 2193 (1961).
 [5] S. R. ASPINALL, *J. Amer. chem. Soc.* **63**, 853 (1941).

113. Über die Aldolase der Kaninchenleber: Molekulargewicht, Dissoziation in Untereinheiten

Über Aldolasen, 5. Mitteilung¹⁾

von Ph. Christen, H. Göschke, F. Leuthardt und A. Schmid

(6. V. 65)

Die in der Leber vorkommende Aldolase unterscheidet sich in ihrer enzymatischen Spezifität wesentlich von der Aldolase des Muskels (LEUTHARDT, TESTA & WOLF [2]; HERS & KUSAKA [3]). PEANASKY & LARDY [4] gelang es 1958, die Aldolase der Rinderleber im kristallinen Zustand zu isolieren. GÖSCHKE & LEUTHARDT [5] stellten 1963 kristallisierte Aldolase aus Kaninchenleber nach einer wesentlich einfacheren Methode dar. Im gleichen Jahr berichteten auch RUTTER u. Mitarb. [6] über die Isolierung von Kaninchenleberaldolase, ohne jedoch die verwendete Methode bekanntzugeben. Die Leberaldolase spaltet FDP²⁾ und F-1-P²⁾ mit derselben Geschwindigkeit, während die Muskelaldolase gegen F-1-P nur eine geringe Aktivität besitzt.

Die Muskelaldolase dissoziiert unter verschiedenen Bedingungen – bei saurer und alkalischer Reaktion, in 4 M Harnstofflösung, bei Zusatz von Natriumdodecylsulfat – in 3 Untereinheiten, die sich bei der Ultrazentrifugation einheitlich verhalten und ein Molekulargewicht von einem Drittel der unveränderten Molekel besitzen müssen [7].

¹⁾ 4. Mitteilung s. [1].

²⁾ Abkürzungen: FDP = Fructose-1,6-diphosphat; F-1-P = Fructose-1-phosphat; NADH₂ = reduziertes Nicotinamid-Adenin-dinucleotid.

In der vorliegenden und den nachfolgenden Arbeiten beschreiben wir Versuche über die kinetischen und hydrodynamischen Eigenschaften der Aldolase aus Kaninchenleber und deren Verhalten in 4M Harnstoff.

Material. – *Kaninchenleberaldolase* wurde durch fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällungen nach dem in unserem Institut ausgearbeiteten Verfahren erhalten [5].

Kaninchenmuskellaldolase wurde nach der Methode von TAYLOR u. Mitarb. [8] dargestellt. Mit FDP als Substrat betrug die spezifische Aktivität 30 IUB Einh./mg, entsprechend einer molekularen Aktivität (Wechselzahl) von 4400.

α -Glycerophosphatdehydrogenase, Trioseisomerase, $NADH_2$, FDP und F-1-P, die beiden letzteren als Cyclohexylammoniumsalze, wurden von der Fa. BOEHRINGER, Mannheim, bezogen; *Trypsin* (zweimal umkristallisiertes Präparat) wurde von der WORTHINGTON BIOCHEMICAL CORP. FREEHOLD, New Jersey, USA, bezogen.

Für die Stärkegel-Elektrophorese verwendeten wir die lösliche Stärke für Gelelektrophorese der CONNAUGHT MEDICAL RESEARCH LABORATORIES, Toronto.

Methoden. – 1. Die Aldolaseaktivität bestimmten wir durch den optischen Test mit α -Glycerophosphatdehydrogenase und Trioseisomerase als Hilfsenzyme (RACKER [9]; BEISENHERZ u. Mitarb. [10]); Temp. 25°. Als Puffer verwendeten wir Tris-hydroxymethyl-aminomethan, 0,1M, pH 7,6.

2. Die Proteinkonzentration wurde mit der Biuretmethode ermittelt [10].

3. Die Experimente zur Bestimmung der Sedimentations- und Diffusionskoeffizienten wurden mit der analytischen Ultrazentrifuge SPINCO, Modell E (Rotor AND, Phasenplatte als Schlierenanalysator, RAYLEIGH Optik), ausgeführt. Alle Experimente wurden bei 20°C in einem 0,05M Acetatpuffer von pH 5,5, der 0,2M NaCl enthielt, durchgeführt. Die Messungen in Gegenwart von Harnstoff erfolgten im gleichen Puffer, der auf eine Harnstoffkonzentration von 4M gebracht worden war.

Alle beobachteten (scheinbaren) Sedimentations- und Diffusionskoeffizienten wurden auf Standardbedingungen (Dichte und Viskosität des Wassers) umgerechnet. Die Dichte- und Viskositätsinkremente des Harnstoffs entnahmen wir den Physikalisch-Chemischen Tabellen von LANDOLT & BÖRNSTEIN [11] und den INTERNATIONAL CRITICAL TABLES [12]. Die Werte der Sedimentations- und Diffusionskoeffizienten aus vier Läufen bei verschiedenen Proteinkonzentrationen im Bereich von 3–12 mg/ml wurden graphisch auf die Proteinkonzentration Null extrapoliert.

a) Die Sedimentationskoeffizienten bestimmten wir mit Standard- und Keil-Einsektorzellen von 4° Sektorwinkel mit Quarzfenstern und 12 mm Lichtweg. Die Tourenzahl betrug einheitlich 56100 Upm.

b) Die Diffusionskoeffizienten bestimmten wir ebenfalls mittels der Ultrazentrifuge. Wir verwendeten Einsektorzellen von 3° Sektorwinkel für künstliche Übersichtung (Kapillarentyp) mit Quarzfenstern und 12 mm Lichtweg. Die Tourenzahl betrug bei allen Läufen 12590 Upm. Die Auswertung erfolgte nach der Flächenmethode.

c) Die Molekulargewichte wurden aus den auf Dichte und Viskosität des Wassers und die Proteinkonzentration Null korrigierten Sedimentations- und Diffusionskoeffizienten nach der SVEDBERG'schen Formel berechnet. Aus denselben Grössen bestimmten wir das molare Reibungsverhältnis und das Achsenverhältnis des Modellellipsoids (nach GREENBERG [13]).

4. Die Stärkegel-Elektrophoresen wurden nach SMITHIES [14] in der horizontalen Anordnung bei +3° ausgeführt. Zur Herstellung des Gels verwendeten wir 32,5 g Stärke auf 250,0 ml Puffer. Die Proben (200 μ g) wurden auf einen Streifen Filterpapier (WHATMAN 3 MM) aufgetragen und in einen vertikalen Schlitz des Gels eingeführt. Die Elektroden tauchten in eine 10-proz. NaCl-Lösung, die durch Filterpapierbrücken mit den Brückengefässen verbunden waren. Die Brückengefässe enthielten denselben Puffer wie das Gel (siehe Legende Fig. 2), aber in zehnfach höherer Konzentration, und waren mit dem Gel wiederum durch Filterpapierbrücken verbunden.

5. *Tryptische Hydrolyse*: Ein 20 mg Protein entsprechendes Volumen einer Suspension kristalliner Aldolase in 2M Ammoniumsulfatlösung wurde zentrifugiert, das Sediment in 2,0 ml 0,1M Ammoniumcarbonatlösung von pH 8,25 gelöst und zweimal gegen 1 l derselben Ammoniumcarbonatlösung dialysiert. Anschliessend wurde das Volumen des Dialysats mit Ammoniumcarbonatlösung auf 3,0 ml ergänzt. Diese Lösung wurde 4 Min. in ein Wasserbad von 90° gestellt,

um das Protein zu denaturieren. Zur pH-Kontrolle während der enzymatischen Hydrolyse wurde ein Tropfen Phenolrot zugesetzt. Nach Zugabe von 0,2 mg Trypsin wurde der Ansatz 6 Std. bei 37° unter ständigem Schütteln inkubiert. Die noch bestehende leichte Trübung des Inkubats wurde abzentrifugiert und das klare Überstehende für weitere drei Stunden inkubiert. Die Hydrolysate wurden in einem Dialysierschlauch durch einen Luftstrom auf eine Konzentration von ungefähr 150 mg/ml eingengt und wenn nötig bei -30° aufbewahrt.

6. Die *Peptidmuster* («finger prints») wurden durch eine Kombination von Papierchromatographie und Hochspannungselektrophorese erhalten (KATZ u. Mitarb. [15]). 40 μ l eingengtes Hydrolysat (ungefähr 6 mg Protein) wurden auf WHATMAN-3MM-Papier aufgetragen. Die Chromatogramme wurden absteigend mit Butanol : Eisessig : Wasser im Verhältnis 4 : 1 : 5 über 12-14 Std. entwickelt. Für die nachfolgende Hochspannungselektrophorese senkrecht zur Chromatographierichtung verwendeten wir einen Pyridinpuffer (Pyridin : Eisessig : Wasser = 1 : 10 : 289) von pH 3,5. Über 75 Min. wurde eine Klemmenspannung von 1900 Volt (34 V/cm) konstant gehalten. Dabei floss ein konstanter Strom von 100 mA. Nach Trocknen bei 60° wurde das Papier durch eine Lösung von 0,2% Ninhydrin in Aceton gezogen und im Trockenschrank 15 Min. auf 100° erwärmt.

Resultate. - 1. *Molekulare Daten der Kaninchenleberaldolase, nativ und in 4M Harnstoff*: Bei Bestimmung der Sedimentationsgeschwindigkeit und der Diffusionskoeffizienten mit künstlicher Grenzschicht ergaben sowohl die native Leberaldolase als auch das Enzym in 4M Harnstoff einen einzigen, symmetrischen Gipfel ohne Knickung der Schenkel (s. Fig. 1).

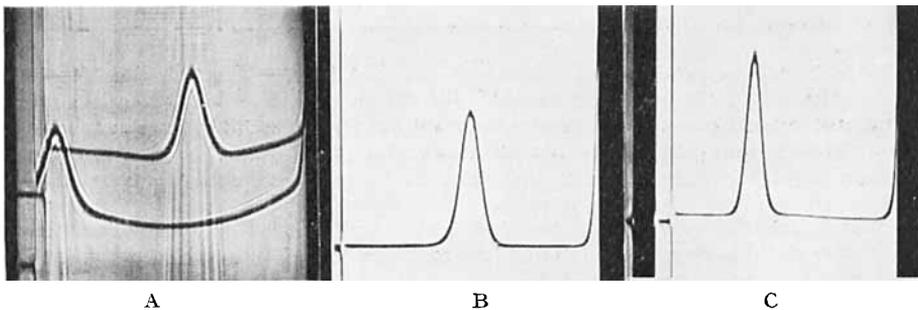


Fig. 1. *Ultrazentrifugenexperimente mit Kaninchenleberaldolase (Schlierendiaphragmawinkel 70°)*
 A: Sedimentationsgeschwindigkeitslauf mit Standard- und Keilzelle. Oben: natives Enzym; unten: in 4M Harnstoff. - Proteinkonzentration 9,85 mg/ml. Aufnahme 80 Minuten nach Erreichen der Arbeitsgeschwindigkeit (56100 Upm). - B und C: künstliche Grenzschicht zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten. Aufnahmen 28 Min. nach Überschichtung (12590 Upm). - B: natives Enzym, Proteinkonzentration 8,33 mg/ml; C: in 4M Harnstoff, Proteinkonzentration 8,85 mg/ml.

Das zur Berechnung der verschiedenen hydrodynamischen Grössen (s. Tab. 1) notwendige partielle spezifische Volumen wurde anhand der Aminosäurezusammensetzung (RÜTTER u. Mitarb. [6]): Kaninchenleberaldolase B₁) und des scheinbaren molaren Volumens der einzelnen Aminosäurereste nach COHN & EDSALL [16] berechnet. Mit einer Korrektur für Dicarbonaminosäureamide nach den Angaben von VELICK & RONZONI [17] (für Kaninchenmuskeldolase) ergab sich ein Wert von 0,732 ml/g (bei 20°).

Das Molekulargewicht der Leberaldolase in 4M Harnstoff beträgt ungefähr ein Drittel des Molekulargewichts des nativen Enzyms. Die Abweichung von dem er-

Tabelle 1. Molekulare Daten der Kaninchenleberaldolase, nativ und in 4M Harnstoff

	S_{20}^0, w	D_{20}^0, w	M_{S^0, D^0}	f/f_0	a/b	
	(S)	($\text{cm}^2 \text{sec}^{-1} \cdot 10^{-7}$)			0,2*	0,8*
nativ	7,8	4,8	151 000	1,26	1	3,5
in 4M Harnstoff	2,0	5,0	46 000	1,79	7,5	12,5

f/f_0 = molares Reibungsverhältnis.

a/b = Achsenverhältnis des gestreckten Rotationsellipsoides, abhängig von Hydratation des Proteins.

* Grenzwerte der Hydratation: g Hydratationswasser pro g Protein.

warteten Wert von 50000 hat ihren Grund darin, dass bei der Korrektur auf Standardbedingungen nur die Dichte- und Viskositätsinkremente der 4M Harnstofflösung erfasst werden konnten, die Nichtidealität der Lösung aber unberücksichtigt blieb. Das molare Reibungsverhältnis f/f_0 ist in Harnstofflösung wesentlich erhöht, was sich anschaulich in einer Erhöhung des Achsenverhältnisses a/b um das 3–7fache ausdrückt.

2. MICHAELIS-Konstanten und Wechselzahlen: Zur Bestimmung der MICHAELIS-Konstanten wurden mit FDP und F-1-P als Substrat je zwei Versuche durchgeführt, die nach LINEWEAVER-BURK und nach EADIE (v gegen $v/(S)$ aufgetragen) ausgewertet wurden. Eine gewisse Unsicherheit in der Bestimmung der MICHAELIS-Konstanten entsteht dadurch, dass während der Aktivitätsbestimmung der Sättigungsgrad des Enzyms mit Substrat abnimmt, weil bei den geringen Substratkonzentrationen von der Größenordnung der recht kleinen MICHAELIS-Konstanten der Leberaldolase das vorhandene Substrat rasch verbraucht wird. Die Aktivität wurde hier aus der Neigung der Tangente der Zeit-Umsatz-Kurve im Nullpunkt bestimmt. Die Wechselzahlen unserer Präparate schwanken ungefähr 10% um den in Tab. 2 angegebenen Mittelwert.

Tabelle 2. MICHAELIS-Konstanten und Wechselzahlen der Kaninchenleberaldolase mit FDP resp. F-1-P als Substrat (bei 25°)

Substrat	MICHAELIS-Konstante (m)		Mittelwert	Wechselzahl (Mol gespaltene Substrat pro Mol Enzym und Min.)
	nach LINEWEAVER-BURK	nach EADIE		
F-1-P	$5,3 \cdot 10^{-4}$	$5,6 \cdot 10^{-4}$	$6 \cdot 10^{-4}$	520
	$6,0 \cdot 10^{-4}$	$6,9 \cdot 10^{-4}$		
FDP	$5,0 \cdot 10^{-7}$	$5,7 \cdot 10^{-7}$	$5 \cdot 10^{-7}$	570
	$4,4 \cdot 10^{-7}$	$5,1 \cdot 10^{-7}$		

3. Stärkegel-Elektrophorese von Leber- und Muskelaldolase in 4M Harnstoffmilieu: Wie Fig. 2 zeigt, wandern Leber- und Muskelaldolase bei der Stärkegelelektrophorese unter den Bedingungen, die zur Dissoziation in Untereinheiten führen, als einheitliche Bande. Unter den gewählten Bedingungen weisen die Untereinheiten der Leber- und der Muskelaldolase annähernd dieselbe elektrophoretische Beweglichkeit auf;

erst nach dreifacher Laufzeit zeigt sich eine Auftrennung des Gemisches (Fig. 2: LM) in zwei Zonen. Die beiden nativen Aldolasen lassen sich bei pH 8,7 gut voneinander trennen.

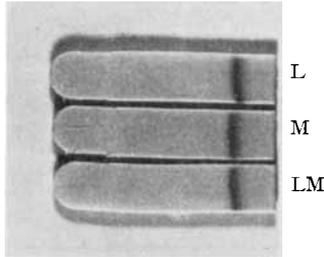


Fig. 2. Stärkegel-Elektrophorese in 4M Harnstoffmilieu
Gelpuffer: Harnstoff 4M, Acetatpuffer 0,025M, pH 5,40. 6 Volt/cm, 5 h 20 min. Färbung mit Amidoschwarz. L: Leberaldolase; M: Muskelaldolase; LM: Gemisch.

4. *Peptidmuster von Leber- und Muskelaldolase nach tryptischer Hydrolyse*: Wie Fig. 3 zeigt, gleichen sich die beiden Peptidmuster nur in groben Zügen und lassen sich deutlich voneinander unterscheiden. Nur eine geringe Anzahl von Peptiden dürfte identisch sein.

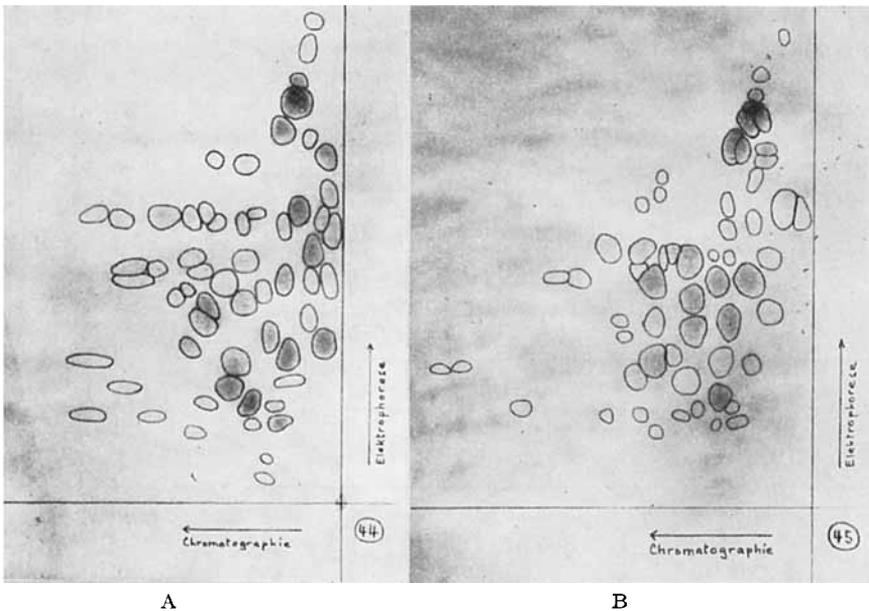


Fig. 3. *Peptidmuster nach tryptischer Hydrolyse*
A: Leberaldolase; B: Muskelaldolase.

Trypsin spaltet mit hoher Spezifität nur Peptidbindungen, deren Carboxylgruppe einem Arginin- oder Lysin-Rest angehört. Theoretisch sollte die Zahl von Peptiden, die durch Trypsinverdauung einer Polypeptidkette entstehen, gleich sein der Summe

der Arginin- und Lysin-Reste plus einem zusätzlichen Fragment vom Carboxylende, das weder Arginin noch Lysin enthält, sofern die Carboxyl-endständige Aminosäure nicht Arginin oder Lysin ist.

Nach RUTTER [6] enthält die Kaninchenleberaldolase 110 Lysin- und 63 Arginin-Reste. Wären diese längs einer einzigen Polypeptidkette angeordnet, ergäben sich $110 + 63 = 173$ durch Trypsin spaltbare Bindungen, d. h. 174 Peptide. Analog würden wir bei der Muskelaldolase nach Trypsinverdauung $112 + 62 + 1 = 175$ Peptide erwarten. – Die Auszählung der Flecke auf den Peptidkarten ergibt im Falle der Leberaldolase 59, bei der Muskelaldolase 58 Peptide. Beide Zahlen entsprechen recht genau einem Drittel der unter der Annahme einer einzigen Polypeptidkette zu erwartenden Anzahl Peptide (174 resp. 175 : 3 \sim 58). Würden die Polypeptidketten der drei Untereinheiten in ihrer Aminosäuresequenz wesentliche Unterschiede zeigen, so müsste die Zahl der Peptide grösser sein als ein Drittel der Summe der gesamten Lysin- und Arginin-Werte. Offenbar wiederholt sich in der Aldolasemolekel die gleiche oder eine sehr ähnliche Aminosäuresequenz dreimal.

Diskussion. – Die oben mitgeteilten Werte des Sedimentations-, des Diffusionskoeffizienten und des Molekulargewichts der Kaninchenleberaldolase stimmen mit den Angaben von RUTTER [6] und mit denjenigen von PEANASKY & LARDY [4] für Rinderleberaldolase überein. Die Kaninchenleberaldolase unterscheidet sich also in ihren hydrodynamischen Daten nicht von der Muskelaldolase.

Aus unseren Versuchen geht hervor, dass auch die Leberaldolase in drei Untereinheiten von einem Drittel des Molekulargewichts der nativen Molekel dissoziiert. Die Dissoziation ist begleitet von einer Entfaltung der Polypeptidketten, die zu einer Erhöhung des molaren Reibungsverhältnisses f/f_0 führt. Auf den Zusammenhang zwischen Entfaltung resp. Dissoziation in Untereinheiten und der begleitenden Inaktivierung des Enzyms werden wir in einer folgenden Arbeit zurückkommen.

Die Tatsache, dass sich die Untereinheiten der Aldolasen durch Stärkegel-Elektrophorese nicht trennen lassen – wenigstens nicht unter den angegebenen Bedingungen – sowie die Zahl der durch Trypsinverdauung des Enzyms erhaltenen Peptide lassen eine weitgehende Ähnlichkeit der Primärstruktur der drei Untereinheiten vermuten. Gegen die vollständige Identität der drei Untereinheiten der Muskel- und auch der Leberaldolase sprechen die Resultate von HORECKER u. Mitarb. [18], von LAI u. Mitarb. [19] und von MORSE u. Mitarb. [20], welche bei beiden Enzymen nur zwei aktive Zentren feststellen konnten. WINSTEAD & WOLD [21] bestimmten durch sukzessiven Abbau durch Carboxypeptidase die Aminosäuresequenz am Carboxylende der Muskelaldolase und fanden zwei sich gleich verhaltende und eine von diesen zwei differierende Polypeptidkette. Zusammen mit unseren Resultaten darf man wohl schliessen, dass sich die Muskel- und Leber-Aldolasemolekel aus zwei sehr ähnlichen und einer dritten, davon in ihrer Struktur leicht abweichenden Polypeptidkette aufbaut.

Das Vorliegen der gleichen Quartärstruktur bei ähnlicher Aminosäurezusammensetzung (RUTTER u. Mitarb. [6]) und ähnlichem Peptidmuster lässt Hybridisierungen zwischen Leber- und Muskelaldolase als möglich erscheinen. Vorversuche mit den Methoden, wie sie von ZINKHAM u. Mitarb. [22] und von CHILSON u. Mitarb. [23] im Falle der Lactatdehydrogenase angewandt wurden, fielen negativ aus.

Die vorliegende Arbeit wurde mit Hilfe des SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS FÜR WISSENSCHAFTLICHE FORSCHUNG durchgeführt, dem wir für seine Unterstützung bestens danken möchten.

SUMMARY

1. The sedimentation and diffusion coefficients of rabbit liver aldolase have been determined. The molecular weight has been calculated to be 151000.

2. The MICHAELIS constant for the splitting of fructose-1,6-diphosphate has been determined to be $6 \cdot 10^{-4}M$; for splitting of fructose-1-phosphate it was $5 \cdot 10^{-7}M$. The molecular activities were 570 moles fructose-1,6-diphosphate, respectively 520 moles fructose-1-phosphate, cleaved per minute and per mole of enzyme.

3. In a solution $4M$ in urea the enzyme was dissociated into three subunits of uniform molecular weight.

4. The results of starch-gel electrophoresis and the number of peptides in fingerprints after tryptic digestion suggest a very similar primary structure of the three subunits of the liver aldolase. The same was found for the muscle aldolase.

Aus dem Biochemischen Institut
der Universität Zürich

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] H. P. WOLF & E. R. FROESCH, *Biochem. Z.* **337**, 328 (1963).
- [2] F. LEUTHARDT, E. TESTA & H. P. WOLF, *Helv.* **36**, 227 (1953).
- [3] H. G. HERS & T. KUSAKA, *Biochim. biophysica Acta* **77**, 427 (1953).
- [4] R. J. PEANASKY & H. A. LARDY, *J. biol. Chemistry* **233**, 365 und 371 (1958).
- [5] H. GÖSCHKE & F. LEUTHARDT, *Helv.* **46**, 1791 (1963).
- [6] W. J. RUTTER, B. M. WOODFIN & R. E. BLOSTEIN, *Acta chem. scand.* **17**, Suppl. **7**, 226 (1963).
- [7] E. STELLWAGEN & H. K. SCHACHMANN, *Biochemistry* **1**, 1056 (1962); W. C. DEAL, W. J. RUTTER & K. E. VAN HOLDE, *ibid.* **2**, 246 (1963); L. F. HASS & M. S. LEWIS, *ibid.* **2**, 1368 (1963); E. W. WESTHEAD, L. BUTLER & P. D. BOYER, *ibid.* **2**, 927 (1963).
- [8] J. F. TAYLOR, A. A. GREEN & G. T. CORI, *J. biol. Chemistry* **173**, 591 (1948).
- [9] E. RACKER, *J. biol. Chemistry* **167**, 843 (1947).
- [10] G. BEISENHERZ, H. J. BOLTZE, TH. BÜCHER, R. CZOK, K. H. GARBADE, E. MEYER-ARENDE & G. PFLEIDERER, *Z. Naturforsch.* **8b**, 555 (1953).
- [11] LANDOLT-BÖRNSTEIN, *Physikalisch-Chemische Tabellen*, Bd. 1, S. 462, 5. Aufl., Berlin 1923.
- [12] INTERNATIONAL CRITICAL TABLES OF NUMERICAL DATA, *Physics, Chemistry and Technology*, Bd. V, S. 22, 1. Aufl., New York 1929.
- [13] D. M. GREENBERG, *Amino Acids and Proteins*, S. 391 ff., 1. Aufl., Springfield, Ill. USA, 1951.
- [14] O. SMITHIES, *Biochem. J.* **67**, 629 (1955).
- [15] A. M. KATZ, W. J. DREYER & CH. B. ANFENSEN, *J. biol. Chemistry* **234**, 2897 (1959).
- [16] E. J. COHN & J. T. EDSALL, *Proteins, Amino Acids and Peptides as Ions and Dipolar Ions*, New York 1943.
- [17] S. F. VELICK & E. RONZONI, *J. biol. Chemistry* **173**, 627 (1948).
- [18] B. L. HORECKER, P. T. ROWLEY, E. GRAZI, T. CHENG & O. TCHOLA, *Biochem. Z.* **338**, 36 (1963).
- [19] C. Y. LAI, O. TCHOLA, T. CHENG & B. L. HORECKER, *J. biol. Chemistry* **240**, 1347 (1965).
- [20] D. MORSE, C. Y. LAI & B. L. HORECKER, and T. RAJKUMAR & W. J. RUTTER, *Biochem. biophysical Res. Commun.* **18**, 679 (1965).
- [21] J. A. WINSTEAD & F. WOLD, *J. biol. Chemistry* **239**, 4212 (1964).
- [22] W. H. ZINKHAM, A. BLANCO & L. KUPCHYK, *Science* **142**, 1303 (1963).
- [23] O. P. CHILSON, L. A. COSTELLO & N. O. KAPLAN, *J. molec. Biol.* **10**, 349 (1964).