

CHROM. 11,987

AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHISCHE REINIGUNG UND EIGENSCHAFTEN DER ACETYLCHOLINESTERASE AUS KOBRAGIFT (*NAJA NAJA ATRA*)

H. GROSSMANN und M. LIEFLÄNDER

Institut für Chemie der Universität Regensburg, Universitätsstrasse 31, D-8400 Regensburg (B.R.D.)

(Eingegangen am 6. März 1979)

SUMMARY

Purification by affinity chromatography and properties of the acetylcholinesterase of Formosan cobra (Naja naja atra) venom

The acetylcholinesterase was purified by CM-Sephadex chromatography and affinity chromatography on Sepharose bound *m*-[6-(6-aminocaproylamino)caproylamino]phenyltrimethylammonium bromide. The purified enzyme was obtained with a specific activity of 5470 U/mg (1160-fold purification) and a 89% yield. The molecular weight of the native enzyme was estimated to be 144,000. The enzyme is split into two subunits of approximately equal molecular weight (M_r 69,000) by SDS treatment. It is a glycoprotein and can be resolved by disc gel electrophoresis into seven and by isoelectric focusing into more than ten multiple forms. The N-terminal amino acid is serine.

EINLEITUNG

Acetylcholinesterase kommt in dem Gift der meisten Giftnattern (*Elapidae*) vor¹. Im Gift der Kobra wurde sie zum ersten Mal von Iyengar *et al.*² nachgewiesen. Dort liegt sie, im Gegensatz zu den membranständigen Enzymen des elektrischen Organs, des Gehirns oder der Erythrozyten, löslich und in hoher spezifischer Aktivität vor. Die Acetylcholinesterase konnte zwar aus dem Gift der indochinesischen Kobra (*Naja naja atra*) durch Elektrophorese³, Ionenaustauschchromatographie⁴ und Elektrofokussierung⁵ abgetrennt und aus dem Gift der mittelasiatischen Unterart (*Naja naja oxiana*) durch Affinitätschromatographie hundertfach angereichert⁶ werden, eine so weit gehende Reinigung, wie sie Kumar und Elliott^{7,8} beim Enzym des Krait (*Bungarus fasciatus*) erzielt haben, wurde bisher jedoch nicht beschrieben.

EXPERIMENTELLES

Materialien

Gefriergetrocknetes *Naja naja atra*-Gift wurde von den Miami Serpentarium

Laboratories (Miami, Fla., U.S.A.) bezogen und bei -25° gelagert. CM-Sephadex C-25 und Sepharose 4B sind von der Deutschen Pharmacia (Freiburg, B.R.D.), Vergleichsproteine zur Molekulargewichtsbestimmung von Boehringer (Mannheim, B.R.D.), Dimethylformamid (silylation grade) und N-Ethylmorpholin (sequanal grade) von Pierce (Rotterdam, Niederlande). Alle übrigen Chemikalien stammen von den Firmen Merck (Darmstadt, B.R.D.) oder Serva (Heidelberg, B.R.D.). Tetramethylammoniumchlorid wurde vor Gebrauch aus Äthanol-Essigester umkristallisiert. Es wurde durchweg mit quarzbidestilliertem Wasser gearbeitet. Zur Chromatographie der Dns-Aminosäuren wurden DC-Fertigfolien A 1700 Mikropolyamid von Schleicher & Schüll (Dassel, B.R.D.) und zur Elektrofokussierung Ampholine PAG plates von LKB (Gräfelfing, B.R.D.) verwendet.

Bestimmung der Enzymaktivitäten und Proteinkonzentrationen

Zur Aktivitätsbestimmung wurde routinemässig die photometrische Methode von Ellman *et al.*⁹ mit Acetylthiocholin als Substrat (0.75 mM) angewandt; die Bestimmung erfolgte bei 25° . Stark aktive Enzymlösungen wurden mit 0.01% Rinderserumalbumin in 0.15 M NaCl verdünnt. Eine Aktivitätseinheit (*U*) entspricht dem Umsatz von 1 μ mol Substrat/min. Proteinkonzentrationen wurden mittels einer modifizierten Lowry-Methode nach Lit. 10 mit Rinderserumalbumin als Standard bestimmt.

Synthese des Inhibitors und Herstellung des Affinitätsgels

Die Synthese des Acetylcholinesteraseinhibitors *m*-[6-(6-Aminocaproylamino)-caproylamino]phenyltrimethylammoniumbromid-hydrobromid und seine Kupplung an Sepharose 4B erfolgte wie in Lit. 11 beschrieben.

Reinigung der Acetylcholinesterase

Alle Arbeitsgänge wurden bei 4° durchgeführt.

Ionenaustauschchromatographie an CM-Sephadex C-25. In Anlehnung an das von Yang beschriebene Verfahren¹² wurde 1.0 g gefriergetrocknetes Gift in 10 ml 0.005 M Ammoniumacetatpuffer, pH 5.8, gelöst und auf eine Säule (24 \times 2 cm) mit 75 ml CM-Sephadex C-25 aufgetragen, die vorher mit diesem Puffer äquilibriert worden war. Bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 30 ml/h wurde dann mit dem selben Puffer eluiert und das Eluat in Fraktionen zu 5 ml gesammelt. Fast die gesamte Acetylcholinesteraseaktivität erschien unter diesen Bedingungen im ersten Proteinpeak. Alle Fraktionen mit mehr als 5 *U*/ml wurden vereinigt und gegen 3 \times 800 ml 0.15 M NaCl in 0.01 M Phosphatpuffer, pH 7.4, dialysiert. Anschliessend wurde 1 h bei 48,000 *g* zentrifugiert und der klare Überstand affinitätschromatographisch weitergereinigt. Die Säule kann durch Elution der festgehaltenen Giftbestandteile mit 1 M Ammoniumacetatpuffer, pH 7.0, regeneriert werden.

Affinitätschromatographie. Der Überstand wurde mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 10 ml/h über eine Säule (10 \times 2 cm) mit 30 ml Affinitätsgel (Beladung 1.5 mmol Inhibitor/l) geschickt, die mit 0.15 M NaCl in 0.01 M Phosphatpuffer, pH 7.4, äquilibriert worden war. Dann wurde mit 400 ml des selben Puffers und mit 80 ml 0.5 M NaCl in 0.01 M Phosphatpuffer, pH 7.4, nachgewaschen. Mit 0.2 M Tetramethylammoniumchlorid plus 0.5 M NaCl in 0.01 M Phosphatpuffer, pH 7.4, wurde die Acetylcholinesterase als scharfer Proteinpeak von der Säule eluiert, dann gegen 5 \times 400 ml 0.15 M NaCl in 0.01 M Phosphatpuffer, pH 7.4, dialysiert

und 1 h bei 48,000 g zentrifugiert. Die Affinitätssäule kann wieder benutzt werden, wenn sie mit 1 M NaCl und 0.02 M NaN_3 in 0.01 M Phosphatpuffer, pH 7.4, ausgewaschen wird.

Untersuchungsmethoden

Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Disk-Elektrophorese wurde in 5% Gelen mit Tris-Glycinpuffer, pH 8.3, durchgeführt¹³. Lineare Gradientengele mit 4 bis 26% Monomergehalt wurden nach der Methode von Lorentz¹⁴ hergestellt. Zur Molekulargewichtseichung wurden die mit Glutaraldehyd vernetzten Oligomeren von Rinderserumalbumin, Molekulargewicht (M_r) 68,000, benutzt¹⁵. Natriumdodecylsulfat (SDS)-Gelelektrophorese wurde nach der Standardmethode von Weber *et al.*¹⁶ in 5% Gelen durchgeführt. Als Eichproteine zur Molekulargewichtsbestimmung dienten RNA-Polymerase aus *E. coli* (EC 2.7.7.6; M_r 165,000; 155,000; 39,000), Phosphorylase α aus Kaninchenmuskel (EC 2.4.1.1; M_r 100,000), Rinderserumalbumin (M_r 68,000), Katalase (EC 1.11.1.6; M_r 58,000) und Chymotrypsinogen A (M_r 25,700).

Die Anfärbung auf Protein erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue R 250 (Lit. 16). Esteraseaktivität wurde durch die Spaltung von 1-Naphthylacetat und anschließende Kupplung mit Fast Blue RR lokalisiert¹⁷. Glykoproteide wurden mit Perjodsäure-Schiff-Reagenz¹³ und Lipoproteide mit Sudanschwarz B¹³ angefärbt. Die Gele wurden bei 560 nm (Proteinfärbung), 590 nm (Esterasefärbung) bzw. 545 nm (Zuckerfärbung) densitometrisch ausgewertet.

Isoelektrische Fokussierung. Die analytische Elektrofokussierung wurde auf Ampholine PAG plates im pH-Bereich 3.5–9.5 durchgeführt¹⁸ und der pH-Gradient mit einer Oberflächenglaselektrode bestimmt. Die Anfärbung auf Esteraseaktivität, der Glyko- und Lipoproteidnachweis sowie die densitometrische Auswertung erfolgte wie oben beschrieben.

Enzymkinetische Messungen. Für kinetische Messungen wurden ausser dem Aktivitätstest nach Ellman *et al.*⁹ auch die pH-Stat-Methode von Heilbronn¹⁹ mit zwei Syringen benutzt: es wurden 30 ml einer Lösung vorgelegt, die 0.1 M an NaCl, 0.04 M an MgCl_2 , 0.005% an Rinderserumalbumin und 10 bis 0.05 mM an Acetylcholin bzw. Acetylthiocholin war. Nach Einstellen der Lösung auf den gewünschten Titrations-pH wurde bei 25° 10 min lang die Nullrate bestimmt und dann die Reaktion durch Zugabe von 100 μl Enzymlösung in 0.01% Rinderserumalbumin gestartet.

Michaeliskonstanten wurden graphisch nach Lineweaver und Burk²⁰, Substratoptima durch Auftragen der Umsatzgeschwindigkeit gegen den Logarithmus der Substratkonzentration ermittelt. Hemmkonstanten wurden nach Dixon²¹ mit Acetylthiocholin als Substrat bestimmt.

Proteinchemische Methoden. Zur Aminosäurenanalyse wurde das gereinigte Enzym zuerst gegen 0.1 M KCl, dann gegen bidest. Wasser dialysiert und anschliessend gefriergetrocknet. Die Hydrolyse erfolgte in verschlossenen, evakuierten Glasröhrchen mit konstant siedender HCl für 20, 48 oder 72 h bei 110°. Die Analysen wurden auf einem BioCal Aminosäureanalysator BC 201 durchgeführt. Cystein wurde nach Perameisensäureoxydation²² als Cysteinsäure, Tryptophan spektrophotometrisch nach Beaven und Holiday²³ und Hydroxyprolin nach Bondjers und Björkerud²⁴ bestimmt. Zur Bestimmung der aminoendständigen Aminosäure wurde das gefriergetrocknete Enzym nach Gray²⁵ mit Dns-chlorid umgesetzt und hydrolysiert. Nach ihrer Extraktion wurden die fluoreszenzmarkierten Aminosäuren durch zwei-

dimensionale Chromatographie auf polyamidbeschichteten Aluminiumfolien^{26,27} aufgetrennt und identifiziert.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Reinigung der Acetylcholinesterase (siehe auch Tabelle I)

Die spez. Aktivität der Acetylcholinesterase im Rohgift von *Naja naja atra* ist mit 4.7 U/mg erheblich geringer als bei *Bungarus fasciatus* (35.2 U/mg) (ref. 8). Die Hauptmenge der Aktivität (>93%) wurde von CM-Sephadex nicht festgehalten und lief bei der Ionenaustauschchromatographie rund 8 mal angereichert durch. Erstaunlicherweise war die Gesamtaktivität danach höher als die des Rohgiftes, eine Tatsache, die wir uns mit der Abtrennung eines im Gift ebenfalls vorhandenen Acetylcholinesterase-Inhibitors⁴ erklären.

TABELLE I

REINIGUNG DER ACETYLCHOLINESTERASE AUS KOB-RAGIFT (*NAJA NAJA ATRA*)
Mittelwerte aus vier Präparationen.

	Volumen (ml)	Protein- konz. (mg/ml)	Gesamt- protein (mg)	Aktivität (U/ml)	Gesamt- aktivität (U)	Spez. Akt. (U/mg)	Anreiche- rungs- faktor	Ausbeute (%)
Rohgiftlösung	10.0	92.6	926	438	4380	4.72	—	100
CM-Sephadex-Säule	33.5	3.64	122	147	4910	40.3	8.5	112
Affinitätssäule	16.5	0.043	0.71	236	3900	5470	1160	89

m-[6-Aminocaproylamino]caproylamino]phenyltrimethylammoniumbromid ist für die Acetylcholinesterase des Kobragifts ein kompetitiver Inhibitor ($K_i = 1.4 \pm 0.4 \mu M$). An Sepharose gebunden hält diese Verbindung des *Naja*-Enzym zwar nicht so gut fest wie die Acetylcholinesterase der Erythrozyten ($K_i = 0.3 \mu M$) (ref. 11), dennoch wurde bei der Affinitätschromatographie mit 93% der aufgetragenen Aktivität noch eine genügend grosse Menge gebunden. 80% der aufgetragenen Aktivität liessen sich mit Tetramethylammoniumchlorid wieder eluieren, 3% anschliessend noch mit 1 M NaCl (in der Tabelle nicht berücksichtigt).

Das affinitätschromatographisch gereinigte Enzym ist 1160-fach angereichert und hat mit 5470 U/mg (Acetylthiocholin als Substrat, Ellman-Test) eine höhere spez. Aktivität als die aus *Bungarus*-Gift⁸ isolierte Acetylcholinesterase (4512 U/mg). Mit dem pH-Stat-Test wurden spez. Aktivitäten von 6980 U/mg (Acetylcholin) bzw. 9530 U/mg (Acetylthiocholin als Substrat; jeweils bei pH 8.0 und 25°) ermittelt.

Molekulare Eigenschaften

Das gereinigte Enzym liess sich bei der Disk-Elektrophorese in 7 Proteinbanden auftrennen (Fig. 1a). Alle Banden zeigten Esteraseaktivität (Fig. 1b) und liessen sich mit Schiff's Reagenz auf Zucker anfärben. Diese Beobachtung stimmt mit den Angaben von Lee *et al.*²⁸ überein, die im Gift verschiedener Schlangenarten (*Naja melanoleuca*, *Bungarus fasciatus* und *Naja naja naja*) bis zu vier Acetylcholinesterase-Isoenzyme durch gelelektrophoretische Auftrennung nachweisen konnten. Auch bei grösseren Proteinmengen (>50 μg pro Gel) war die Sudanschwarz-Färbung

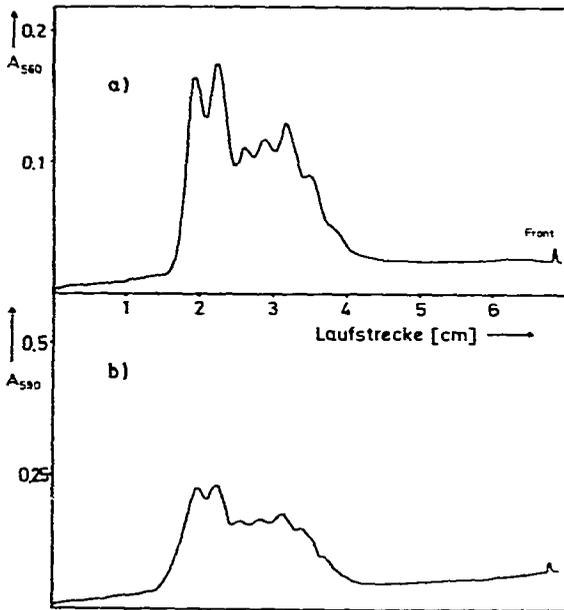


Fig. 1. Disk-Gelelektrophorese der gereinigten Acetylcholinesterase aus Kobra-Gift. (a) Protein-färbung (aufgetragen 5 µg); (b) Esteraseanfärbung (aufgetragen 2.5 U).

negativ, das heisst, es liegt hier im Gegensatz zum aus Rindererythrozyten isolierten Enzym²⁹ kein Lipoprotein vor. Die gefundenen multiplen Formen unterscheiden sich wahrscheinlich nur in ihrer Ladung, denn bei der Gradientengelelektrophorese (hier erfolgt eine Auftrennung praktisch nur nach Molekülgrösse) wurde nur eine, wenn auch etwas asymmetrische Bande gefunden (Fig. 2). Das Molekulargewicht des Enzyms im nativen Zustand wurde hierbei zu $144,000 \pm 5000$ abgeschätzt.

Bei der SDS-Gelelektrophorese konnten auch bei Proteinmengen bis zu 50 µg pro Gel keine Verunreinigungen nachgewiesen werden; in Gegenwart wie auch in Abwesenheit von Mercaptoäthanol als Disulfidbrücken spaltendes Reagenz wurde

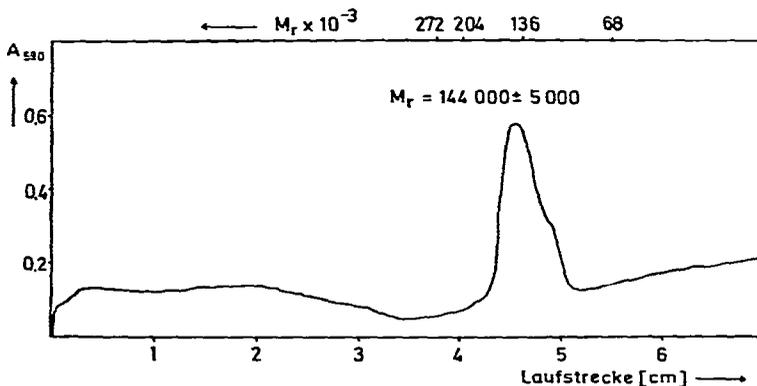


Fig. 2. Bestimmung des Molekulargewichts des gereinigten, nativen Enzyms durch Gradientengelelektrophorese in Polyacrylamidgelen mit 4-26% Monomergehalt (Esteraseanfärbung, aufgetragen 10 U). Oben sind die Laufstrecken der Rinderserumalbumin-Oligomeren aufgetragen.

nur eine Bande gefunden. Das Molekulargewicht der Untereinheit, der diese Bande entspricht, liegt bei $69,000 \pm 2000$ (Fig. 3). Das gereinigte Enzym liess sich durch isoelektrische Fokussierung in mehr als zehn multiple Formen aufspalten (Fig. 4), die alle Zuckerreste enthalten und deren pI -Werte zwischen 5.3 und 6.5 liegen. Die beiden, mengenmässig am stärksten vertretenen Formen haben ihre isoelektrischen Punkte bei $pH\ 6.4 \pm 0.1$ bzw. 6.25 ± 0.1 .

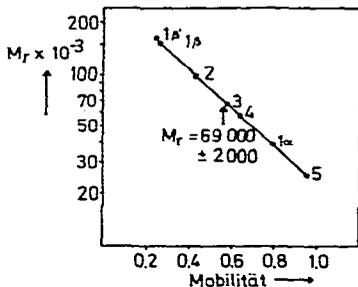


Fig. 3. Bestimmung des Molekulargewichtes der Acetylcholinesterase-Untereinheiten durch SDS-Gelelektrophorese. 1 = RNA-Polymerase; M_r 39,000 (α -Kette); 155,000 (β); 165,000 (β'). 2 = Phosphorylase α ; M_r 100,000. 3 = Rinderserumalbumin; M_r 68,000. 4 = Katalase; M_r 58,000. 5 = Chymotrypsinogen A; M_r 25,700.

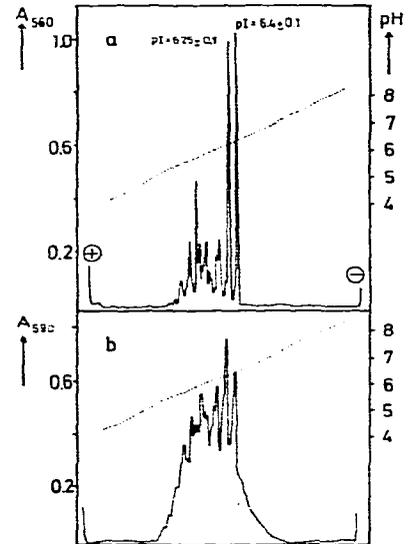


Fig. 4. Analytische Elektrofokussierung der gereinigten Acetylcholinesterase auf Polyacrylamid-dünnschichtgelen. Der pH-Gradient ist gepunktet eingezeichnet. (a) Proteinfärbung (aufgetragen 18 μ g); (b) Esteraseanfärbung (aufgetragen 25 U).

Enzymatische Eigenschaften

Das Enzym zeigt als wahre Acetylcholinesterase bei hohen Substratkonzentrationen Substrathemmung. In Tabelle II sind die Michaeliskonstanten, Substratoptima und pH-Optima für Acetylcholin und Acetylthiocholin als Substrat zusammengestellt. Das Substratoptimum für Acetylcholin fanden wir mit 1.2 mM erheblich niedriger als es Mounter³⁰ manometrisch am Rohgift einer unbekannteren Kobraspezies ermittelt hat (≈ 30 mM); unser Wert ist mehr in der Nähe des Substratoptimums der Acetylcholinesterase von *Bungarus*, das nach Kumar und Elliott⁸ bei 0.8 mM liegt. Die Michaeliskonstante für Acetylcholin ist beim Kobra-Enzym grösser ($K_m = 106 \mu M$) als beim Enzym aus *Bungarus*-Gift ($K_m = 41.7 \mu M$). Das gereinigte Enzym verliert in 0.01 M Phosphatpuffer, pH 7.4, 0.15 M NaCl nach etwa zwei Wochen bei 4° schnell an Aktivität, in 0.2 M Tetramethylammoniumchlorid und 0.5 M NaCl in 0.01 M Phosphatpuffer, pH 7.4, ist es jedoch erheblich länger haltbar.

Proteinchemische Untersuchungen

Als N-terminale Aminosäure wurde Serin gefunden; demnach hat entweder

TABELLE II

MICHAELISKONSTANTEN, SUBTRATOPTIMA UND pH-OPTIMA FÜR DIE SUBSTRATE ACETYLCHOLIN UND ACETYLTHTIOCHOLIN BEI 25°

Substrat	K_m (pH 8.0)	Substratoptimum (pH 8.0)	pH-Optimum
Acetylcholin pH-Stat-Test 0.1 M NaCl, 0.04 M MgCl ₂ , 0.005% Rinderserumalbumin	106 ± 6 μM	1.2 mM	8.4 ± 0.15
Acetylthiocholin pH-Stat-Test 0.1 M NaCl, 0.04 M MgCl ₂ , 0.005% Rinderserumalbumin	75 ± 3 μM	1.0 mM	9.05 ± 0.2
Acetylthiocholin Photometrischer Test 94 mM Phosphat 0.31 mM DTNB	98 ± 10 μM	750 μM	8.0 ± 0.2

nur eine der zwei Proteinketten vom Molekulargewicht 69,000 Serin am Aminoende, die andere wäre dann blockiert, oder beide Ketten haben diese Aminosäure am N-Terminus. Kumar und Elliott⁷ fanden für das Enzym aus dem *Bungarus*-Gift auch nur eine N-terminale Aminosäure, nämlich Leucin.

TABELLE III

AMINOSÄURENZUSAMMENSETZUNG DER ACETYLCHOLINESTERASE

Aminosäure	<i>Naja naja atra</i> * (mol/100 mol)	<i>Bungarus fasciatus</i> ** (mol/100 mol)
Asparaginsäure	10.5 ± 0.9	11.4
Threonin	4.3 ± 0.2	4.8
Serin	6.4 ± 0.3	6.7
Glutaminsäure	9.8 ± 0.2	9.5
Prolin	8.7 ± 0.4	8.6
Glycin	9.2 ± 0.2	8.6
Alanin	7.4 ± 0.2	7.6
Cystein	1.2 ± 0.2***	0.95
Valin	6.6 ± 0.4	6.7
Methionin	1.5 ± 0.1	1.9
Isoleucin	4.5 ± 0.2	2.9
Leucin	9.5 ± 0.3	10.5
Tyrosin	2.3 ± 0.2	3.8
Phenylalanin	5.0 ± 0.3	5.7
Lysin	4.0 ± 0.4	2.9
Histidin	2.6 ± 0.2	1.9
Arginin	5.9 ± 0.4	5.7
Tryptophan	0.7 [§]	—

* Mittelwerte aus 6 Analysen.

** Nach Kumar und Elliott⁷; auf Molprozent umgerechnet.

*** Als Cysteinsäure nach Perameisensäureoxydation²².

[§] Spektrophotometrisch²³.

Die Ergebnisse der Aminosäurenanalyse stehen in Tabelle III und sind dort den von Kumar und Elliott⁷ bei *Bungarus* erhaltenen Werten gegenübergestellt. Bis auf Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Lysin und Histidin gibt es keine signifikanten Unterschiede.

Der Hydroxyprolinegehalt ist mit $0.024 \pm 0.02\%$ praktisch gleich Null. Das bedeutet, dass die Acetylcholinesterase des Kobragifts keine kollagenähnlichen Strukturen aufweist, wie sie beim Enzym aus elektrischem Organ gefunden wurden³¹.

DANK

Wir danken Frau Edith Schindler und Fräulein Angelika Wozniewski für ihre zuverlässige Mitarbeit. Diese Arbeit wurde durch eine Sachbeihilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

ZUSAMMENFASSUNG

Acetylcholinesterase aus Kobragift wurde durch Chromatographie an CM-Sephadex und Affinitätschromatographie an sepharosegebundenem *m*-[6-(6-Aminocaproylamino)caproylamino]phenyltrimethylammoniumbromid 1160-fach angereichert. Das gereinigte Enzym wurde mit einer spezifischen Aktivität von 5470 U/mg und einer Ausbeute von 89% erhalten. Es hat im nativen Zustand ein Molekulargewicht von 144,000; in Gegenwart von SDS zerfällt es in zwei Untereinheiten vom Molekulargewicht 69,000. Es ist ein Glykoprotein und lässt sich gelelektrophoretisch in sieben, durch isoelektrische Fokussierung in über zehn multiple Formen auftrennen.

LITERATUR

- 1 A. T. Tu, *Venoms, Chemistry and Molecular Biology*, Wiley-Interscience, New York, 1977, pp. 97–103.
- 2 N. K. Iyengar, K. B. Sehra, B. Mukerji und R. N. Chopra, *Curr. Sci.*, 7 (1938) 51.
- 3 C.-C. Yang, W.-C. Chiu und K.-C. Kao, *J. Biochem. (Tokyo)*, 48 (1960) 706.
- 4 L. Brisbois, N. Rabinovitch-Mahler, P. Delori und L. Gillo, *J. Chromatogr.*, 37 (1968) 463.
- 5 J. Simon, L. Brisbois und L. Gillo, *J. Chromatogr.*, 44 (1969) 209.
- 6 E. Siigur, T. Ilomets, T. Sarapuu, M. Lendla und M. Nommets, *Tartu Riikliku Ulik. Toim.*, 332 (1974) 198.
- 7 V. Kumar und W. B. Elliott, *Prep. Biochem.*, 3 (1973) 569.
- 8 V. Kumar und W. B. Elliott, *Eur. J. Biochem.*, 34 (1973) 586.
- 9 G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres, Jr. und R. M. Featherstone, *Biochem. Pharmacol.*, 7 (1961) 88.
- 10 H. Stegemann, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 319 (1960) 64.
- 11 H. Grossmann und M. Liefländer, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 356 (1975) 663.
- 12 C.-C. Yang, *T'ai-wan I Hsueh Hui Tsa Chih.*, 63 (1964) 325.
- 13 H. R. Maurer, *Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, W. de Gruyter, Berlin, New York, 1971.
- 14 K. Lorentz, *Anal. Biochem.*, 76 (1976) 214.
- 15 J. W. Payne, *Biochem. J.*, 135 (1973) 867.
- 16 K. Weber, J. R. Pringle und M. Osborn, *Methods Enzymol.*, 26 (1972) 3.
- 17 B. Dewald, J. T. Dulaney und O. Touster, *Methods Enzymol.*, 32 (1974) 82.
- 18 C. Karlsson, H. Davies, J. Öhman und U.-B. Andersson, *LKB Application Note*, 75 (1973) 6.
- 19 E. Heilbronn, *Acta Chem. Scand.*, 12 (1958) 1879.
- 20 H. Lineweaver und D. Burk, *J. Amer. Chem. Soc.*, 56 (1934) 658.

- 21 M. Dixon, *Biochem. J.*, 55 (1953) 170.
- 22 C. H. Hirs, *Methods Enzymol.*, 11 (1967) 197.
- 23 G. H. Beaven und E. R. Holiday, *Advan. Protein Chem.*, 7 (1952) 319.
- 24 G. Bondjers und S. Björkerud, *Anal. Biochem.*, 52 (1973) 496.
- 25 W. R. Gray, *Methods Enzymol.*, 25 (1972) 121.
- 26 E. Schulze und V. Neuhoff, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 357 (1976) 593.
- 27 H. G. Zimmer, V. Neuhoff und E. Schulze, *J. Chromatogr.*, 124 (1976) 120.
- 28 S.-R. Lee, J. L. Latta und W. B. Elliott, *Comp. Biochem. Physiol.*, 56 C, (1977) 193.
- 29 H. Grossmann und M. Liefänder, *Z. Naturforsch.*, (1979) im Druck.
- 30 L. A. Mounter, *Biochem. J.*, 50 (1952) 122.
- 31 L. Anglister, S. Rogozinski und I. Silman, *FEBS Lett.*, 69 (1976) 129.