

- [18] F. STROHBUSCH & H. ZIMMERMANN, Ber. Bunsenges. physik. Chemie **71**, 567 (1967); M. W. DIETRICH, Anal. Chemistry **38**, 1479 (1966); E. LIPPERT, Ber. Bunsenges. physik. Chemie **67**, 267 (1963).
- [19] D. HADŽI & A. NOVAK, Spectrochim. Acta **18**, 1059 (1962); vgl. auch D. CHAPMAN, D. R. LLOYD & R. H. PRINCE, J. chem. Soc. **1964**, 550.
- [20] M.-L. BLANCHARD, H. STRZELECKA, G. J. MARTIN & M. SIMALTY, Bull. Soc. chim. France **1967**, 2677.
- [21] H. GÄRTNER, J. Oil & Colour Chemist's Association **46**, 13 (1963).
- [22] R. SEKA, H. SEDLATSCHKE & H. PREISSECKER, Mh. Chem. **57**, 86 (1931).
- [23] USP 1963 374 (1929).
- [24] DIN 53 204 (Entwurf Juli 1967).
- [25] DIN 53 415 (Juni 1960).
- [26] H. TOEPFER, Melliand Textilber. **44**, 848 (1963); DIN 54 004 (April 1961).
- [27] DIN 53 388 (Juli 1959).
- [28] SNV 66 202 (Skala 1–8); H. R. SCHWEIZER, «Künstliche org. Farbstoffe und ihre Zwischenprodukte», S. 59, Springer, Heidelberg 1964.
- [29] B. K. MANUKIAN, Helv. **47**, 2211 (1964).

### 137. Physikalisch-chemische, chemische und immunologische Eigenschaften der FDP-Aldolase aus *Drosophila melanogaster*

16. Mitteilung über Aldolasen [1]

von O. Brenner-Holzach und F. Leuthardt

Biochemisches Institut der Universität Zürich

(14. V. 69)

*Summary.* The properties of pure aldolase from pupae of *Drosophila melanogaster* have been studied:

The molecular weight is about 159 000 ( $s_{20,w}^0 = 7.81$  S,  $D_{20,w}^0 = 4.55 \cdot 10^{-7}$ ).

From the frictional ratio  $f/f_0 = 1.236$  the axial ratio for an oblong non hydrated ellipsoid of rotation can be calculated as  $b/a = 4.74$ .

The molecular activity is 2700 for FDP and approximately 200 for F-1-P.

Amino acid analysis shows significant differences between *Drosophila* aldolase and rabbit muscle and liver aldolases, especially in the contents of histidine, glycine, alanine and cysteine.

Hybridization with rabbit brain aldolase gives three new hybrids.

Anti-*Drosophila* aldolase serum (guinea pig) does not precipitate rabbit muscle aldolase (type A) or rabbit brain aldolase (type C) in the OUCHTERLONY test.

Nach früheren Untersuchungen [2] ist die FDP-Aldolase aus Puppen von *Drosophila melanogaster* nach RUTTER's Klassifizierung [3] zu den Aldolasen der Klasse I zu zählen. Ihre enzymatischen Eigenschaften sind denjenigen der Kaninchen-Muskeldolase, welche die Klasse IA bildet [3], sehr ähnlich. Nach weiterer Reinigung der *Drosophila*-Aldolase gelang es uns, sie zu kristallisieren [4]. Mit diesen hochgereinigten Präparaten, die meist eine spezifische Aktivität von 1700–1800 BÜCHER-Einheiten/mg Protein (= 15,5–16,5 internationale Einheiten) besaßen, führten wir in der Folge Versuche zur Ermittlung ihrer physikalisch-chemischen, chemischen und immunologischen Eigenschaften durch.

1. *Bestimmung von Sedimentations- und Diffusionskoeffizienten und Berechnung des Molekulargewichtes und der Achsenverhältnisse.* Die nach der beschriebenen

Methode [4] erhaltene Aldolase aus Puppen von *Drosophila melanogaster* zeigt bei der Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten in der Ultrazentrifuge<sup>1)</sup> nur *einen* symmetrischen Gipfel (siehe Fig. 1).

Fig. 2 zeigt die Abhängigkeit der apparenten Sedimentationskonstanten ( $s_{app}$ ) von der Konzentration. Extrapoliert man die erhaltenen  $s_{app}$  auf die Konzentration null, so ergibt sich ein  $s_{5^\circ, LM}^0$  von 4,98 S. Nach der Formel von SVEDBERG & PEDERSEN [5] errechnet sich daraus die auf Standardbedingungen reduzierte Sedi-

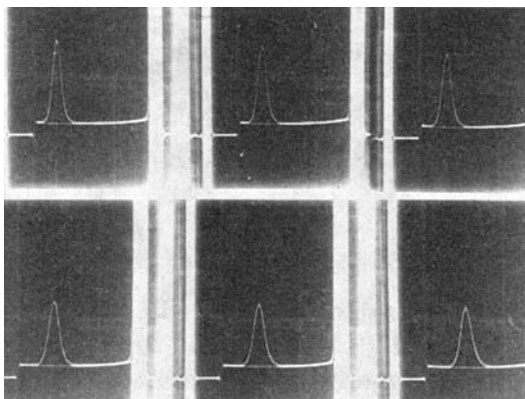


Fig. 1. Sedimentationsdiagramm einer Aldolase aus *Drosophila*-Puppen

Bedingungen: Tourenzahl 42040 rpm, Temperatur 5°, Lösungsmittel 0,4 M Trispuffer. Aufnahmen obere Reihe von links nach rechts 32, 40 und 48 Min. nach Versuchsbeginn, untere Reihe von links nach rechts 80, 88 und 96 Min. nach Versuchsbeginn.

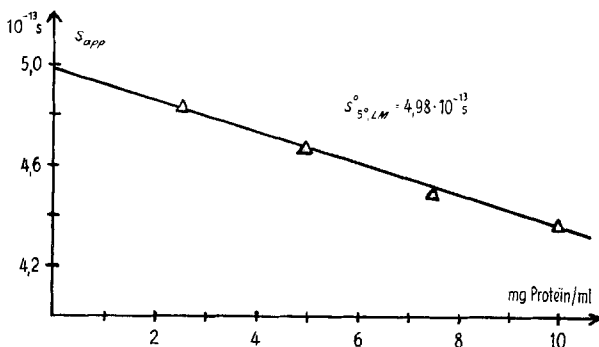


Fig. 2. Apparente Sedimentationskonstanten von *Drosophila*-Aldolase in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration

Versuchstemperatur 5°, Lösungsmittel 0,4 M Trispuffer pH 7,4.

mentationskonstante  $s_{20,w}^0$ . Das bei dieser Umrechnung nötige partielle spezifische Volumen der *Drosophila*-Aldolase berechneten wir aus ihrer prozentualen Aminosäurezusammensetzung (siehe Abschnitt 3) nach COHN & EDSALL [6] zu 0,739 bei 20°;

<sup>1)</sup> Die Messungen an der Ultrazentrifuge wurden an unserm Institut von Herrn A. SCHMID durchgeführt, dem wir an dieser Stelle bestens danken.

das partielle spezifische Volumen bei 5° wurde erhalten durch Subtraktion von 0,005 pro Grad (GREENBERG [7]), was einen Wert von 0,7315 ergab. Die Dichten und Viscositäten des Lösungsmittels wurden mittels Pyknometer und OSTWALD-Viskosimeter bestimmt.

Die auf Standardbedingungen reduzierte Sedimentationskonstante der *Drosophila*-Aldolase beträgt:  $s_{20,w}^0 = 7,81$  S. Sie ist von der Grössenordnung der von verschiedenen Autoren angegebenen Sedimentationskonstanten für Muskel- und Leberaldolase (Kaninchen-Muskellaldolase 7,35 S, Kaninchen-Leberaldolase B<sub>1</sub> 7,49 S und B<sub>2</sub> 7,56 S (RUTTER [8]), Kaninchen-Leberaldolase 7,8 S (CHRISTEN *et al.* [9]), Rinder-Leberaldolase 8,87 S (bei 25°, PEANASKY & LARDY [10])).

Diffusionsmessungen, ebenfalls bei 5° durchgeführt, ergaben nach der Flächenmethode einen Koeffizienten  $D_{5^\circ,LM}^0 = 2,71 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ . Eine Konzentrationsabhängigkeit des apparenten Diffusionskoeffizienten liess sich nicht nachweisen.

Die Umrechnung der Diffusionskonstanten auf Standardbedingungen nach der STOKES-EINSTEIN'schen Formel [11] ergab  $D_{20,w}^0 = 4,56 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ .

Die Berechnung des Molekulargewichtes erfolgte aus Sedimentations- und Diffusionskonstanten nach der Formel von SVEDBERG

$$M_{S,D} = \frac{h \cdot T \cdot s_0}{D_0 (1 - \bar{V}_0 \rho)}$$

Sie ergab ein Molekulargewicht von 159000 für die *Drosophila*-Aldolase. Dieser Wert stimmt in der Grössenordnung ebenfalls mit dem Molekulargewicht der andern erwähnten Aldolase überein. Zum Vergleich wurde eine Molekulargewichtsbestimmung nach DETERMANN & MICHEL [12] an Sephadex G 200 durchgeführt. Wir erhielten damit ein Molekulargewicht in der Grössenordnung von 145000–160000.

Das Achsenverhältnis der durch ein Rotationsellipsoid approximierten Aldolase-molekel lässt sich aus dem Dissymmetriefaktor, d.h. dem Verhältnis des realen zum idealen Reibungskoeffizienten (frictional ratio)  $f/f_0$  berechnen [13].

Wenn der Dissymmetriefaktor  $f/f_0 = 1$  ist, so handelt es sich um eine Substanz mit kompakten Kugelmolekeln ohne Hydratation. Wird  $f/f_0 > 1$ , so ist die Molekel asymmetrisch oder hydratisiert, oder es liegt eine Kombination beider Eigenschaften vor. Wir erhielten einen Dissymmetriefaktor von 1,236. Dies ergibt nach SVEDBERG & PEDERSEN [14] für ein gestrecktes, nicht hydratisiertes Rotationsellipsoid (Stäbchen) ein Achsenverhältnis von  $b/a = 4,74$  ( $b$  = lange Achse,  $a$  = kurze Achse), für ein abgeplattetes, nicht hydratisiertes Rotationsellipsoid (Scheibe) ein Achsenverhältnis von  $a/b = 5,22$ .

Aus den Kurven von ONCLEY [15] lassen sich bei gegebenem Dissymmetriefaktor die einem bestimmten Hydratationsgrad entsprechenden Achsenverhältnisse entnehmen. Bei Annahme einer Kugelmolekel ergibt ein Dissymmetriefaktor von 1,236 eine Hydratation von 0,65 g H<sub>2</sub>O pro g Protein. Zwischen den Grenzfällen der hydratisierten Kugelmolekel und den unhydratisierten *Rotationsellipsoiden* (gestreckt und abgeplattet) sind alle Übergänge möglich. In Tabelle 1 sind die Daten für die Grenzfälle sowie zwei Beispiele von Kombination von Asymmetrie und Hydratation bei gegebenem Dissymmetriefaktor zusammengestellt.

Das Volumen der unhydratisierten *Drosophila*-Aldolase-Molekel berechnet sich nach der Formel

$$V = \frac{M \cdot \bar{V}}{N_L} \text{ zu } 1,952 \cdot 10^{-7} \mu\text{m}^3.$$

( $V$  = Volumen,  $M$  = Molekulargewicht,  $\bar{V}$  = partielles spez. Volumen,  $N_L$  = LOSCHMIDT'sche Zahl). Bei Annahme einer Kugelform ergibt dies einen Radius von 36 Å. Für ein unhydratisiertes gestrecktes Rotationsellipsoid mit dem Inhalt  $1,952 \mu\text{m}^3$  und dem Achsenverhältnis  $a:b = 1:4,74$  erhalten wir für die Länge der kleinen Achse 43 Å, für die grosse Achse 203 Å. Das abgeplattete Rotationsellipsoid mit demselben Inhalt ergäbe Achsen von 24 Å und 124 Å.

Tabelle 1. Aus dem Dissymmetriefaktor berechnete Achsenverhältnisse der *Drosophila*-Aldolase

Modell (für Dissymmetriefaktor 1,236)	Hydratation der Grenzfälle (g H <sub>2</sub> O/g Prot.)	Achsenverhältnis der Grenzfälle ( $a:b$ )	Achsenverhältnis bei Hydratation von		Achsenlänge in Å	
			0,2	0,5	$a$	$b$
gestrecktes Rotationsellipsoid (Stäbchen)	0	1:4,74 = 0,211	0,29	0,52	43	203
abgeplattetes Rotationsellipsoid (Scheibe)	0	5,22:1 = 5,22	3,4	1,8	124	24
Kugelmolekel	0,65	1			72*)	

\*) Durchmesser

2. *Wechselzahl*. Die Wechselzahl kann aus der spezifischen Aktivität und dem Molekulargewicht errechnet werden. Wir erhalten daraus für die *Drosophila*-Aldolase gegen FDP den Wert von 2700. Es ist dies ein Mittelwert der verschiedenen Präparate, deren Wechselzahlen innerhalb von ca. 7% schwanken.

Die spezifische Aktivität der *Drosophila*-Aldolase gegen F-1-P ist ungefähr 10–15mal kleiner als gegen FDP [2]; wir erhalten eine Wechselzahl in der Grössenordnung um 200.

3. *Aminosäurezusammensetzung*. Zur Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung<sup>2)</sup> wurde in 6N HCl während 24 und 72 h hydrolysiert und im Aminosäureanalysator nach MOORE & STEIN [16] aufgetrennt. Aus der prozentualen Zusammensetzung wurde nach folgender Formel die Anzahl der einzelnen Aminosäuren (AS) in der Fermentmolekel berechnet:

$$\text{Anzahl AS} = \frac{\% \text{ AS} \times \text{Mol. Gew. Protein}}{\text{Mol. Gew. (AS-H}_2\text{O)}}$$

Die Tabelle 2 gibt eine Zusammenstellung der erhaltenen Resultate, sowie die von RUTTER [8] angegebenen Werte für Kaninchen-Muskel- und -Leber- Aldolase als Vergleich. Die Werte für Tryptophan wurden nicht experimentell bestimmt. Da es sich um eine prozentual gering vertretene Aminosäure handelt, verwendeten wir den Mittelwert der von RUTTER für Kaninchen-Aldolasen angegebenen Anzahl Tryptophanmolekeln.

<sup>2)</sup> Herrn Dr. HUMBEL danken wir bestens für die Aminosäureanalyse.

Tabelle 2. *Aminosäurezusammensetzung der Drosophila-Aldolase*  
 Als Vergleich die der Literatur entnommenen Werte von Kaninchen-Muskelaldolase (MALD) und  
 Kaninchen-Leberaldolase (LALD)

Aminosäure	<i>Drosophila</i> -Aldolase		MALD	LALD
	%	Anzahl <sup>d)</sup>	Anzahl <sup>d)</sup>	Anzahl <sup>d)</sup>
Lysin	7,71	96	112	108
Histidin	1,39	16	42	39
Arginin	4,34	44	62	63
Asparaginsäure	9,90	137	104	136
Threonin	5,67 <sup>a)</sup>	89	74	75
Serin	5,17 <sup>a)</sup>	94	69	62
Glutaminsäure	11,67	144	147	167
Prolin	4,45	73	72	59
Glycin	8,09	226	108	113
Alanin	11,96	268	143	139
Cystein	0,56 <sup>b)</sup>	9	29	(30)
Valin	6,95	112	83	91
Methionin	0,70	8	12	19
Isoleucin	5,02	71	77	73
Leucin	9,72	137	129	130
Tyrosin	2,96	29	41	37
Phenylalanin	2,64	28	27	42
Tryptophan	1,46 <sup>c)</sup>	12	11	14

<sup>a)</sup> Extrapoliert auf Zeit null.

<sup>b)</sup> Nur Werte von zwei 24<sup>h</sup>-Hydrolysen.

<sup>c)</sup> Mittelwert von MALD und LALD.

<sup>d)</sup> Aminosäureste pro Aldolasemolekel



Fig. 3a. «Disc»-Elektrophorese  
 von *Drosophila*-Aldolase an  
 7,5-proz. Polyacrylamid-Gel  
 Proteinmenge: 30  $\gamma$



Fig. 3b. «Disc»-Elektrophorese  
 von *Drosophila*-Aldolase in 8 M  
 Harnstoff (4,8-proz. Polyacry-  
 lamid-Gel) Proteinmenge: 70  $\gamma$

Ein auffallender Unterschied zwischen Insekten- und Kaninchenaldolase zeigte sich im Gehalt von Histidin, Glykokoll, Alanin und Cystein. Vorversuche mit der Ionen-Fokussierung ergaben einen wesentlich tiefer gelegenen Isoelektrischen Punkt der *Drosophila*-Aldolase gegenüber den Kaninchen-Muskel- und -Leber-Aldolasen. Tatsächlich liegen bei der *Drosophila*-Aldolase die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin in wesentlich kleinerer Menge vor.

4. «Disc»-Elektrophorese. Bei der Aufarbeitung der Aldolasen wurde zur Kontrolle der Reinheit die «disc»-Elektrophorese an 7,5-proz. Polyacrylamid-Gel [17] angewandt. Die Aldolasen wurden als genügend rein betrachtet, wenn bei einer Menge von ca. 20–40  $\gamma$  Protein keine oder nur Spuren anderer Banden neben der Aldolase-Bande auftraten (siehe Fig. 3a). Die «disc»-Elektrophorese einer *Drosophila*-Aldolase in 8M Harnstoff [18] zeigte zwei weitere, ziemlich starke Banden. Es könnte sich dabei um Oligomere der Untereinheiten handeln (siehe Fig. 3b).

5. Zonenelektrophorese an Celluloseacetat. Bei der Zonenelektrophorese an Celluloseacetatfolie nach PENHOET [19] blieb die *Drosophila*-Aldolase bei pH 8,6 in der Nähe der Startlinie, leicht nach der kathodischen Seite verschoben. Sie zeigt in diesem Verhalten Ähnlichkeit mit der Kaninchen-Muskelaldolase, die ebenfalls leicht kathodisch wandert. Wir konnten bei unsern reinen Aldolasen immer nur *eine* Bande nachweisen.

6. Hybridisierungsversuche. Wenn wir die *Drosophila*-Aldolase nach PENHOET [19] unter Bedingungen halten, unter denen eine Dissoziation in Untereinheiten und hernach eine Reassoziierung derselben erfolgt, so lassen sich bei der Elektrophorese an Cellulose-Acetat und nachfolgender Aktivfärbung keine Veränderungen feststellen. Es besteht vor und nach Behandlung eine einzige Bande, die praktisch auf der Startlinie liegt (siehe Fig. 4).

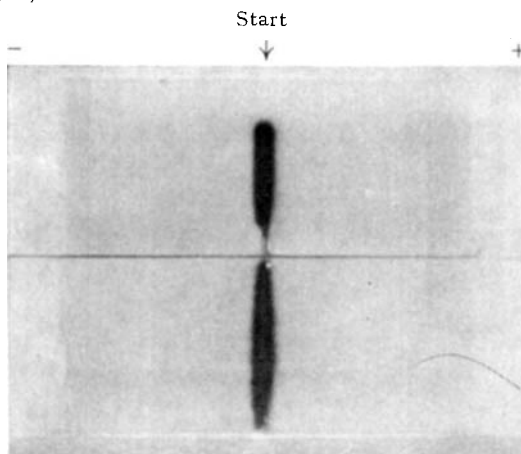


Fig. 4. Elektrophorese von *Drosophila*-Aldolase an Celluloseacetat-Folie

Unterer Streifen native Aldolase, oberer Streifen Aldolase nach Dissoziation bei pH 2 und Reassoziierung. Aktivfärbung.

Ein Hybridisierungsversuch mit Kaninchen-Muskelaldolase ergab keine deutbaren Resultate, da die beiden Aldolasen in ihren elektrophoretischen Eigenschaften auf

Celluloseacetat zu ähnlich sind. Wird aber mit Kaninchen-Hirnextrakt oder gereinigter C-Aldolase hybridisiert, so erhält man ausser den Banden für *Drosophila*-Aldolase und Aldolase C drei Hybride (siehe Fig. 5). Dies ist neben den Beobachtungen bei der

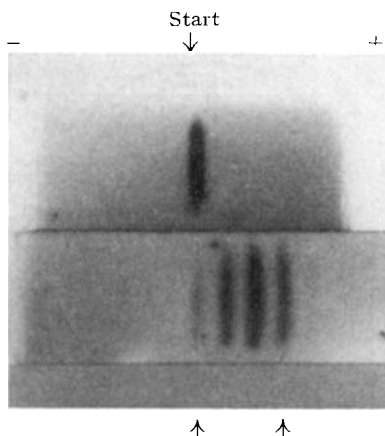


Fig. 5. Elektrophorese an Cellulose-Acetat-Folie

Oberer Streifen: Native *Drosophila*-Aldolase. Unterer Streifen: Bild nach Hybridisierung von *Drosophila*-Aldolase mit Kaninchen-C-Aldolase. Aktivfärbung.

«disc»-Elektrophorese, sowie bei der Sedimentation in der Ultrazentrifuge, wo in Gegenwart von 4M Harnstoff eine Sedimentationskonstante  $s_{50, LM}$  von nur noch  $0,7 \cdot 10^{-13}$  s erhalten wurde [2], ein weiterer Beweis, dass auch die *Drosophila*-Aldolase aus Untereinheiten besteht.

7. Immunologische Versuche<sup>3)</sup>. Meerschweinchen wurden durch intracutane Injektion von *Drosophila*-Aldolase immunisiert. Das Antiserum zeigte sowohl mit

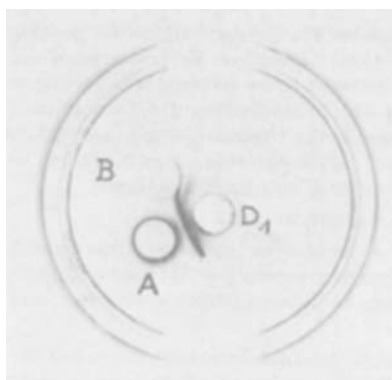


Fig. 6a. OUCHTERLONY-Test mit gereinigter *Drosophila*-Aldolase

Zentrum: *Drosophila*-Aldolase-Antiserum von Meerschweinchen Nr. 1

A: *Drosophila*-Aldolase (an DEAE Sephadex A 50 und Sephadex G 200 gereinigt)

B: Hybride von *Drosophila*-Aldolase mit Kaninchen-Hirnalldolase

<sup>3)</sup> Herrn Prof. J. LINDENMANN möchten wir für seine Ratschläge bei der Durchführung dieser Versuche bestens danken.

gereinigter Aldolase als auch mit dem Rohenzym (nach der Ammoniumsulfatfraktionierung [4]) im OUCHTERLONY-Test eine Präzipitation (siehe Fig. 6a und 6b). Es ergab sich auch mit Rohaldolase nur eine Präzipitationslinie. Die zur Immunisierung verwendeten Aldolase-Präparationen waren also auch immunologisch rein.

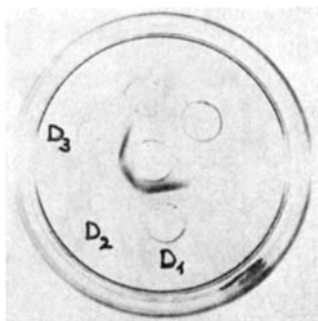


Fig. 6b. OUCHTERLONY-Test mit *Drosophila*-Rohaldolase

Zentrum: *Drosophila*-Rohaldolase

D<sub>1</sub>–D<sub>3</sub>: *Drosophila*-Aldolase-Antiserum von Meerschweinchen Nr. 1–3

Gegen Kaninchen-Muskeldolase sowie gegen Kaninchen-C-Aldolase konnte mit *Drosophila*-Aldolase-Antiserum keine Präzipitation erhalten werden.

Wie wir gesehen haben [2], gleichen sich die *Drosophila*-Aldolase und die Kaninchen-Muskeldolase in ihrer Substratspezifität und ihrem Verhalten gegen Carboxypeptidase. Auf Grund der beträchtlichen Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung der beiden Aldolasen sind aber die Ergebnisse der immunologischen Versuche ohne weiteres verständlich.

#### Experimentelles. – 1. Zucht der *Drosophilas* (siehe [4]).

2. *Reinigung der Aldolase* (siehe [4]). Die Aktivitäten der gereinigten Aldolasen konnten gegenüber den Beschreibungen in [4] mit denselben Methoden noch weiter gesteigert werden. Reinigungsversuche an P-Cellulose lieferten keine Aktivitätssteigerung mehr, es trat im Gegenteil ein Verlust an Aktivität auf. Da die Kristallisation der *Drosophila*-Aldolase, wie beschrieben [4], äusserst langsam erfolgt und keine Aktivitätssteigerung mehr brachte, wurden sämtliche hier beschriebenen Versuche mit den Aldolaselösungen durchgeführt, wie sie von der Reinigung an Sephadex G 200 und nachfolgender Ultrafiltration anfielen.

#### 3. Bestimmung der Aldolase-Aktivität (siehe [2]).

4. *Bestimmung der Proteinkonzentration* (siehe [2]). Eine neuerdings durchgeführte Reihe von Bestimmungen des Proteingehaltes an gereinigter Aldolase mittels Biuret und Absorptionsmessung bei 280 nm ergab, im Gegensatz zu unseren früheren Angaben, einen Umrechnungsfaktor von 1, d.h.  $E_{280} = 1$  mg Protein/ml.

5. Die *Sedimentations- und Diffusionskonstanten* wurden mit der analytischen Ultrazentrifuge SPINCO, Modell E (Rotor AND, Phasenplatte als Schlierenanalysator, RALEIGH-Optik) bestimmt. Alle Messungen wurden bei 5° in 0,4 M Trispuffer pH 7,4 bei einer Tourenzahl von 42040 durchgeführt. Die höhere Pufferkonzentration gegenüber früher wurde gewählt, weil die *Drosophila*-Aldolase darin stabiler ist.

6. Die *Aminosäureanalyse* erfolgte nach Hydrolyse des Enzyms während 24 und 72 Std. in 6 N HCl im Aminosäure-Analysator nach SPACKMAN, STEIN & MOORE [16]. Die in Tabelle 2 angegebenen Zahlen sind Mittelwerte von 4 Bestimmungen. Threonin und Serin wurden auf die Zeit null extrapoliert.



7. Die «*Disc*»-Elektrophorese mit nativer Aldolase wurde an einem 7,5-proz. Polyacrylamid-Gel nach DAVIS [17] durchgeführt. Die Elektrophorese in 8 M Harnstoff erfolgte nach CHAN *et al.* [18]; es wurde dabei sämtlichen Bestandteilen soviel Harnstoff zugegeben, dass die Endkonzentration 8 M war. Das Gel wird nach den zitierten Autoren auf diese Weise 4,8-prozentig.

8. Die Elektrophorese an Cellulose-Acetat-Folien ( $2,5 \times 17 \text{ cm}^2$ , GELMAN) wurde in 0,06 M Barbitallpuffer pH 8,6 (mit  $10^{-2}$  M Mercaptoäthanol und  $10^{-3}$  M Komplexon) bei 8–10 m Amp. und ca. 40–45 Min. Laufzeit durchgeführt. Aufgetragene Menge: ca. 0,5–2 BÜCHER-Einheiten. Nachweis der Banden mit Aldolaseaktivität nach CHRISTEN *et al.* [20].

9. Die Dissoziation der Aldolase in Untereinheiten und Reassoziierung derselben führten wir nach PENHOET [19] durch: Es wurde das pH der Aldolaselösung (4 mg Aldolase in 4 ml 0,01 M Tris-puffer pH 7,5) mit 1 N  $\text{H}_3\text{PO}_4$  auf 2 gebracht und 30 Min. so belassen. Dabei erfolgt eine Aufspaltung der Aldolase in ihre Untereinheiten. Nach rascher Verdünnung auf ca. das 20fache Volumen und Rückführen des pH mit 1 M Trislösung auf 7,5 kommt es zu einer Reassoziierung der Untereinheiten. Es konnte bei den Versuchen mit gereinigten Aldolasen jeweils noch ca. die Hälfte der ursprünglichen Aktivität gefunden werden; mit den Hirn-Rohextrakten war die wiedergefundene Aktivität nur um 10%.

10. Für die Immunisierung der Meerschweinchen wurde eine Suspension gleicher Volumina komplettes FREUND'sches Adjuvans und Aldolaselösung (in einer Konzentration von 10 mg/ml) intracutan gespritzt, d.h. es wurden pro Meerschweinchen gleichzeitig 5–6 Injektionen mit ca. 0,1–0,15 ml Gemisch verteilt in die Rückenhaut appliziert. Nach 14 Tagen erfolgte eine zweite gleiche Injektionsserie. Nach weiteren 8 Tagen wurde probeweise durch Herzpunktion Blut entnommen. Es waren nach dieser Zeit alle Meerschweinchen bereits immunisiert. Dies wurde mittels OUCHTERLONY-Test nachgewiesen.

Dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG sind wir für die Unterstützung dieser Arbeit sehr verbunden. Frau M. LEHMANN-BARTH und Frau C. KLOTER-WÜRSCH danken wir für ihren Einsatz bei der Durchführung der Versuche bestens. Ferner möchten wir auch Frl. U. MÜLLER und Herrn Dr. C. BALLY für ihre Mithilfe bei gewissen Versuchen unseren Dank aussprechen.

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 15. Mitteilung: R. HOTZ & F. LEUTHARDT, *Helv.* 51, 1305 (1968).
- [2] O. BRENNER-HOLZACH & F. LEUTHARDT, *Helv.* 50, 1366 (1967).
- [3] W. J. RUTTER, *Fed. Proc.* 23, 1248 (1964).
- [4] O. BRENNER-HOLZACH & F. LEUTHARDT, *Helv.* 51, 1130 (1968).
- [5] a) T. SVEDBERG & K. O. PEDERSEN, «The Ultracentrifuge», S. 35, Oxford University Press, Oxford, 1940; b) H. G. ELIAS, «Ultrazentrifugenmethoden», S. 81, Beckman Instruments GmbH München 1961.
- [6] E. J. COHN & J. T. EDSALL, «Proteins, Amino Acids and Peptides», S. 375, Haffner Publishing Company, New York 1943.
- [7] D. M. GREENBERG, «Amino Acids and Proteins», S. 388, Charles C. Thomas Publisher, Springfield 1951.
- [8] W. J. RUTTER, B. M. WOODFIN, R. E. BLOSTEIN, *Scand. chem. Acta* 17, 226 (1963).
- [9] PH. CHRISTEN, H. GÖSCHKE, F. LEUTHARDT & A. SCHMID, *Helv.* 48, 1050 (1965).
- [10] R. J. PEANASKY & H. A. LARDY, *J. biol. Chemistry* 233, 365, 371 (1958).
- [11] H. G. ELIAS, in [5] b zitiertes Werk, S. 109.
- [12] H. DETERMANN & W. MICHEL, *J. Chromatogr.* 25, 303 (1966).
- [13] E. J. COHN & J. T. EDSALL, in [6] zitiertes Werk, S. 404 ff.; D. M. GREENBERG, in [7] zitiertes Werk, S. 391; T. SVEDBERG & K. O. PEDERSEN, in [5] a zitiertes Werk, S. 38 ff.
- [14] T. SVEDBERG & K. O. PEDERSEN, in [5] a zitiertes Werk, S. 41/42.
- [15] E. J. COHN & J. T. EDSALL, in [6] zitiertes Werk, S. 425.
- [16] D. H. SPACKMAN, W. H. STEIN & S. MOORE, *Anal. Chemistry* 30, 1190 (1958).
- [17] B. J. DAVIS, *Ann. New York Acad. Sci.* 121, 404 (1964).
- [18] W. CHAN, D. E. MORSE, B. L. HORECKER, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 57, 1013 (1967).
- [19] E. PENHOET, M. KOCHMAN, R. VALENTINE, W. J. RUTTER, *Biochemistry* 6, 2940 (1967).
- [20] PH. CHRISTEN, U. RENSING, A. SCHMID & F. LEUTHARDT, *Helv.* 49, 1872 (1966).