Literatur

1. Doss, M., J. Chromatog. 30, 265 (1967). — 2. Doss, M. und W. MANNHEIM, diese Z. 5, 260 (1967). — 3. GOLDRICK, B. und J. HIRSCH, J. Lipid Res. 4, 482 (1963). — 4. FALK, J. E., Porphyrins and Metalloporphyrins, Elsevier, Amsterdam-London-New York (1964). — 5. BURT, N. S. und R. J. ROSSITER, Biochem. J. 46, 596 (1950). — 6. Doss, M. und U. BODE, J. Chromatog. 35, 248 (1968). — 7. Doss, M. und K. OETTE, diese Z. 3, 125 (1965). — 8. OETTE, K. und M. Doss, J. Chromatog. 32, 439 (1968). — 9. WAYS, P. und D. J. HANAHAN, J. Lipid Res. 5, 324 (1964). — 10. Doss, M. und H. BÜRGER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348, 936 (1967). — 11. KLENK, E. und M. Doss, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 342, 187 (1965). — 12. WRANNE, L., Acta paediatr. 49, Suppl. 124 (1960). — 13. GRINSTEIN, M. und M. M. WINTROBE, J. biol. Chemistry 172, 459 (1948). — 14. RIMINGTON, C., P. N. MORGAN, K. NICHOLLS, J. D. EVERALL und R. R. DAVIS, Lancet 1963/II, 318. — 15. SCHWARTZ, S. und H. M. WIKOFF, J. biol. Chemistry 194, 563 (1952). — 16. HEILMEYER, L., R. CLOTTEN und L. HEILMEYER jr., Die Störungen der Bluthämsynthese mit besonderer Berücksichtigung der sideroachrestischen Anämien und erythropoetischen Porphyrinen, Georg Thieme, Stuttgart (1964). — 17. WATSON, C. J., M. GRINSTEIN und V. HAWKINSON, J. clin. Invest. 23, 69 (1944). — 18. WATSON, C. J., Arch. Int. Med. Chicago 86, 797 (1950). — 19. Doss, M., Dtsch. med. Wschr., im Druck. — 20. RICHTERICH, R., Klinische Chemie, Akademische Verlagsgesellschaft Frankfurt a. M. (1965). — 21. ADAM, J., Einführung in die medizinische Statistik. S. 213. VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin (1966). — 22. KREYSZIG, E., Statistische Methoden und ihre Anwendung, S. 228. Vandenhoeck & Ruprecht, Göttingen (1965). — 23. VAN DEN BERGH, A. A. H. und W. GROTEPASS, Klin. Wschr. 12, 586 (1933). — 24. BRUGSCH, J., Porphyrine, S. 171. Johann Ambrosius Barth, Leipzig (1959). — 25. LAGEDER, K., Klin. Wschr. 15, 296 (1936). — 26. SCHÜMM, C., Zschr. exper. Med. 106, 252 (1939). — 27. SEGGER, K. A., Erg. inn. Med. 58, 582 (1940). — 28. CARTWRIGHT, G. E., C. M. HUGULEY, H. ASHENBRUCKER, J. FAX und M. M. WINTROBE, Blood 3, 501 (1948). — 29. BÉNARD, H., A. GAJDOS und J. CANIVET, Sang. Paris 20, 289 (1949). — 30. WARD, E. und H. L. MASON, J. clin. Invest. 29, 905 (1950). — 31. VENTURA, S. und D. MEDURI, Haematologica Pavia 38, 747 (1954a). — 32. KOSKELO, P., Ann. med. int. Fenniae 48, 55 (1959). — 33. JEFFREY, N. R. und D. WATSON, Acta haemat. 12, 169 (1954). — 34. MEDURI, D., A. NOTARIO und G. CASIROLA, Haematologica Pavia 43, 1213 (1958). — 35. KRAMMER, A., C. E. CARTWRIGHT und M. M. WINTROBE, Blood 9, 183 (1954). — 36. SCHWARTZ, S., M. H. BERG, J. BOSSENMAIER und H. DINSMORE, Determination of porphyrins in biological material. In: Methods of Biochemical Analysis, S. 221. Vol. VIII. ed. by D. Glick, Interscience, New York (1960). — 37. Jarlikowa, E. I., R. I. Jewstignejewa und W. N. Lusgina, Laborat. Djelo 11, 169 (1954). — 38. GUTNIAK, O., H. KOZIDOWA und E. KOWALSKI, Lancet 1964/I, 1137. — 39. GAJDOS, A., M. GAJDOS-TORÖK, J. M. MANTZ und H. SCHIRADIN, Presse méd. Paris 73, 119 (1965). — 40. LYNCH, P. J. und L. J. MIEDLER, Arch. Dermat. Syph. 89, 104 (1964).

Dr. M. Doss
355 Marburg (Lahn)
Pilgrimstein 2

Isoenzymfraktionen der Fructose-Phosphat-Aldolase¹⁾ im Serum und verschiedenen Organen des Menschen

Isoenzyme der Fructose-Phosphat-Aldolase, I. Mitteilung

Von A. L. DIKOW

*Aus der Biochemischen Abteilung des Wissenschaftlichen Forschungsinstituts für Onkologie
(Direktor: Prof. Dr. N. Antschew) Sofia, Bulgarien*

(Eingegangen am 1. Dezember 1967)

In der vorliegenden Mitteilung wird ein Verfahren beschrieben, mit dem die Isoenzyme der Fructose-Phosphat-Aldolase¹⁾ in Serum und Organen des Menschen durch Agarosegelelektrophorese und darauffolgende Inkubation mit Substratlösung getrennt und spezifisch nachgewiesen werden können. Nach der Elektrophorese wird das Gel bei 37° in einer Lösung von FDP, Natrium arsenat, NAD, GAP-DH, Diaphorase und NBT inkubiert. Es wurden vier Isoenzymfraktionen der ALD im Serum gesunder Probanden gefunden, und zwar von der Anode zur Kathode hin als I, II, III und IV bezeichnet. Sie befinden sich dementsprechend in den Zonen der Albumine, α_2 -, β_2 - und γ -Globuline des Serums. Nach Berechnung der quantitativen Werte der einzelnen Isoenzymfraktionen wurden die Ergebnisse einer statistischen Bearbeitung unterworfen und Mittelwert, Standardabweichung und mit der Methode der Perzentile auch die Normalwerte der Isoenzyme der ALD im Serum berechnet. Bei verschiedenen Krankheiten steigt ihre Zahl auf 8. In normalen Organen wurden 10 Isoenzymfraktionen beobachtet.

¹⁾ *Abkürzungen und Enzyme:* Aldolasen: ALD = Aldolase, MALD = Muskelaldolase, LALD = Leberaldolase, Aldolase „A“ = Fructose-1,6-diphosphat D-Glycerinaldehyd-3-phosphat Lyase (EC 4.1.2.13), Aldolase „B“ = Ketose-1-phosphat Aldehyd Lyase (EC 4.1.2.7), GAP-DH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase = D-Glycerinaldehyd-3-phosphat: NAD Oxydoreduktase (phos-

phorylierend) (EC 1.2.1.12), Diaphorase (NAD-H₂: Lipoamid Oxydoreduktase EC 1.6.4.3), FDP = Fructose-1,6-diphosphat, FMP = Fructose-1-phosphat, GAP = Glycerinaldehyd-3-phosphat, DAP = Dihydroxyacetonphosphat, NBT = Nitroblau-Tetrazolium.

The isoenzymes of fructose phosphate aldolase in human serum and organs

A method is described for the separation of the isoenzymes of the fructose phosphate aldolases¹⁾ in human serum and organs by agarose electrophoresis, followed by their specific identification by incubation with solutions of substrate. After electrophoresis the gel is incubated at 37° in a solution containing FDP, sodium arsenate, NAD, GAP-DH, diaphorase and NBT. Four isoenzyme fractions of ALD were found in the serum of healthy probands; labelling from the anode to the cathode, they were designated I, II, III, IV. They migrate in the same regions as the albumins and α_2 , β_2 - and γ -globulins respectively. The quantity of each isoenzyme fraction was calculated, and the results were treated statistically; the average value and the standard deviation were calculated, and, using the "percentil" method, the normal values for the isoenzymes of serum ALD were determined.

In certain illnesses, the number of serum isoenzymes increased to 8, while 10 isoenzyme fractions were observed in normal organs.

In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Arbeiten über die Isoenzyme der Aldolase bei Menschen und Tieren veröffentlicht. Manche Verfasser (1—6) stellten mittels elektrophoretischer Auftrennung fest, daß die Aldolase in drei Grundformen vorkommt: Aldolase A, B und C. Diese unterscheiden sich nicht nur in ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit, sondern auch in ihren immunologischen und kinetischen Eigenschaften. Durch Dissoziation bei pH 2 und Reassoziierung lassen sich aus je zweien dieser Grundformen je drei Hybride herstellen, deren Eigenschaften sich von denen der Grundformen unterscheiden (3). Das Enzym besteht aus vier Untereinheiten, d. h. ist ein Tetramer (6). Das erklärt die Kombinationsmöglichkeiten der Untereinheiten der drei Grundformen der Aldolase, infolge welcher zwölf theoretisch mögliche Isoenzyme resultieren.

Von den theoretisch möglichen zwölf Isoenzymfraktionen der Aldolase weisen obige Autoren neun Fraktionen in den Organen von Menschen, Ratten, Kaninchen und Fröschen nach. Dabei fällt auf, daß kaum Untersuchungen über Isoenzyme der Serumaldolase vorliegen, mit Ausnahme jener mittels präparativer Elektrophorese auf Stärkeblock (7) und mittels „Large Scale Continuous Flow“-Elektrophorese (8).

Bei der großen Zahl der Isoenzymfraktionen in den Organen ist die Erforschung des Isoenzymmusters der ALD im Serum von gesunden und kranken Menschen von großem Interesse. Bisherige Untersuchungen auf diesem Gebiet mit präparativer Stärkeblock-Elektrophorese (7) haben Aldolaseaktivitäten im Bereich der β - und γ -Globuline des Serums nachgewiesen. Mit kontinuierlicher präparativer Elektrophorese (8) ist Aldolaseaktivität in allen sechs elektrophoretischen Fraktionen nachgewiesen worden.

In der vorliegenden Arbeit haben wir uns die Aufgabe gestellt, das Isoenzymmuster der Aldolase im Serum von gesunden Menschen quantitativ und qualitativ zu untersuchen. Wir verwenden dazu die Zonen-Elektrophorese und die von uns vorgeschlagene Methode zur Lokalisierung der Aldolaseaktivität. Die festgestellten Normalwerte der ALD-Isoenzyme im Serum werden künftig als Grundlage für Untersuchungen der ALD-Isoenzyme bei Erkrankungen dienen, in deren Verlauf die ALD im Serum pathologische Werte zeigt, z. B. Hepatitis epidemica, Dystrophia musculorum progressiva, Myokardinfarkt und primäres Leberkarzinom. Ferner erörtern wir die Isoenzymmuster der ALD, die aus dem Serum kranker Menschen, sowie von den Organen gesunder Menschen gewonnen wurden.

Die moderne methodische Entwicklung auf diesem Gebiet beginnt mit der Einführung der Methode über den Nachweis der ALD von l. c. (9—13), sowie l. c. (1, 3, 6), zu der auch unsere Methode gerechnet werden kann. Das Prinzip dieser Methode wurde von l. c. (14) erstmals beschrieben: das durch Spaltung von FDP mit ALD erhaltene GAP wird mit GAPDH in Gegenwart von Natrium-Arsenat oxydiert. Dabei entsteht 1-Arsenato-3-Phosphoglycerinsäure, die instabil ist und sofort zerfällt, somit aus dem Gleichgewicht scheidet. Die Behauptung von NEPVEUX und WEGMANN (9), daß die von ihnen beobachtete unspezifisch verstärkte Färbung bei der Leber-Aldolase durch Natrium-Arsenat bedingt ist, wurde in unseren Untersuchungen nicht bestätigt. Bei der Anwendung von anorganischem Phosphat, wie die Verfasser empfehlen, verläuft die Reaktion wesentlich langsamer. Die bei der Oxidation des GAP gewonnenen zwei Protonen reduzieren NAD zu NADH, können hernach auf NBT übertragen werden, wobei sich ein Formazan bildet. Von dessen Menge kann indirekt auf die Aldolaseaktivität geschlossen werden. Das Übertragen der Protonen von NADH auf NBT vollzieht sich bei histochemischen Untersuchungen durch die endogene Diaphorase (9, 13). Zu diesem Zweck wurde bei der Lokalisierung von Isoenzymen der ALD bisher Phenazinmethosulfat benutzt (1, 3, 6). Zu Beginn unserer Untersuchungen arbeiteten wir auch mit Phenazinmethosulfat, konnten aber damit keine quantitativen Bestimmungen bei Seren mit hoher ALD-Aktivität erzielen. Deswegen wandten wir die Diaphorase an, welche Protonen von NADH auf verschiedene Farbstoffe übertragen kann. Diese erwies sich als besonders geeignet und ermöglichte es, quantitativ vergleichbare Ergebnisse zu erzielen.

Material und Methoden*Bezugsquellen*

Fructose-1,6-diphosphat-Na-Salz, NAD, Diaphorase (5 mg/ml), GAP-DH (10 mg/ml), Aldolase UV Test Combination, Tris: Fa. Boehringer, Mannheim.
Agarose: Serva Entwicklungslabor, Heidelberg;
NBT: Fluka AG, Buchs;
Natriumarsenat: British Drug House;
EDTA-Na-Salz und Borsäure: Reanal, Budapest.

Versuchsmaterial

Blutserum von gesunden (50 Blutspendern, Männer und Frauen im Alter von 18 bis 45 Jahren) und von kranken Menschen. Das Serum wurde nach der Gerinnung abgetrennt, zentrifugiert und bei 4° aufbewahrt.

Organe von verunglückten Menschen; Sperma und Erythrocyten von gesunden Spendern. Die Organe wurden in einem Homogenisator, Type „Markenschlager und Schloßmann“ mit dem Elektrophoresepuffer homogenisiert. Die Homogenate zentrifugierten wir in einer Kühlraumzentrifuge 1 Std. bei 24 000 g und untersuchten die Zentrifugate.

Bestimmung der Aldolaseaktivität

Die Gesamt-Aldolaseaktivität des Serums wurde mit der „Aldolase UV Test Combination“ (15) bei 340 nm bestimmt. Die Elektrophorese wurde in 0,75 proz. Agarosegel in Plexiglaströgen (180/130/4 mm) durchgeführt. Dabei hatte das Gel unmittelbaren Kontakt mit dem Puffer in den Küvetten. Der Puffer von pH 8,6 hatte folgende Zusammensetzung: Tris 0,2M, Borsäure 0,133M und EDTA-Na₂ 0,005M. Bei 200 V, 60 mA und 2° trennen sich die Eiweißkörper innerhalb 5 Stdn. über einen Bereich von 12 cm auf.

Lokalisierung der Aldolaseaktivität

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel mit der Lösung zur Lokalisierung der ALD-Aktivität inkubiert. Die Lösung hatte folgende Zusammensetzung: FDP Na-Salz 0,075M, Natriumarsenat 2,5 mM, NAD 5 mM, NBT 0,5 mM, Agarose 2 mg/ml, GAP-DH 0,3 mg/ml, Diaphorase 0,03 mg/ml, Tris/HCl-Puffer 0,2M, pH 8. Nach 1 1/2 stdg. (Organzentrifugat) bzw. 4 stdg. Inkubation (Serum) bei 37° traten die Isoenzymfraktionen der ALD deutlich hervor. Zum Fixieren wurde das Gel für 12 Stdn. in 5proz. Essigsäure getaucht und mit Filterpapier getrocknet, wonach es aufbewahrungsfähig war.

Auswertung

Für die qualitative Auswertung der einzelnen Isoenzymfraktionen der ALD wurde das Extinktions-Registriergerät mit Integrator ERI 10 (VEB Zeiss, Jena) verwendet. Mit diesem Gerät wurden die entsprechenden densitometrischen Kurven und die Integrationskurven der Isoenzympherogramme aufgezeichnet. Die Ermittlung der jeweiligen Fraktionsgrößen wurde nach DITTMER's Anweisungen durchgeführt (16).

Ergebnisse und Diskussion

Im Serum von gesunden Menschen wurden vier Fraktionen der Aldolase nachgewiesen, die wir als I (anodisch), II, III und IV (kathodisch) bezeichnen. Fraktion I befindet sich in der Zone der Präalbumine und Albumine des Serums. Sie ist diffus auf verhältnismäßig breitem Grund. Fraktion II ist in der Zone der γ_2 -Globuline zu finden. Sie stellt ein schmaleres Band dar, deutlich von Fraktion I abgesondert, aber zum Teil in Fraktion III übergehend. Fraktion III hat dieselbe elektrophoretische Beweglichkeit wie die β_2 -Globuline. Sie zeichnet sich als ein schmales dichtes Band ab und hebt sich deutlich ab. Gewöhnlich hat sie eine U-Form, die oft aus zwei parallelen Streifen besteht, deren Enden zusammenfließen. Beim Fraktionieren mehrerer Seren nebeneinander auf ein und derselben Gel-Fläche wird beobachtet, daß sich ein gewisser Teil der Fraktion III etwas langsamer nach der anodischen Seite bewegt. Fraktion IV befindet sich an der Startlinie und auch etwas darüber hinaus in Richtung der kathodischen Seite, im Bereich

der γ -Globuline. Diese Fraktion hat die schwächste Intensität und fehlt in einigen Enzymelektropherogrammen (Abb. 1 und 2).

Wegen der anormalen Verteilung der quantitativen Werte der einzelnen Fraktionen beim Bestimmen der Normalwerte wandten wir die Methode der Perzentile an. Als untere Grenze nahmen wir das 2,5. und als obere Grenze das 97,5. Perzentil. Wir haben also 95% der Fälle erfaßt. Die Grenzen, in denen die Normalwerte der einzelnen Fraktionen variieren, sind ziemlich weit und in Tabelle 1 dargestellt.

Abb. 1

- a) Elektropherogramm der Eiweißkörper im Serum von Gesunden. Färbung mit Amidoschwarz 10 B
b) Isoenzymfraktionen der ALD desselben Serums, Nachweis enzymatisch

Abb. 2

- a) und b) Isoenzymfraktionen der ALD von 2 Seren von Gesunden mit den entsprechenden densitometrischen Kurven nach enzymatischem Nachweis

Tab. 1
Normalwerte der Isoenzymfraktionen der ALD in Seren von Gesunden nach der Perzentil-Methode berechnet.

Isoenzymfraktionen	I	II	III	IV
Perzentil	P2,5—P97,5	P2,5—P97,5	P2,5—P97,5	P2,5—P97,5
Relative Aktivität (%)	28,2—60,1	15,2—38,4	11,0—39,5	1,7—19,5
Absolut-Werte (mU/ml)	1,00—2,59	0,55—1,51	0,38—1,40	0,04—0,69

Tab. 2
Mittelwerte und Standardabweichung der einzelnen Isoenzymfraktionen der ALD in Seren von Gesunden.

Isoenzymfraktionen der ALD							
I	II	III	IV	I	II	III	IV
Relative Aktivität (%)				Absolut-Werte (mU/ml)			
44,54 ± 8,76	26,48 ± 6,51	20,35 ± 6,46	8,91 ± 4,34	1,56 ± 0,31	0,91 ± 0,24	0,71 ± 0,26	0,30 ± 0,18

Abb. 3

- Isoenzymfraktionen der ALD von Menschenseren:
 a) von Gesunden mit Gesamtaktivität der ALD (g. A) 3,63 mU/ml/
 b) und c) Dystrophia musculorum progressiva (g. A 48,80 und 33,60 mU/ml)
 d) Hepatitis epidemica (g. A 24,97 mU/ml)
 e) und f) Leucosis acuta (g. A 24,97 und 24,97 mU/ml)
 g) Reticulosis (g. A 52,21 mU/ml)
 h) und i) von einem Neugeborenen (g. A 12,26 und 47,67 mU/ml)
 j) von einer Wöchnerin (g. A 8,17 mU/ml)

Abb. 4

- Isoenzymfraktionen der ALD von normalen Menschenorganen:
 a) Herzmuskel, b) Musculus pectoralis major (roter Typ), c) Musculus rectus abdominis (roter Typ), d) Musculus deltoideus brachialis (weißer Typ), f) Leber, g) Milz, h) Eierstock, i) Niere, j) Gehirn, k) Kleinhirn, l) Sperma, m) Erythrocyten

Außerdem haben wir die Mittelwerte und die Standardabweichung jeder Fraktion berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 gezeigt. Daraus ersieht man, daß Fraktion I den höchsten und Fraktion IV den niedrigsten Wert hat.

Die Gesamt-Aktivität der ALD in Seren von Gesunden hat einen Mittelwert von 3,50 mU/ml bei einer Standardabweichung von $\pm 0,64$ mU/ml. Bei einer Reihe von Erkrankungen, die eine hohe Gesamt-Aldolaseaktivität aufweisen, ändert sich im Vergleich zu gesunden Menschen das Isoenzymmuster stark (Abb. 3). Es treten neue Fraktionen auf, deren Gesamtzahl in manchen Fällen auf acht steigt. Außerdem werden in einzelnen Isoenzymfraktionen quantitative Veränderungen beobachtet, die bei manchen besonders stark ausgeprägt sind. Wir verfügen z. Z. noch nicht über genügend Material von untersuchten Patienten, um sichere Schlußfolgerungen über die Spezifität der Isoenzymmuster bei einzelnen Krankheiten ziehen zu können.

Die Isoenzymmuster von Organen des Menschen sind auf Abb. 4 zu ersehen. Die Zahl der Isoenzymfraktionen ist in den einzelnen Organen verschieden: Herzmuskel, Skelettmuskel verschiedener Typen, Gehirn und Leber

je 7; Niere 8, Milz und Kleinhirn je 6; Eierstock 4; Erythrocyten und Sperma je 3. Die Gesamtzahl der Isoenzymfraktionen nach ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit beträgt 10. Drei von ihnen befinden sich auf der Kathodenseite, eine auf der Startlinie und die übrigen 6 auf der Anodenseite der Enzymogramme. Bemerkenswert ist die größere Zahl der Isoenzymfraktionen in den Organen im Vergleich zu der bisher in der Literatur beschriebenen. L. c. (4) wie (6) deuten daraufhin, daß eine empfindlichere Methode zum Auffinden mehrerer Isoenzymfraktionen der ALD beitragen würde. Wir glauben, daß unsere Methode besonders geeignet und imstande ist, das Auftreten sogar von geringer ALD-Aktivität in Seren gesunder Menschen nachzuweisen.

Es muß hervorgehoben werden, daß es infolge der gleichen elektrophoretischen Beweglichkeit der meisten Isoenzymfraktionen erforderlich ist, sie nicht nur nach ihrer Beweglichkeit, sondern auch nach ihrer Substratspezifität zu bezeichnen. Untersuchungen in dieser Hinsicht sind bereits vorgenommen. Bei Erkrankungen, bei denen sich ein und dieselbe Fraktion verändert, können diese Untersuchungen feststellen, aus welchem Organ die Fraktion stammt.

Literatur

1. CHRISTEN, PH., U. RENSING, A. SCHMID und F. LEUTHARDT, *Helv. chim. Acta*, **49**, 1872 (1966). — 2. FOXWELL, C., E. CRAN und D. BARON, *Biochem. J.*, **100**, 44 (1966). — 3. PENHOET, E., T. RAJKUMAR und W. RUTTER, *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, **56**, 1275 (1966). — 4. ANSTALL, H., C. LAPP und J. TRUJILLO, *Science Washington*, **154**, 657 (1966). — 5. PIETRUSZKO, R. und D. BARON, *Biochim. biophysica Acta (Amsterdam)*, **132**, 203 (1967). — 6. RENSING, U., A. SCHMID und F. LEUTHARDT, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, **348**, 921 (1967). — 7. DREYFUS, J., G. SCHAPIRA und F. SCHAPIRA, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **73**, 235 (1958). — 8. WINSTEN, S., J. JACKSON und P. WOLF, *Clin. Chem. (New York)*, **12**, 497 (1966). — 9. NEPVEUX, P. und R. WEGMANN, *Ann. Histochem.*, **10**, 177 (1965). — 10. ABE, T. und N. SHIMIZU, *Histochem.*, **4**, 209 (1964). — 11. LAKE, B., J. ROY, *Microsc. Soc.*, **84**, 489 (1965). — 12. SIMON, H., F. ARNOLD und B. RINDFLEISCH, *Acta, histochem.*, **23**, 322 (1966). — 13. VIALE, G., *Naturwissenschaften*, **51**, 438 (1964). — 14. Warburg, O. und W. Christian, *Biochem. Z.*, **314**, 149 (1943). — 15. Aldolase „UV-Test“. 2. Aufl. C. F. Boehringer und Soehne, Mannheim (1966). — 16. DITTMER, A., *Plasmaeiweiß und Elektrophorese*, S. 122, 3. Aufl., VEB Gustav Fischer, Jena (1965).

Dr. A. Dikow
Bul. Christo Botew 14
Sofia/Bulgarien