

116. Über Aldolasen.

2. Mitteilung¹⁾.

Chromatographische Trennung von 1-Phosphofructaldolase und Diphosphofructaldolase der Leber

von Ursula Kaletta-Gmünder, H. P. Wolf und F. Leuthardt.

(27. IV. 57.)

Bei unsern Untersuchungen über den Stoffwechsel der Fructose in der Leber fanden wir, dass die Aldolase der Leber sich von der *Meyerhof'schen* Muskelaldolase²⁾ durch ihr Spaltungsvermögen gegenüber Fructose-1-phosphat unterscheidet³⁾. Wir haben das Ferment deshalb „1-Phosphofructaldolase“ benannt. Das Enzym katalysiert auch die Kondensation von Phosphodihydroxyaceton mit unphosphorylierten Aldehyden wesentlich stärker als die Muskelaldolase⁴⁾.

Die zu den bisherigen Untersuchungen benutzten Enzymfraktionen aus Leber (Ammoniumsulfatfällungen) spalten Fructose-1,6-diphosphat und Fructose-1-phosphat ungefähr mit der gleichen Geschwindigkeit. Eine Trennung der Aktivitäten war durch Ammoniumsulfatfraktionierung nicht möglich. Wir liessen deshalb die Frage offen, ob in der Leber ein einziges Enzym mit weiterem Spezifitätsbereich beide Substrate spaltet oder ob zwei Aldolasen vorhanden sind, von denen die eine das Monophosphat, die andere das Diphosphat angreift. Durch chromatographische Trennung vorfraktionierter Extrakte ist es uns nun gelungen, das Vorhandensein zweier verschiedener Aldolasen in der Leber nachzuweisen. Wir bedienten uns dazu der als „one-step-elution“ bezeichneten Technik der Entwicklung eines Chromatogramms mit einer einzigen Lösung. Diese unterscheidet sich in ihrer Zusammensetzung von jener Lösung, mit der sich die chromatographische Säule im Gleichgewicht befindet⁵⁾, in unserem Falle 0,02-m. Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, HCl, pH 8,9⁶⁾ „Tris-HCl-Puffer“. Nach Auftragen eines entsprechend vorfraktionierten Leberextraktes auf die Säule wurde mit 0,5-m. Tris-HCl-Puffer pH 8,9 eluiert. Als Adsorptionsmittel wurde der nach *Peterson & Sober*

¹⁾ Erste Mitteilung: *H. P. Wolf & F. Leuthardt*, *Helv.* **40**, 237 (1957).

²⁾ *O. Meyerhof & K. Lohmann*, *Naturwiss.* **22**, 220 (1934); *Biochem. Z.* **271**, 89 (1934).

³⁾ *F. Leuthardt, E. Testa & H. P. Wolf*, *Helv.* **36**, 227 (1953).

⁴⁾ *F. Leuthardt & H. P. Wolf*, *Helv.* **37**, 1734 (1954).

⁵⁾ *H. G. Boman & L. E. Westlund*, *Arch. Biochemistry Biophys.* **64**, 217 (1956).

⁶⁾ Wir benutzen diesen Kationenpuffer, weil er sich für die Proteinchromatographie an Anionenaustauschern als besonders vorteilhaft erwiesen hat⁵⁾.

hergestellte Anionenaustauscher Diäthylaminoäthylcellulose (DEAE-Cellulose) verwendet⁷⁾.

Unsere im experimentellen Teil angegebenen Resultate waren reproduzierbar. Mit weiterer Reinigung und präparativer Darstellung der 1-Phosphofruktaldolase sind wir beschäftigt.

Zur Benennung der Aldolasen: Wir hatten uns vorbehalten, auf die Nomenklatur der Aldolasen zurückzukommen⁴⁾, nachdem *Hers & Kusaka*⁸⁾ die Bezeichnung „1-Phosphofruktaldolase“ kritisiert hatten. Sie nahmen an, Fructose-1-phosphat und Fructose-1,6-diphosphat würden in der Leber durch das gleiche Enzym gespalten. Mit dem Nachweis einer spezifisch auf Fructose-1-phosphat eingestellten Aktivität dürfte für dieses Ferment der von uns vorgeschlagene Name 1-Phosphofruktaldolase gerechtfertigt sein.

Experimenteller Teil⁹⁾.

A. Methoden.

1. Herstellung der vorfraktionierten Enzymlösung. Kaninchenleber wurde mit dem 4fachen Volumen in Quarz destilliertem Wasser im „Turmix“ zerkleinert und das Homogenat bei 22000 g zentrifugiert. Dann wurde Ammoniumsulfat bis zum Sättigungsgrad 0,5 (siehe unter A. 2.) zugegeben und erneut scharf zentrifugiert. Der Rückstand wurde verworfen. Im Überstehenden wurde der Sättigungsgrad auf 0,7 erhöht; die ausgefallenen Proteine wurden durch Abzentrifugieren gesammelt und wieder in Wasser (destilliert in Quarzapparatur) gelöst, worauf die Fraktionierung wiederholt wurde. Die so erhaltene Proteinfraction zwischen Sättigungsgrad 0,5 und 0,7 wurde in 1,9-m. Ammoniumsulfat suspendiert und in diesem Zustand aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen ist über mehrere Wochen kein Aktivitätsverlust feststellbar.

Die Temperatur stieg bei allen Operationen nie über 4^o. Vor dem Aufziehen der Proteinfraction auf die Kolonne wurde die Eiweißsuspension gegen eine Tris-HCl-Pufferlösung gleicher Ionenstärke und gleichen pH-Wertes wie diejenige, mit der die Kolonne im Gleichgewicht stand, dialysiert (siehe A. 5.).

2. Bestimmung der Ammoniumsulfatkonzentration. Die $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration bestimmten wir nach der von uns früher angegebenen Formol-Titration¹⁾. Zur Umrechnung der Molarität auf Sättigungsgrade benutzten wir die von *Bücher*¹⁰⁾ angegebene Beziehung: Molarität einer Lösung vom Sättigungsgrad 1,0 = 3,9 (bei 0^o).

3. Bestimmung der Proteinkonzentration. Da die in Fig. 2 angeführte Extinktionskurve der Proteinlösungen bei 280 $m\mu$ nur ein ungefähres Mass für die Eiweißkonzentration gab (teilweise Beimengung gelbgefärbter Substanzen, siehe B. 2.), wurden die den Aktivitätsbestimmungen zugrunde liegenden Werte durch die schon mehrfach beschriebene Biuretmethode¹⁰⁾ ermittelt. Die UV.-Absorption bei 280 $m\mu$ wurde in Quarzkuvetten von 1 cm Schichtdicke gegen Wasser gemessen.

⁷⁾ *E. A. Peterson & H. A. Sober*, J. Amer. chem. Soc. **78**, 751 (1956).

⁸⁾ *H. G. Hers & T. Kusaka*, Biochim. biophys. Acta **11**, 427 (1953).

⁹⁾ Abkürzungen:

F-1-P = Fructose-1-phosphat

GAD = Glycerinaldehyd

FDP = Fructose-1,6-diphosphat

PGAD = Phosphoglycerinaldehyd

Tris = Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

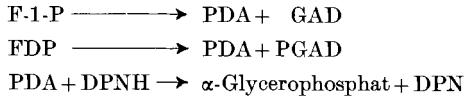
DPNH = reduzierte Cozymase

PDA = Phosphodihydroxyaceton

DPN = Cozymase

¹⁰⁾ *G. Beisenherz, H. J. Boltze, Th. Bücher, R. Czok, K. H. Garbade, E. Meyer-Arendt & G. Pfeleiderer*, Z. Naturforsch. **8b**, 555 (1953).

4. Bestimmung der Enzymaktivitäten. Die Spaltung von F-1-P und FDP verfolgten wir mit Hilfe eines optischen Testes unter Verwendung von α -Glycerophosphatdehydroase (*Baranowski-Ferment*) und DPNH als Hilfssystem¹¹). Wellenlänge 366 m μ .



Als Puffer benutzten wir 0,05-m. Triäthanolaminpuffer von pH 7,5. Mit *Bücher*¹⁰) definieren wir als eine Enzymeinheit die Enzymmenge, die bei 25° die Extinktion des DPNH bei der genannten Wellenlänge in 100 sec um den Wert 0,1 ändert. Mit „spezifischer Aktivität“ bezeichnen wir die Einheiten pro mg Protein. Da unsere Fraktionen keine Triose-isomerase mehr enthalten, sind die Aktivitäten gegen F-1-P und FDP direkt miteinander vergleichbar (pro Mol Hexosephosphat entsteht in jedem Fall ein Mol Phosphodihydroxyaceton).

5. Ausführung der Chromatographie. Eine Suspension von nach *Peterson & Sober*⁷) hergestellter Diäthylaminoäthylcellulose (DEAE-Cellulose) wurde im Vakuum von Luftblasen befreit und die Säule (Länge 25 cm, Durchmesser 3 cm) unter Anwendung eines Wasserdruckes von ca. 40 cm gepackt¹²). Die Cellulosefüllung der Kolonne betrug 120 ml.

Vor der Durchführung des hier geschilderten Versuches war die Kolonne viermal zu Experimenten gleicher Art verwendet worden. Die DEAE-Cellulose wurde nach jedem Versuch in der Säule mit 1-proz. NaOH regeneriert und mit dem 15fachen Volumen des „dead-volume“ an 0,02-m. Tris-HCl-Puffer (pH 8,9) ins Gleichgewicht gebracht. Vor jedem Versuch erfolgte eine pH-Kontrolle des aus der Säule tropfenden Puffers, ehe der vorfraktionierte und während 15 Std. gegen 0,02-m. Tris-HCl-Puffer (pH 8,9) dialysierte Leberextrakt auf die Kolonne gebracht wurde. Die 10 ml des Proteingemisches, welche 428 mg Protein enthielten, wurden ohne spezielle Druckerhöhung an die DEAE-Cellulose adsorbiert. Dann wurde mit 0,5-m. Tris-HCl-Puffer (pH 8,9) eluiert unter Anwendung eines Wasserdruckes von 70 cm. Der Fraktionensammler arbeitete nach dem Zeitprinzip. Der Versuch wurde im Kälterraum bei 4° ausgeführt. Das Fraktionsvolumen betrug im Durchschnitt 4,5 ml in 60 min vor und nach dem Protein-peak, innerhalb des peak sank es auf etwa 3,5 ml herab. Für die Berechnung der Gesamtaktivitäten innerhalb der einzelnen Fraktionen (Fig. 2) wurde das Fraktionsvolumen genau gemessen. Die ersten aufgefingenen 51 ml enthielten keine Proteine.

B. Ergebnisse.

1. In Fig. 1 ist das Verhältnis der spezifischen Aktivitäten der einzelnen Fraktionen dargestellt. Obwohl wir wahrscheinlich noch nicht unter optimalen Trennungsbedingungen gearbeitet haben, erscheinen die Maxima der Aktivitäten gegen F-1-P und FDP an zwei verschiedenen Stellen, woraus das Vorhandensein zweier Aldolasen hervorgeht. Durch Verfeinerung der chromatographischen Technik (Variation der aufgetragenen Proteinmenge, der Ionenstärke der Eluierlösung und Entwickeln des Chromatogramms bei anderem pH-Wert) dürfte evtl. eine noch schärfere Trennung der beiden Aktivitätsmaxima möglich sein. Es kam uns zunächst in erster Linie auf die Darstellung eines scharfen peaks der spezifischen Fructose-1-phosphat-Aktivität an, als ersten Schritt zur weiteren Reinigung dieses Fermentes.

Im Maximum der F-1-P-Aldolase-Aktivität erhielten wir ein Verhältnis

$$\text{Einheiten F-1-P-Spaltung/Einheiten FDP-Spaltung} = 40:2,5,$$

das sich in den folgenden Fraktionen bis 1,6:2,5 änderte, worauf dann die Aktivität beider Aldolasen in den nächsten Röhren auf Null zurückging.

¹¹) *E. Racker, J. biol. Chemistry* **167**, 843 (1947).

¹²) *H. G. Boman & U. Kaletta*, erscheint in *Biochim. biophys. Acta*.

Unsere Proteinfractionen waren frei von Triose-isomerase (siehe A. 4.). Eine Erhöhung der Aktivitäten bei Zusatz von Glutathion war nicht zu beobachten.

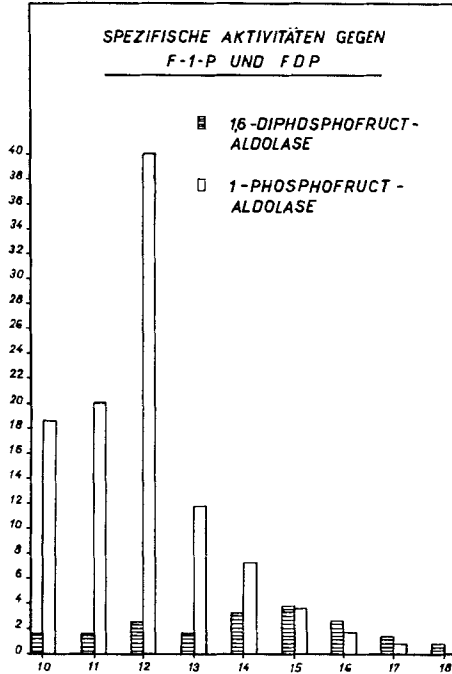


Fig. 1.

Abszisse: Nummer der Röhrchen.

Ordinate: Spezifische Aktivität (Einheiten/mg Protein) gegen Fructose-1-phosphat und Fructose-1,6-diphosphat. (Definition der spezifischen Aktivität siehe Text A.4.)

2. In Fig. 2 sind die Kurven für die UV.-Absorption bei $280\text{ m}\mu$, die Proteinbestimmungen mittels der Biuretmethode und die Gesamtaktivitäten der einzelnen Fraktionen (spezifische Aktivität \times Proteinmenge) dargestellt. Unter den angegebenen Bedingungen erhält man nur einen peak für die Proteine, dessen einzelne Fraktionen sich dann aber in ihren Aktivitäten deutlich durch zwei verschiedene Maxima unterscheiden (betr. noch stärkerer Auftrennung der beiden Aldolasepeaks siehe B. 1.). In den Fraktionen 16 bis 29 beeinflusst ein gelblicher, nicht dialysierbarer Farbstoff (Intensitätsmaximum Fraktion 19—21) die UV.-Absorption bei $280\text{ m}\mu$. Diese kann deshalb nur zur angenäherten Bestimmung der Proteinkonzentration dienen. Die Aktivitäten der Enzyme sind auf die durch die Biuretmethode ermittelten Proteinwerte bezogen. Allerdings beeinflusst auch Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan die Farbintensität des Biuretreagenses, was sich leicht durch Zusatz der Verbindung zum Reagens nachweisen lässt. Es war deshalb zu prüfen, ob sich bei unseren Bestimmungen nach Fällen und Waschen der Proteine mit Trichloroessigsäure noch „Tris“ im Niederschlag findet. Man hat schon früher vermutet, dass nach Chromatographie an DEAE-Cellulose „Tris“ in irgendeiner Form an Protein gebunden bleibt (obwohl die Chloridfront im Chromatogramm erst nach diesen Fraktionen erscheint)¹². Wir haben deshalb eine Reihe von Biuretbestimmungen ohne und mit Zusatz von Tris-HCl-Puffer in verschiedenen Konzentrationen am Standardserum des Schweizerischen

Roten Kreuzes ausgeführt¹³⁾ (Tab. I). Selbst wenn man zweimal mit 0,5-m. Trichloressigsäure nachwäscht, befindet sich immer noch eine bestimmte Menge „Tris“ in der Proteinfällung. Da sich diese Erscheinung jedoch erst bei relativ hohen „Tris“-Konzentrationen störend bemerkbar macht, dürfte sie bei den für die Trennung der 1-Phosphofruktaldolase wichtigen Fraktionen in Fig. 1 und Fig. 2 zu vernachlässigen sein. Ein kleiner Fehler unserer Proteinwerte würde nichts an der Tatsache der beiden Aktivitätsmaxima und dem Nachweis zweier verschiedener Enzyme ändern. Es würde nur bedeuten, dass unsere Werte für die spezifische Aktivität der Enzyme in Wirklichkeit noch etwas höher liegen, die Reinigung der 1-Phosphofruktaldolase also noch besser ist.

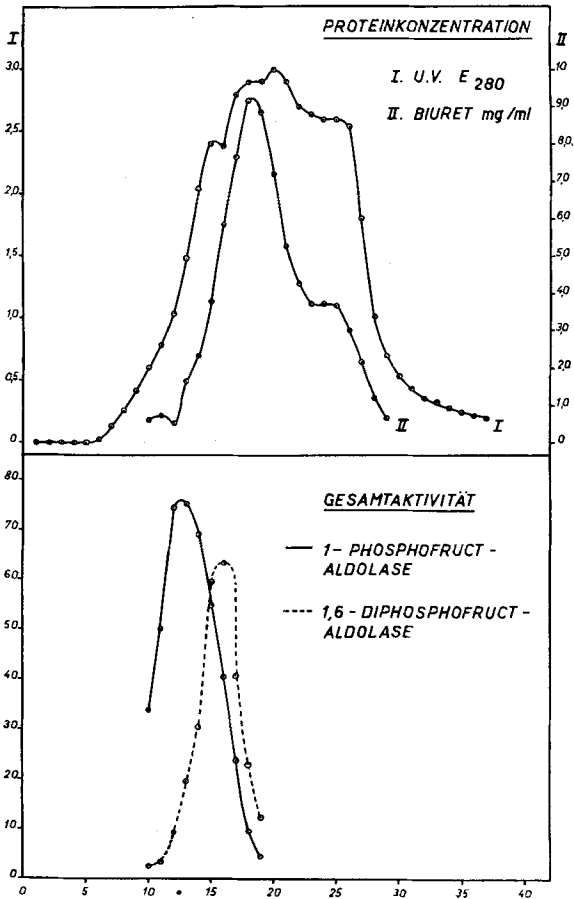


Fig. 2.

Oben: Eiweisschromatogramm (I UV.-Absorption, Ordinate links; II Biuretwerte, Ordinate rechts).

Unten: Kurve der Gesamtaktivität (spezifische Aktivität \times Proteinmenge) gegen F-1-P und FDP.

¹³⁾ Dem Zentrallaboratorium des Blutspendedienstes des Schweizerischen Roten Kreuzes danken wir bestens für die Überlassung einer Probe Standardserum.

Tabelle 1.

Beeinflussung der Biuretbestimmung durch Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan („Tris“).

Konzentration der Proteinlösung an Tris-HCl-Puffer		0,5-m.	0,1-m.	0,02-m.	ohne Tris
Protein gefunden	nach einmaligem Nachwaschen der Fällung mit 0,5-m. Cl_3CCOOH	8,6 mg/ml	7,4 mg/ml	7,1 mg/ml	6,8 mg/ml
	nach zweimaligem Nachwaschen mit 0,5-m. Cl_3CCOOH	8,3 mg/ml	7,2 mg/ml	7,0 mg/ml	6,8 mg/ml

Der totale Proteingehalt des peak deutet darauf hin, dass unter unseren Bedingungen nur ein Teil des gesamten auf die Kolonne aufgetragenen Extraktes eluiert wird. (Wenn man nach dieser „one-step-elution“ noch mit „Tris“-Puffer höherer Konzentration, z. B. 0,75-m. oder 1,0-m. eluiert, ebenfalls beim pH 8,9, erhält man einen weiteren peak, der jedoch keine Enzymaktivität gegenüber den beiden Substraten zeigt, weshalb er in unsern Abbildungen unberücksichtigt blieb.)

Diese Arbeit wurde mit Unterstützung des *Schweizerischen Nationalfonds für wissenschaftliche Forschung* durchgeführt, dem wir für die gewährten Mittel bestens danken.

SUMMARY.

Two different aldolases from rabbit liver have been separated by ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose. They differ in activity towards fructose-1-phosphate and fructose-1,6-diphosphate (“1-Phosphofruktaldolase” and “Diphosphofruktaldolase”). By this separation an enzyme acting specifically on fructose-1-phosphate has been purified for the first time. The degree of purification was about 16-fold.

Zürich, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität.