

Die untersuchten *acht aromatischen Aldehyde* sind in der Tabelle nebst einigen ihrer physikalischen Konstanten aufgeführt. Sie erscheinen im *Fractogramm* (s. Figur) in der Reihenfolge ihrer Sdp. Es ist jedoch darauf hinzuweisen, dass die Retentionsdauer der einzelnen Komponenten in einem höheren Ausmass anstieg, als dies die Sdp. vermuten liessen. Bezüglich des als letzter austretenden *4-Hydroxy-3,5-dimethoxy-benzaldehyds* errechneten wir für die verwendete Säule eine *theoretische Bodenhöhe* von 1,4 mm, entsprechend einer *Trennstufenzahl* von $n = 700$ pro 100 cm Säulenlänge.

Aus dem *Fractogramm* lässt sich ersehen, dass auch die empfindlicheren Aldehyde *3,4-Methylendioxybenzaldehyd* und *p-Hydroxy-benzaldehyd* mit der beschriebenen Technik isoliert werden können. Für *Benzaldehyd* und *o-Hydroxybenzaldehyd* war offensichtlich die verwendete Trenntemperatur zu hoch. Diese Komponenten sollten bei niedrigerer Temperatur chromatographiert werden. Aussichtsreich scheint in diesem Falle der Einsatz der Thermo-Gas-Chromatographie zu sein.

In der letzten Spalte der Tabelle sind die errechneten relativen Retentionszeiten der einzelnen Aldehyde aufgeführt. In Übereinstimmung mit dem *Fractogramm* zeigen die aufgeführten Werte, dass die Trennung an der beschriebenen Säule, von den beiden zuvor erwähnten, relativ niedrig siedenden Aldehyden abgesehen, sehr gut gelang. Ferner deuten die Daten darauf hin, dass selbst Gemische mit einer noch grösseren Anzahl Komponenten als hier geprüft auf die beschriebene Weise chromatographiert werden könnten.

ZUSAMMENFASSUNG

Mit *Poly-(äthylenglykolisophthalat)* + *Polyäthylenglykol 4000* auf *Celite 545* als Säulenfüllmaterial lassen sich Gemische verschiedener *substituierter Benzaldehyde*, darunter die thermolabilen Vertreter *3,4-Methylendioxybenzaldehyd* und *p-Hydroxybenzaldehyd*, gas-chromatographisch trennen und analytisch erfassen.

Institut für Tierernährung, Eidg. Technische Hochschule, Zürich
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. E. CRASEMANN

239. *In-vitro*-Einbau radioaktiver Aminosäuren in die Proteine von *Drosophila*-Puppen

von E. Jenny, A. Hicklin und F. Leuthardt

(23. VIII. 62)

Die biologische Eiweissynthese verläuft nach heutigen Vorstellungen wahrscheinlich über folgende Zwischenstufen: Freie Aminosäuren werden durch die Bildung von Aminoacyladenylat aus ATP¹⁾ unter Freisetzung von Pyrophosphat aktiviert²⁾. Die aktivierten Aminosäuren werden anschliessend mit der Hydroxylgruppe 2' oder 3' der Ribose des terminalen Adenosylrestes einer niedermolekularen, löslichen Ribonucleinsäure (sRNA) verestert³⁾, wobei jeder Aminosäure eine spezifische sRNA zugeordnet ist. Beide Reaktionen werden durch die sogenannten pH-5-Enzyme

¹⁾ Abkürzungen: ATP: Adenosin-5'-triphosphorsäure; GTP: Guanosin-5'-triphosphorsäure; PEP: Phosphoenolbrenztraubensäure; PK: Pyruvatkinase.

²⁾ M. B. HOAGLAND, *Biochim. biophysic. Acta* 16, 288 (1955); M. B. HOAGLAND, E. B. KELLER & P. C. ZAMECNIK, *J. biol. Chemistry* 218, 345 (1956).

³⁾ M. B. HOAGLAND, M. L. STEPHENSON, J. F. SCOTT, L. I. HECHT & P. C. ZAMECNIK, *J. biol. Chemistry* 231, 241 (1958); E. H. ALLEN, E. GLASSMANN, *J. biol. Chemistry* 235, 1061 (1960).

katalysiert. Die Aminosäure-sRNA-Verbindungen werden an den Mikrosomen an eine hochmolekulare, partikelgebundene Ribonucleinsäure, die sogenannte «messenger RNA» angelagert, welche als Matrize die Aminosäuresequenz des zu bildenden Proteins festlegen soll. Die terminalen Schritte benötigen ein weiteres Enzym, das sogenannte «Transfer Enzym», dessen Funktion jedoch noch nicht genau bekannt ist. Einen Überblick über dieses komplexe und sich noch ganz im Fluss befindende Gebiet vermittelt BERG⁴⁾.

KELLER & ZAMECNIK^{5) 6)} konnten *in vitro* mit Mikrosomen und pH-5-Enzymen aus Rattenleber, sowie ATP, einem ATP regenerierenden System, GTP und Mg²⁺ den Einbau radioaktiver Aminosäuren in Proteine nachweisen. Ähnliche Versuche wurden mit Meerschweinchenleber⁷⁾, Ascitestumorzellen der Maus⁸⁾, Erbsenkeimlingen⁹⁾, Hefe und Bakterien¹⁰⁾ durchgeführt. Untersuchungen an Insekten wurden bisher nur wenige mitgeteilt. Als Versuchsobjekt diente vorwiegend die Seidendrüse der Seidenraupe (*Bombyx mori*). An der Seidendrüse zeigten ZAMECNIK¹¹⁾ und SHIMURA¹²⁾ *in vivo* und *in vitro* den Einbau radioaktiver Aminosäuren in die Proteine, HELLER¹³⁾ beschrieb die Aktivierung von Aminosäuren durch die pH-5-Enzyme und FAULKNER¹⁴⁾ ihren Einbau in die sRNA. TAKAYAMA¹⁵⁾ konnte in einem Ansatz, der Mikrosomen und partikelfreien Zellsaft enthielt, ebenfalls einen Einbau von Aminosäuren in Proteine nachweisen.

Um weiteren Einblick in die Proteinsynthese der Insekten zu gewinnen, untersuchten wir den Einbau radioaktiver Aminosäuren in die Proteine von Puppen der *Drosophila melanogaster*. Unsere ersten Versuche, in Analogie zu den Arbeiten ZAMECNIK⁵⁾ ausgeführt, stiessen auf Schwierigkeiten, da in der mikrosomalen Fraktion von *Drosophila*-Puppen eine sehr aktive Tyrosinase sitzt¹⁶⁾, die nach der Homogenisierung des Gewebes zu einer intensiven Melaninbildung führt. Vorstufe dieser Pigmente sind Chinone, die wegen ihres hohen Redoxpotentials mit vielen Eiweissgruppen reagieren, wodurch Enzyme leicht denaturiert werden. Zudem können sich Chinone mit Aminosäuren zu Chinoniminen verbinden, die mit Eiweissen weiter reagieren¹⁷⁾. Es entstehen dabei Aminosäure-Chinon-Eiweiss-Verbindungen. Lässt man z. B. *in vitro* in Anwesenheit von Albumin und einer Aminosäure 3,4-Dihydroxyphenylalanin durch Luftsauerstoff oxydieren, so wird die Aminosäure

⁴⁾ P. BERG, in *Ann. Rev. of Biochemistry* **30**, 293 (1961).

⁵⁾ M. B. HOAGLAND, P. C. ZAMECNIK & M. L. STEPHENSON, *Biochim. biophysic. Acta* **24**, 215 (1957).

⁶⁾ P. C. ZAMECNIK & E. B. KELLER, *J. biol. Chemistry* **209**, 337 (1954).

⁷⁾ J. F. KIRSCH, P. SIEKEVITZ & G. E. PALADE, *J. biol. Chemistry* **235**, 1419 (1960).

⁸⁾ J. W. LITTLEFIELD & E. B. KELLER, *J. biol. Chemistry* **224**, 13 (1957).

⁹⁾ G. C. WEBSTER, *J. biol. Chemistry* **229**, 535 (1957).

¹⁰⁾ E. F. GALE & J. P. FOLKES, *Biochem. J.* **59**, 661 (1955).

¹¹⁾ P. C. ZAMECNIK, R. B. LOFTFIELD, M. L. STEPHENSON & C. M. WILLIAMS, *Science* **109**, 624 (1949).

¹²⁾ K. SHIMURA, F. KOIDE, H. JTABASHI & H. FUKAI, *J. Biochemistry (Tokyo)* **42**, 285 (1955); K. SHIMURA, H. FUKAI, S. SUTO & R. HOSHI, *ibid.* **45**, 481 (1958).

¹³⁾ J. HELLER, P. SZAFRANSKI & SULKOWSKI, *Nature* **183**, 397 (1959).

¹⁴⁾ P. FAULKNER & B. BHEEMESWAR, *Biochem. J.* **76**, 71 (1960).

¹⁵⁾ S. TAKAYAMA, H. ITO & Y. MIURA, *Biochim. biophysic Acta* **30**, 233 (1958).

¹⁶⁾ E. JENNY, A. HICKLIN & F. LEUTHARDT, *Helv.* **44**, 1395 (1961).

¹⁷⁾ H. S. MASON, in *Advances Enzymol.* **16**, 105 (1955).

fest an das Eiweiss fixiert und kann durch heisse 5-proz. Trichloressigsäure nicht mehr abgetrennt werden. Ein enzymatischer Einbau von Aminosäuren in Proteine lässt sich deshalb nur nach Unterdrückung der Tyrosinaseaktivität beweisen. Versuche ergaben, dass Zusatz von $10^{-3}M$ Phenylthioharnstoff die Pigmentierung in

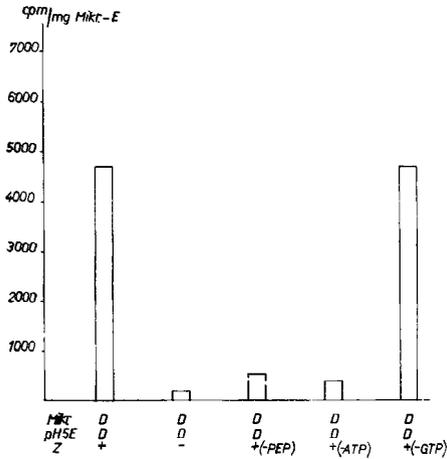


Fig. 1. Einbau von Leucin- ^{14}C in Protein von *Drosophila melanogaster* und Abhängigkeit von den Zusätzen
(D = *Drosophila*-System; Z = Zusätze, cf. Experimentelles)

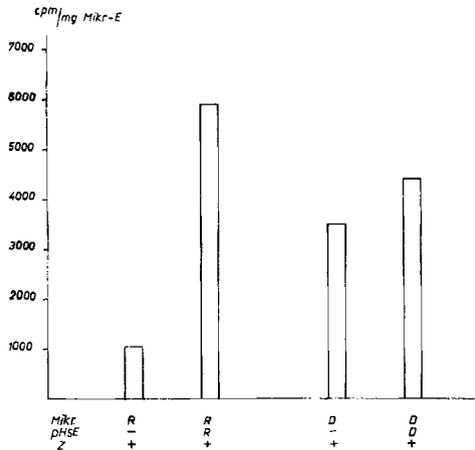


Fig. 2. Einbau in Rattenleber- und *Drosophila*-Mikrosomen in Abhängigkeit von den pH-5-Enzymen
(R = aus Rattenleber; D = aus *Drosophila*-Puppen)

Drosophila-Puppen-Homogenat völlig unterdrückt, aber die Proteinsynthese, wie Kontrollversuche mit Rattenleber ergaben, nicht beeinträchtigt. Mit dieser Methode gelang es uns, einen enzymatischen Einbau von Leucin- ^{14}C in Proteine der *Drosophila*-Puppen nachzuweisen.

Der Einbau ist abhängig von ATP, einem ATP regenerierenden System und Mg^{2+} , jedoch nicht von GTP (Fig. 1). Weitere Versuche zeigten, dass Mikrosomen aus *Drosophila*-Puppen, im Gegensatz zu Rattenlebermikrosomen, mit und ohne Zusatz von pH-5-Enzymen den gleichen Einbau aufweisen (Fig. 2). Ein ähnliches Verhalten fand WEBSTER bei Erbsenkeimlingen⁹⁾. Dass es sich dabei nicht um einen neuen Mechanismus der Proteinsynthese, sondern eher um eine festere Bindung von sRNA und/oder pH-5-Enzymen an die Mikrosomen handelt, scheint aus den vier folgenden Beobachtungen hervorzugehen:

a) Mit Na-Desoxycholat gereinigte Partikel bauen bedeutend weniger Leucin ein als nicht gereinigte. Der Einbau kann durch Zugabe von pH-5-Enzymen wesentlich gesteigert werden.

b) Nach der ersten Ultrazentrifugation mit 0,05 M KCl gewaschene Mikrosomen⁹⁾ verdoppeln den Einbau bei Anwesenheit von pH-5-Enzymen.

c) Wird der KCl-Extrakt mit verdünnter Essigsäure auf pH 5 gebracht, die Fällung abzentrifugiert und in einem Puffer von pH 7,6 gelöst, so kann durch diese «KCl-pH-5-Fraktion» der Einbau von mit KCl gewaschenen Mikrosomen ebenfalls gesteigert werden (Fig. 3).

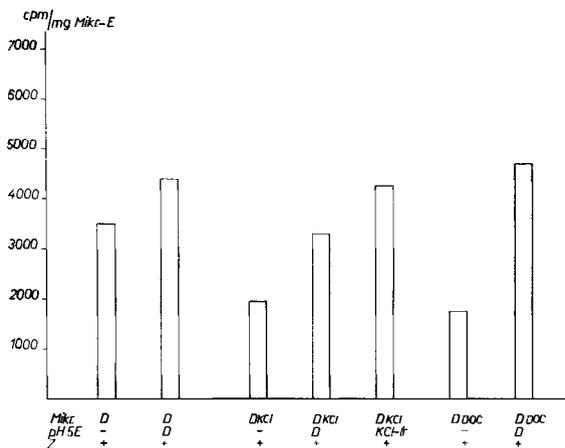


Fig. 3. Einbau in mit Na-Desoxycholat oder KCl gereinigte Mikrosomen und Abhängigkeit des Einbaus von der pH-5-Enzymfraktion

(DKCl = mit KCl gereinigte Partikel von *Drosophila*; DDOC = mit Na-Desoxycholat gereinigte Partikel; KCl-fr. = «KCl-pH-5-Fraktion», cf. Text)

d) Werden *Drosophila*-Mikrosomen nach der ersten Ultrazentrifugation zweimal gewaschen, zuerst mit Saccharose-Lösung und anschliessend mit 0,05 M KCl, so lässt sich aus beiden Extrakten durch Ausfällen bei pH 5 eine Fraktion gewinnen (Saccharose-pH-5-Enzyme, KCl-pH-5-Enzyme), die sowohl gegenüber *Drosophila*- als auch gegen Rattenleber-Mikrosomen aktivierende Eigenschaften aufweist (Fig. 4). Aus 10 g Puppen lassen sich auf diese Weise ca. 10 mg Mikrosomen (Protein), 5 mg «Saccharose-pH-5-Enzyme» und 0,5 mg «KCl-ph-5-Enzyme» gewinnen. Die so erhaltenen Partikel zeigen in 0,1 N NaOH ein Extinktionsverhältnis E_{260}/E_{280} von 1,9.

Da pH-5-Enzyme und sRNA anscheinend eine geringe Artspezifität aufweisen, versuchten wir das Rattenleber- und das *Drosophila*-System zu kreuzen. Wir inkubierten Rattenlebermikrosomen mit pH-5-Enzymen von *Drosophila* und umgekehrt. Die Resultate sind in Fig. 5 dargestellt. Die *Drosophila*-Mikrosomen wurden mit KCl

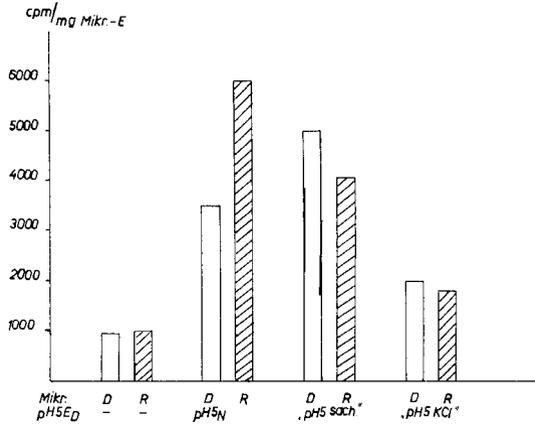


Fig. 4. Testung der durch zweimalige Reinigung aus den *Drosophila*-Mikrosomen herausgelösten Fraktionen («Saccharose-pH-5-Enzyme», «KCl-pH-5-Enzyme») auf ihre pH-5-Enzymaktivität an *Drosophila*- (*D*) und an Ratten-Mikrosomen (*R*)

(pH5E_D = pH-5-Enzyme aus *Drosophila*; pH5_N = normale pH-5-Enzymfraktion (3,5 mg Protein); pH 5 sach. = «Saccharose-pH-5-Enzyme» (1,5 mg Protein); pH 5 KCl = «KCl-pH-5-Enzyme» (0,4 mg Protein))

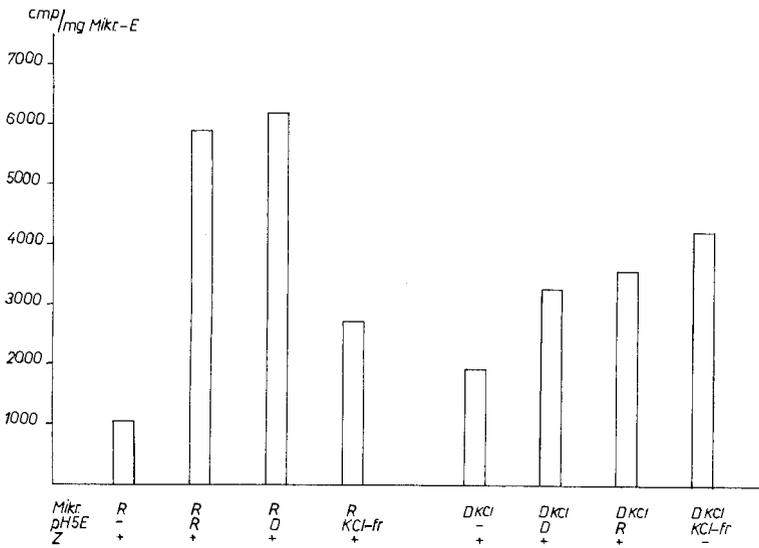


Fig. 5. Austausch der Mikrosomen und der pH-5-Enzyme des Rattenleber- (*R*) und des *Drosophila*-Systems (*D*).

(*Drosophila*-Mikrosomen sind mit 0,05M KCl gereinigt)

gereinigt. Es zeigte sich, dass die pH-5-Enzyme der beiden Systeme sich gegenseitig weitgehend ersetzen können.

Auf Grund der bisherigen Untersuchungen dürfte feststehen, dass der Einbau von Aminosäuren in Proteine von *Drosophila melanogaster in vitro* im wesentlichen mit jenem in der Säugerleber übereinstimmt. Die Tatsache, dass *Drosophila*-Mikrosomen, genau wie Rattenlebermikrosomen isoliert¹⁸⁾, scheinbar eines aktivierenden pH-5-Enzymsystems nicht bedürfen, erklärt sich aus dem Umstand, dass das aktivierende System (oder ein Teil davon) weniger leicht von den Mikrosomen zu entfernen ist. Die Frage, warum der Zusatz von GTP nicht benötigt wird, muss noch offen bleiben.

Experimentelles. – 1) *Methode:* Puppen von *Drosophila melanogaster*, Wildtyp, wurden kurz vor dem Schlüpfen gesammelt, mit Aqua dest. sauber gewaschen, abgenutscht, luftgetrocknet, gewogen und unter Zusatz von 2,3 ml Medium A (mit 10^{-3} M Phenylthioharnstoff) pro g Puppen in einem Porzellanmörser zerquetscht, der Brei abgossen und in einem Glashomogenisator mit Teflon-Pistill während 30 Sek. homogenisiert. Alle Operationen wurden bei 0–4° durchgeführt, im wesentlichen nach der Methode von ZAMEČNIK¹⁸⁾. Das Homogenat wurde 10 Min. bei 15000 g zentrifugiert, das Überstehende 1:1 mit Medium B verdünnt und anschliessend in einer präparativen Ultrazentrifuge (Modell SPINCO) bei 105000 g 60 Min. zentrifugiert. Das Sediment der Ultrazentrifugation wurde in 3 ml Medium A (mit Zusatz von 10^{-3} M Phenylthioharnstoff) aufgenommen, mit Medium B auf das vierfache Volumen verdünnt und nochmals 60 Min. bei 105000 g zentrifugiert. Anschliessend wurde das Sediment in 1–2 ml Medium A aufgenommen und von Hand kurz homogenisiert (= Mikrosomale Fraktion). Das Überstehende der ersten Ultrazentrifugation wurde ebenfalls nochmals 60 Min. bei 105000 g zentrifugiert, das Überstehende dieser Zentrifugation sorgfältig abgossen, mit Medium B 1:1 verdünnt, mit 0,5N Essigsäure auf pH 5,1 gebracht und der Niederschlag kurz abzentrifugiert. Das Sediment wurde mit Medium B ausgewaschen, erneut zentrifugiert und schliesslich in 2–4 ml Medium A aufgenommen (= pH-5-Enzyme). Der Ansatz enthielt normalerweise: 0,3 ml Mikrosomensuspension (2–4 mg Protein), 0,2 ml pH-5-Enzyme (2–4 mg Protein), $1\mu\text{Mol}$ ATP, $0,25\mu\text{Mol}$ GTP, $10\mu\text{Mol}$ PEP, 0,02 mg PK, $5\mu\text{Mol}$ MgCl_2 und $2\mu\text{C}$ Leucin- ^{14}C in total 1–1,2 ml Medium A. Die Inkubation erfolgte bei 37° und wurde nach 15 Min. durch Zugabe von 1 ml 10-proz. Trichloressigsäure beendet. Der Niederschlag wurde zweimal mit 5-proz. Trichloressigsäure gewaschen, dann mit 5-proz. Trichloressigsäure im Wasserbad 30 Min. bei 90° extrahiert, zweimal mit kalter Trichloressigsäure nachgewaschen, und anschliessend je einmal mit 95-proz. Äthanol, Äthanol/Äther/Chloroform (Vol. Verhältnis 2/2/1) und zweimal mit Äther entwässert. Darauf wurde das Eiweiss im Thermostaten bei 70° getrocknet, in Äther mit einem Glasstab fein suspendiert und auf ein Filterpapierplättchen abgenutscht. Die Zählung erfolgte zum Teil mit einem GEIGER-MÜLLER-Rohr, zum Teil mit einem GEIGER-Rohr mit Gasdurchfluss und ultradünnem Fenster. Die Zählwerte wurden auf unendliche Schichtdicke extrapoliert. Die Solubilisierung der Mikrosomen mit Na-Desoxycholat erfolgte nach der Methode von KIRSCH⁷⁾. Die Cholatpartikel wurden nach dem Abzentrifugieren in Medium A/B (Vol. Verhältnis 1/3) nachgewaschen und erneut 90 Min. bei 105000 g zentrifugiert. Diese Partikel wurden 50 Min. inkubiert. Die Extraktion der Mikrosomen mit KCl (0,05M) geschah nach der Methode von WEBSTER⁹⁾. Die quantitativen Eiweissbestimmungen erfolgten nach der von BEISENHERZ und Mitarb.¹⁹⁾ modifizierten Biuretmethode.

2. *Lösungen und Reagentien:* Medium A: Saccharose 0,35M; MgCl_2 0,004M; KCl 0,025M; Tri-hydroxymethyl-amino-methan/HCl-Puffer 0,05M, pH 7,6. Medium B: Saccharose 0,90M; MgCl_2 0,004M; KCl 0,025M.

ATP, PEP (krist. Tri-cyclohexylammoniumsalz) und PK stammten von der Firma BOEHRINGER (Mannheim), das GTP von PABST LABORATORIES (Milwaukee, Wis.), das Leucin- ^{14}C vom RADIOCHEMICAL CENTRE, Amersham, England.

Die übrigen Reagentien waren Handelspräparate vom besten erhältlichen Reinheitsgrad.

¹⁸⁾ E. B. KELLER & P. C. ZAMEČNIK, J. biol. Chemistry 227, 45, (1956).

¹⁹⁾ G. BEISENHERZ, H. J. BOLTZE, TH. BÜCHER, R. CZEK, K. H. GABARDE, E. MEYER & G. PFLEIDERER, Z. Naturforschung 86, 555 (1953).

SUMMARY

The authors describe the incorporation of radioactive aminoacids into microsomes from *Drosophila melanogaster* (*pupae*). Enzymatic incorporation can only be shown after inhibition of a very active tyrosinase, which is present in the microsomal fraction, by phenylthiourea.

The system has the following properties: (1) It requires ATP, Mg^{++} , an ATP regenerating system, but not GTP. (2) Sucrose-washed microsomes with and without addition of pH 5 enzymes incorporate to the same extent. (3) Microsomes treated with deoxycholate or 0,05M KCl incorporate less than the untreated ones, the former being nevertheless stimulated by addition of pH 5 enzymes or the pH 5 precipitate of the KCl extract. (4) Rat liver microsomes or pH 5 enzymes can be exchanged with the corresponding fraction from *Drosophila*.

Zürich, Biochemisches Institut der Universität

240. Über die Dünnschichtchromatographie von Lipiden

2. Mitteilung

Untersuchungen von Gehirngewebe aus der weissen Substanz Multiple-Sklerose-Kranker

von C. G. Honegger

(26. VII. 62)

I. Einleitung. – In einer früheren Mitteilung¹⁾ wurden Untersuchungen von Gehirnextrakten Multiple-Sklerose-Kranker und Normaler beschrieben, bei welchen das pathologische Material, ausser einigen bekannten Befunden, Anhaltspunkte über das Vorkommen noch unbekannter Stoffe lieferte. Diesen an einem kleinen Untersuchungsgut durchgeführten Versuchen lag vor allem die Fragestellung nach der *qualitativen* Zusammensetzung der verschiedenen Gehirnextrakte zugrunde, wobei sich die Dünnschichtchromatographie zur Lösung spezieller neurochemischer Fragen im Bereiche der Lipide als durchaus geeignet erwies. Gewisse Beschränkungen ihres Anwendungsbereichs können anhand folgender 4 Punkte beurteilt werden:

1. Das Trennbild eines Extraktes kann von Chromatogramm zu Chromatogramm schwanken. Beim chromatographischen Vergleich verschiedener Extrakte müssen diese also unbedingt auf derselben Platte aufgetrennt werden, oder es müssen mindestens einzelne davon jeweils als Kontrolle mitgeführt werden. Zusätzlich wird gleichzeitig ein Eichgemisch aus bekannten Lipiden mitaufgetrennt (im Falle der Auftrennung nur eines Extraktes, zur Kontrolle von Abweichungen). Bei lipidreichen Extrakten können die Wanderungswerte einzelner Komponenten infolge von Interferenzen mit Substanzen mit ähnlichen Wanderungswerten sich ändern.

¹⁾ C. G. HONEGGER, *Helv.* 45, 281 (1962).