

200. Kristallisation einer Aldolase aus Kaninchenleber

von H. Göschke und F. Leuthardt

(Kurze Mitteilung)

(3. VII. 63)

LEUTHARDT, TESTA & WOLF¹⁾ haben 1952 nachgewiesen, dass in der Leber eine Aldolase vorkommt, die sich durch ihre Spezifität von der Muskelaldolase unterscheidet (1-Phosphofruktaldolase). Sie spaltet Fructose-1-phosphat (F-1-P) mit wesentlich grösserer Geschwindigkeit als die Muskelaldolase, deren Aktivität gegen Fructose-1-phosphat sehr gering ist. PEANASKY & LARDY²⁾ haben 1958 die Kristallisation einer Aldolase aus Rinderleber beschrieben, welche gegen Fructose-1-phosphat etwa die gleiche Aktivität zeigt wie gegen Fructosediphosphat (FDP). Das Ferment erwies sich bei der Elektrophorese und der Sedimentation als einheitliches Protein. Die Isolierungsmethode der genannten Autoren besteht in einer Fraktionierung mit Methanol, Adsorption an Aluminiumhydroxid und weiterer Reinigung durch Fraktionierung mit Ammoniumsulfat. Wir haben eine wesentlich einfachere Methode zur Isolierung der Aldolase aus Kaninchenleber ausgearbeitet, die sich nur der Aussalzung durch Ammoniumsulfat bedient.

Arbeitsvorschrift. Wir verwendeten meistens die Leber männlicher Kaninchen, da dieselbe durchschnittlich bessere Ausbeuten ergibt als die Leber weiblicher Tiere. Die Leber wurde vor der Entnahme *in situ* mit isotonomischer KCl-Lösung perfundiert (die ganze Aufarbeitung im Kälteraum bei +3°) und darauf im Fleischwolf zerkleinert. Der Organbrei wurde mit 0,07M Ammoniumsulfatlösung von pH 8,6 extrahiert und die Lösung vom Rückstand durch Zentrifugieren bei 80000 g abgetrennt. Durch kurze Erwärmung des Rohextraktes auf 47° lassen sich inaktive Proteine entfernen. Die überstehende Lösung wurde auf eine Ammoniumsulfatkonzentration von 44% Sättigung gebracht und die ausgefällten Proteine verworfen. Im Überstand wurde die Ammoniumsulfatkonzentration auf 53% Sättigung erhöht, der Niederschlag abgetrennt, in zu 20% ges. Ammoniumsulfat gelöst und erneut durch Zusatz von Ammoniumsulfat bis auf 48–49% Sättigung ausgefällt. Das gleiche Verfahren wurde wiederholt. Aus den überstehenden Lösungen fiel beim Stehen ein Rohkristallisat aus (Fraktionen I, II und III der Tabelle). Dasselbe wurde in Ammoniumsulfat von 20% Sättigung bei pH 7,6 gelöst und die Ammoniumsulfatkonzentration anschliessend erhöht, bis eine schwache Trübung entstand, die rasch abzentrifugiert wurde. Die Ammoniumsulfatkonzentration wurde darauf auf 49% Sättigung erhöht. Nach 2–3tägigem Stehen kristallisierte die Aldolase in schönen Nadeln aus. Die weitere Reinigung erfolgte durch Auswaschen der Kristallsuspension nach BÜCHER («plümpern»)³⁾ nach Verdünnen der Ammoniumsulfatlösung auf 43% Sättigung und wiederholtes Umkristallisieren. Die Aktivitätsbestimmung wurde durch den optischen Test nach RACKER⁴⁾ mit BARANOWSKI-Ferment als Hilfsferment durchgeführt. Die reinsten Präparate zeigten gegen FDP eine Aktivität von 200 BÜCHER-Einheiten, gegen F-1-P von 220 BÜCHER-Einheiten. Der Gang der Reinigung ist in der Tabelle dargestellt.

Das Protein erwies sich bei der Ultrazentrifugation als einheitlich. Die graphische Darstellung nach LINEWEAVER-BURK zeigt gewisse Unregelmässigkeiten, wie sie

¹⁾ F. LEUTHARDT, E. TESTA & H. P. WOLF, *Helv.* **36**, 227 (1953).

²⁾ R. J. PEANASKY & H. A. LARDY, *J. biol. Chem.* **233**, 315 (1958).

³⁾ C. BEISENHERZ, M. J. BOLTZE, TH. BÜCHER, R. CZOK, K. H. GARBADE, E. MEYER & G. PFLIEDERER, *Z. Naturforsch.* **8b**, 555 (1953).

⁴⁾ E. RACKER, *J. biol. Chemistry* **167**, 843 (1947).

Reinigung der Kaninchenleber-Aldolase

| Fraktionen | Gesamtaktivität (BÜCHER-Einheiten) | Ausbeute | Spez. Aktivität E/mg | | | | | |
|-------------------------------|---------------------------------------|----------|-------------------------|----|-----|--------|----|-----|
| | | | FDP | | | F-1-P | | |
| Rohextrakt | 138 000 | (100%) | 7 | | | 7,9 | | |
| Extrakt nach Erwärmen auf 47° | 134 000 | 97% | 10 | | | 10,8 | | |
| Rohkristallisate I bis III | 64 000 | 46% | I | II | III | I | II | III |
| Reinferment | 31 500 | 23% | 49 | 78 | 62 | 52 | 85 | 73 |
| | | | 198*) | | | 220**) | | |

*) Substratkonzentration $4 \cdot 10^{-4}$ M

***) Substratkonzentration $4 \cdot 10^{-3}$ M

auch von PEANASKY & LARDY beobachtet worden sind. Für das Fructosediphosphat ergibt sich eine MICHAELIS-Konstante von ca. $8 \cdot 10^{-6}$ Mol/l. (PEANASKY & LARDY fanden die Werte von $3,8 \cdot 10^{-3}$ oder $3,5 \cdot 10^{-4}$ Mol/l, je nach der Berechnungsart.) Für F-1-P liegt der Wert zwischen den Grenzen 2 bis $8 \cdot 10^{-4}$ Mol/l, je nach Berechnungsart. Wir werden auf die Kinetik und die physikalischen Eigenschaften des Ferments an anderer Stelle zurückkommen.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird die Darstellung kristallisierter Aldolase aus Kaninchenleber unter ausschliesslicher Verwendung von Aussalzen durch Ammoniumsulfat beschrieben.

Aus dem Biochemischen Institut der Universität Zürich

201. Odeur et constitution XXI

Synthèses d'aldéhydes β -éthyléniques *cis*. II¹⁾

par M. Winter

(29 VI 63)

Les propriétés odorantes intéressantes de l'hexène-3-al *cis* nous ont amené à perfectionner sa synthèse et à entreprendre celle de quelques autres aldéhydes β -insaturés²⁾, et ceci suivant une variante nouvelle, représentée par le schéma, analogue dans son principe au procédé envisagé par DURAND *et al.*³⁾. L'intérêt d'une telle étude dépasse le cadre industriel, certains de ces aldéhydes pouvant fort bien exister à l'état naturel. C'est notamment le cas des nonène-3-al *cis* et nonadiène-3,6-al (tout *cis*) qui pourraient prendre naissance par autoxydation de glycérides riches en acides gras essentiels (acides linoléique, linoléique)⁴⁾.

¹⁾ Communication I sur les aldéhydes β -éthyléniques: Helv. 45, 2567 (1962).

²⁾ Les procédés décrits ici font l'objet de demandes de brevets avec priorité du 2 mai 1962.

³⁾ R. R. DURAND, L. PIAUX & Melle S. TRAVERS, C. r. hebd. Acad. Sci. 256, 1554 (1963).

⁴⁾ J. J. BRODERICK, J. Amer. Perf. Arom. 72, (5) 49 (1958).