

- [28] A. F. KRASSO, EK. WEISS & T. REICHSTEIN, *Helv.* **46**, 1691 (1963).
 [29] M. ZINGG & KUNO MEYER, *Pharmac. Acta Helv.* **32**, 393 (1957).
 [30] M. S. RAGAB, HORST LINDE & KUNO MEYER, *Helv.* **45**, 474 (1962).
 [31] C. W. SHOPPEE & T. REICHSTEIN, *Helv.* **25**, 1611 (1942).
 [32] W. NEUMANN, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **70**, 1547 (1937).
 [33] M. v. ARDENNE, *Tabellen zur Angew. Physik*, Bd. I, S. 606, 611, 725 (VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1962).
 [34] M. v. ARDENNE, K. STEINFELDER, R. TÜMLER & K. SCHREIBER, *Experientia* **19**, 178 (1963); vgl. auch M. v. ARDENNE, *Die Technik* **19**, 673 (1964).
 [35] H. B. HENBEST, G. D. MEAKINS, B. NICHOLLS & A. A. WAGLAND, *J. chem. Soc.* **1957**, 1462.
 [36] R. F. ZÜRCHER, *Helv.* **44**, 1380 (1961); **46**, 2054 (1963).
 [37] a) O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **34**, 108 (1951); b) H. HEGEDÜS, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, *Helv.* **36**, 357 (1953); c) F. KAISER, *Chem. Ber.* **88**, 556 (1955).
 [38] O. RENKONEN & O. SCHINDLER, *Helv.* **39**, 1490 (1956).
 [39] J. KRAUS & H. STEIN (C. F. BOEHRINGER G.m.b.H., Mannheim), D.B.P. 880195 (18. 6. 1953).
 [40] O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **36**, 1007 (1953).
 [41] G. WOHLLEBEN, *Angew. Chem.* **68**, 752 (1956).
 [42] M. CLOETTA, *Arch. exp. Pathol. Pharmacol.* **172**, 261 (1926); *Chem. Zbl.* **1962**, II, 771; A. WINDAUS, K. WESTPHAL & G. STEIN, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **61**, 1847 (1928).

222. Multiple Formen der Aldolase in Organextrakten der Ratte

Über Aldolasen, 8. Mitteilung¹⁾

von Ph. Christen, U. Rensing²⁾, A. Schmid und F. Leuthardt

(25. VI. 66)

Bisher waren zwei Formen der Aldolase im Säugerorganismus bekannt; das in der Leber vorkommende Enzym unterscheidet sich in seiner enzymatischen Spezifität wesentlich von der Aldolase des Skelettmuskels [2]. Beide Enzyme sind isoliert worden [3]. Es blieb unbekannt, ob die Aldolaseaktivitäten anderer Organe auf das – alleinige oder gemeinsame – Vorkommen dieser beiden bekannten Aldolasen oder auf die Existenz weiterer, unbekannter Aldolasen zurückzuführen sind [4] [5].

In der vorliegenden Mitteilung berichten wir über die Charakterisierung und Auftrennung der Aldolaseaktivitäten von Organextrakten der Ratte mittels Stärkegelelektrophorese.

Experimentelles. – 1. *Material:* Bezugsquellen: Glycinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, α -Glycrophosphat-Dehydrogenase, Triose-Isomerase, NAD, NADH, Fructose-1,6-diphosphat, Fructose-1-phosphat (beide als Cyclohexylammoniumsalze): Fa. BOEHRINGER, Mannheim; *p*-Nitroblautetrazoliumchlorid *p. a.*, Phenazin-methosulfat rein: SERVA ENTWICKLUNGS-LABOR, Heidelberg; lösliche Stärke für Gelelektrophorese: CONNAUGHT MEDICAL RESEARCH LABORATORIES, Toronto; Agar-Agar in Federkiefform: Fa. MERCK, Darmstadt.

2. *Versuchstiere:* Männliche, 8–18 Monate alte Albinoratten (*Mus norvegicus albinus*).

3. *Methoden:* 3.1. Die *Proteinkonzentration* und die *Aldolaseaktivität* der Rohextrakte wurden wie in früheren Arbeiten bestimmt [1]. Bei der Aktivitätsbestimmung wurde vor Zugabe des Substrates die spontane Extinktionsabnahme bestimmt und als Nullaktivität von der nach Substratzusatz gemessenen Aktivität abgezogen.

¹⁾ 7. Mitteilung siehe [1].

²⁾ Stipendiat der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

3.2. Die *Ratten* wurden durch Genickschlag getötet, sofort dekapitiert und durch die *Aorta thoracalis* mit folgender Lösung unter einem Druck von 100 cm Wassersäule *perfundiert*: Tris-HCl-Puffer 0,02 M, EDTA 0,01 M, Saccharose 0,3 M, pH 7,4. Nach ungefähr 5 Min. waren um die 50 ml Perfusionslösung eingelaufen, und Leber und Nieren zeigten nur noch ihre Eigenfarbe. Die Organe wurden entnommen und im Kühlraum (4°) mit der Schere fein zerkleinert. Pro g Gewebe wurde 1 ml Perfusionslösung zugegeben und das Ganze nach POTTER & ELVEHJEM mit einem Teflonpistill in Zentrifugenröhrchen aus Celluloseacetat *homogenisiert*. Das Skelettmuskelgewebe wurde pro g mit 4 ml Perfusionslösung versetzt und mit Quarzsand in einer Porzellanreibschale zerrieben. Die Homogenate wurden 45 Min. in der präparativen Ultrazentrifuge SPINCO, Modell L, bei 40000 Upm (105000 g) *zentrifugiert*. Darauf wurden die Zentrifugenröhrchen knapp oberhalb des Sedimentes angebohrt, um den Überstand unter Zurücklassung des obenauf schwimmenden Fettes ausfliessen zu lassen. Anschliessend wurden die Rohextrakte gegen 4mal 1 l Gelpuffer (s. unten) über insgesamt 6–8 Std. *dialysiert*.

3.3. Die *Stärkegelelektrophorese* wurde mit dem diskontinuierlichen Puffersystem nach POULIK [6] bei 4° durchgeführt. Das Gel wurde aus 11 g Stärke (statt der auf der Packung angegebenen 10 g) pro 100 ml Puffer hergestellt und in Plexiglaströge (20 × 15 × 1,0 cm) gegossen. Vor Verwendung wurde die Stärke auf einer Nutsche 8mal mit bidestilliertem Wasser und 2mal mit Gelpuffer gewaschen. Die Proben (20 µl) wurden auf einen Streifen WHATMAN 3 MM Papier aufgetragen und letzteres in einen vertikalen Schlitz des Gels eingeführt.

3.4. Das Gel wurde zur *Färbung* horizontal halbiert. Die obere Hälfte wurde mit Amidoschwarz 10 B gefärbt. Die untere Hälfte wurde zur *Lokalisierung der Aldolaseaktivität* verwendet. Die angewendete Aktivitätsfärbung für Aldolase ist eine Modifikation der von WILLIAMS zum Nachweis der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-Aktivität auf Stärkegel beschriebenen Methode [7]. Der Agar-Agar in Federkielform wurde vor Verwendung bei Zimmertemperatur 36 Std. mit 0,1 M Tris-HCl-Puffer von pH 7,6, der 0,001 M an EDTA war, gewaschen, darauf durch Erwärmen im Wasserbad im gleichen Puffer gelöst und die Lösung durch Glaswatte filtriert. 550 mg Fructose-1,6-diphosphat (Cyclohexylammoniumsalz), 15 mg NAD, 1,5 mg Phenazinmethosulfat, 9,0 mg *p*-Nitroblautetrazoliumchlorid, 90 mg Natriumarseniat und 112 mg EDTA wurden in 10 ml 0,1 M Tris-HCl-Puffer von pH 7,6 gelöst und zu 30 ml 2-proz. Agarlösung gegeben. 100 µl Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-Suspension (10 mg/ml) wurden erst, nachdem die Agarlösung auf 40° abgekühlt worden war, zugegeben. Sofort nach Zugabe des Enzyms wurde die untere Gelhälfte mit der Agarlösung aus einer Pipette 1–2 mm hoch überschichtet und anschliessend im Dunkeln bei 30° inkubiert, bis die blauen Banden deutlich hervortraten (1–2 Std.).

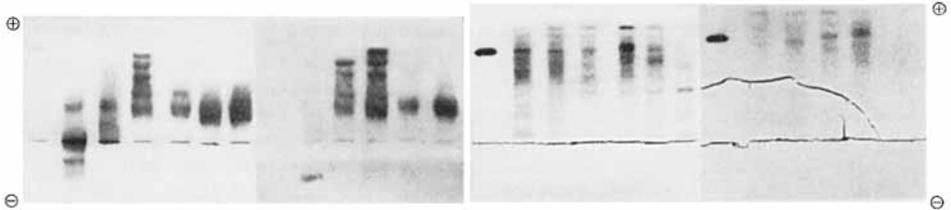
Spaltungsaktivität der dialysierten Organextrakte gegen Fructose-1,6-diphosphat und Fructose-1-phosphat

Die Werte sind für die Nullaktivität korrigiert (s. Methoden)

Organ	Aktivitäten in IUB milli-Einh./mg Protein gegenüber		Verhältnis von Fructose-diphosphat- zu Fructose-monophosphat-Aktivität
	Fructosediphosphat	Fructosemonophosphat	
Leber	62	49	1,3
Niere	22	14	1,6
Gehirn	177	klein	gross
Lunge	18	klein	gross
Herz	160	2,3	70
Muskulatur	1595	18	91
Dünndarm	18	7	2,5
Testes	38	3	12,6
Milz	9,7	0,5	19,5
retroperitoneales Fettgewebe	—	—	—

Resultate und Diskussion. – Die Tabelle zeigt die Spaltungsaktivitäten der verschiedenen Organextrakte gegenüber den beiden Substraten Fructose-1,6-diphosphat und Fructose-1-phosphat sowie das Verhältnis der zwei Aktivitäten. Die Werte sind für die unspezifische Extinktionsabnahme korrigiert und stimmen gut überein mit den Bestimmungen von BLOSTEIN & RUTTER [5].

Das Resultat der Aldolaseaktivitätsfärbung der elektrophoretisch auf Stärkegel aufgetrennten Organextrakte ist aus Figur 1 zu ersehen. Figur 2 zeigt die oberen



Hb L N G Lu H M Hb D T G Mi F Hb L N G Lu H M Hb D T G Mi F
 Fig. 1. Stärkegel nach Elektrophorese (4 V/cm, 3 mA/cm², 12 h) auf Aldolaseaktivität gefärbt (s. Methoden) Fig. 2. Obere Hälfte des Gels der Fig. 1, mit Amidoschwarz gefärbt

Hb = Cyanmethämoglobin A als Markiersubstanz, L = Leber, N = Niere, G = Gehirn, Lu = Lunge, H = Herz, M = Skelettmuskulatur, D = Dünndarm, T = Testes, Mi = Milz, F = retroperitoneales Fettgewebe

Hälften derselben Gelplatten mit Amidoschwarz gefärbt. Durch die Aktivitätsfärbung werden insgesamt 9 Banden mit unterschiedlicher elektrophoretischer Beweglichkeit sichtbar, die aber in den verschiedenen Organen in verschiedener Anzahl vertreten sind. Um sicherzustellen, dass die Färbungen wirklich spezifisch durch die Aldolaseaktivität zustande kommen, wurde das Stärkegel mit einer Agarlösung überschichtet, die alle Komponenten ausser Fructose-1,6-diphosphat, bzw. ausser Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase enthielt. Diese Kontrollgele zeigten innerhalb der Zeit, in der die Aldolasebanden sichtbar wurden, keine Anfärbung.

Ausser den bisher bekannten Aldolasen aus Skelettmuskel und aus Leber kommen also im Säugerorganismus noch weitere Formen vor, die sich z.T. zusammen im gleichen Organ nachweisen lassen. Nach der gängigen Definition sind sie deshalb als Isoenzyme zu bezeichnen [8]. Inwieweit die verschiedenen Organen entstammenden, aber gleiche elektrophoretische Beweglichkeit aufweisenden Aldolaseformen wirklich identisch sind, bleibt noch zu untersuchen. Eine Numerierung der Isoenzyme könnte daher nur provisorische Geltung haben.

Die Verschiedenheit der Isozymmuster der einzelnen Organe erklärt wahrscheinlich die unterschiedliche Hemmung der Aldolaseaktivität durch Antikörper gegen Muskelaldolase, wie sie bei Extrakten aus verschiedenen Organen nachgewiesen werden konnte [5] [9].

Versuche, die Isoenzyme aus dem Stärkegel zu eluieren und näher zu charakterisieren, sind im Gange. Die Methode der Sichtbarmachung der Aldolaseaktivität auf Stärkegel wird es erlauben, die bei der hereditären Fructose-Intoleranz veränderte Aldolaseaktivität der Leber [10] bezüglich ihrer elektrophoretischen Eigenschaften zu

untersuchen und möglicherweise mit adult oder fetal vorkommenden Isoenzymen in Beziehung zu bringen.

Diese Arbeit wurde mit Hilfe des SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG durchgeführt, dem wir dafür bestens danken.

SUMMARY

The aldolase activities of crude rat tissue extracts were separated by starch gel electrophoresis. Aldolase was located on the gel by a specific staining method. Nine bands of different electrophoretic mobility were stainable by this technique. Organ specific isoenzyme patterns could be demonstrated.

Aus dem Biochemischen Institut der Universität Zürich
Zürichbergstrasse 4, 8032 Zürich

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] A. SCHMID, PH. CHRISTEN & F. LEUTHARDT, *Helv.* **49**, 281 (1966).
- [2] F. LEUTHARDT, E. TESTA & H. P. WOLF, *Helv.* **36**, 227 (1953); H. G. HERS & T. KUSAKA, *Biochim. biophysica Acta* **11**, 427 (1953).
- [3] O. WARBURG & W. CHRISTIAN, *Biochem. Z.* **314**, 149 (1943); R. J. PEANASKY & H. A. LARDY, *J. biol. Chemistry* **233**, 365 (1958); H. GÖSCHKE & F. LEUTHARDT, *Helv.* **46**, 1791 (1963).
- [4] H. P. WOLF & F. LEUTHARDT, *Helv.* **40**, 1033 (1957).
- [5] R. BLOSTEIN & W. J. RUTTER, *J. biol. Chemistry* **238**, 3280 (1963).
- [6] M. D. POULIK, *Nature* **180**, 1477 (1957).
- [7] R. A. D. WILLIAMS, *Nature* **203**, 1070 (1964).
- [8] C. L. MARKERT & F. MOLLER, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **45**, 753 (1959); E. WEBB, *Nature* **203**, 821, (1964).
- [9] W. GLOBIG, D. MATZELT, G. SCHWICK & K. STÖRIKO, *Clin. chim. Acta* **12**, 477 (1965).
- [10] H. G. HERS & G. JOASSIN, *Enzym. biol. Clin.* **7**, 4 (1961); E. A. NIKKILA, O. SOMERSALO, E. PITKÄNEN & J. PERHEENTUPA, *Metabolism* **11**, 727 (1962); H. P. WOLF & E. R. FROESCH, *Biochem. Z.* **337**, 328 (1963).

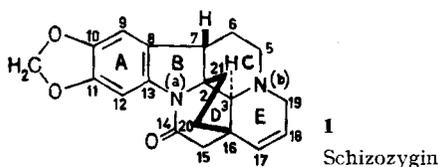
223. Die Massenspektren von Schizozygin und dessen Derivaten

4. Mitteilung über das massenspektrometrische Verhalten quartärer Stickstoffverbindungen [1]

von M. Hesse und U. Renner

(25. VI. 66)

In einer früheren Mitteilung wurde über die Strukturableitung des Hauptalkaloides Schizozygin (1) aus *Schizozygia coffaeoides* (BOJ.) BAILL. berichtet [2]. Ausser der Molekulargewichtsbestimmung [2] wurden in dieser Arbeit keine weiteren



massenspektrometrischen Untersuchungsergebnisse diskutiert. Da bei der Struktur-
aufklärung von Schizozygin eine Reihe von Hofmann-Abbaureaktionen durchgeführt