

- [28] W. RITTEL, A. HUNGER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **35**, 434 (1952); A. HUNGER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **33**, 76, 1993 (1950).
- [29] J. E. MURPHY, *J. Amer. pharmaceut. Assoc. (Sci. Ed.)* **46**, 170 (1957); D. SATOH, T. WADA & T. OKUMURA, *J. pharmaceut. Soc. Japan* **76**, 1334 (1956); F. KAISER, E. HAACK & H. SPINGLER, *Liebigs Ann. Chem.* **603**, 75 (1957).
- [30] C. JUSLÉN, W. WEHRLI & T. REICHSTEIN, *Helv.* **46**, 117 (1963), bes. Fussn. 21.
- [31] O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **35**, 730 (1952); H. R. BOLLIGER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **36**, 302 (1953).
- [32] U. EPPENBERGER, H. KAUFMANN, W. STÖCKLIN & T. REICHSTEIN, *Helv.* **49**, 1492 (1966).
- [33] A. STOLL & W. KREIS, *Helv.* **16**, 1049 (1933).
- [34] D. SATOH, H. ISHII, Y. OYAMA, T. WADA & T. OKUMURA, *Chem. pharmaceut. Bull. (Japan)* **4**, 284 (1956); A. OKANO, *ibid.* **5**, 257 (1957); F. KAISER, *Experientia* **21**, 575 (1965).
- [35] W. KLYNE, *Proc. biochem. Soc., Biochem. J.* **47**, XLI (1950).
- [36] H. BUDZIKIEWICZ, C. DJERASSI, D. H. WILLIAMS, «Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry», Vol. II, Holden-Day, San Francisco 1964, S. 110 ff.
- [37] M. S. BHACCA & D. H. WILLIAMS in: «Application of NMR Spectroscopy in Organic Chemistry», Holden-Day, San Francisco 1964, S. 87–88.
- [38] Siehe [37], S. 19 ff.
- [39] D. SATOH, S. KOBAYASHI & M. HORIE, *Chem. pharmaceut. Bull. (Japan)* **14**, 552 (1966); D. SATOH & S. KOBAYASHI, *ibid.* **15**, 248 (1967).
- [40] D. SATOH, *Chem. pharmaceut. Bull. (Japan)* **8**, 270 (1960).
- [41] D. SATOH, H. ISHII, Y. OYAMA & T. OKUMURA, *Chem. pharmaceut. Bull. (Japan)* **10**, 43 (1962).
- [42] D. SATOH, H. ISHII, Y. OYAMA & T. OKUMURA, *J. pharmaceut. Soc. Japan* **75**, 1573 (1955); D. SATOH, H. ISHII & Y. OYAMA, *Chem. pharmaceut. Bull. (Japan)* **8**, 657 (1960); H. ISHII, *ibid.* **9**, 411 (1961); **10**, 351, 354 (1962); D. SATOH, *Annu. Rep. Shionogi Res. Lab., Osaka (Japan)*, No. **14**, 14 (1964).
- [43] A. LARDON & T. REICHSTEIN, *Helv.* **45**, 943 (1962).
- [44] Protonenresonanz-Spektrum unveröffentlicht.

## 137. Über die Aldolase aus *Drosophila melanogaster*

12. Mitteilung über Aldolasen<sup>1)</sup>

von O. Brenner-Holzach und F. Leuthardt

(13. V. 67)

Im Zusammenhang mit unseren Arbeiten über die Biosynthese der Pterine aus *Drosophila melanogaster* [2], besonders über die Herkunft der Seitenkette im Drosoplerin und im Biopterin, interessierte uns die Natur der in den Fliegen vorkommenden Aldolase. Schon die ersten Versuche zeigten im Rohextrakt von Puppen eine so grosse Aktivität gegen FDP [3] [4] (20–30 BE/mg Protein)<sup>2)</sup>, dass uns eine weitere Reinigung und Charakterisierung des Enzyms als sinnvoll erschien.

*Extraktion der Aldolase:* *Drosophila*-Puppen wurden in 0,1 M Tris-Puffer pH 7,2 [5] homogenisiert, bei 20000 UpM zentrifugiert und ergaben im Rohextrakt regelmässig eine spezifische Aktivität von ca. 20–30 BE/mg Protein. Versuche mit 2-proz. Ammo-

<sup>1)</sup> 11. Mitteilung: RENSING *et al.* [1].

<sup>2)</sup> Abkürzungen: BE = BÜCHER-Einheiten [4], FDP = Fructose-1,6-diphosphat, F-1-P = Fructose-1-phosphat, TIM = Triosephosphat-Isomerase, NADH = reduziertes Nicotylamid-Adenin-Dinucleotid.

niumsulfat als Extraktionsmittel [6] führten zu geringerer Aktivität des Rohextraktes. Da sich die Extrakte im Laufe der Aufarbeitung infolge der Tyrosinase-Aktivität dunkel färbten, wurde versucht, die Tyrosinase durch Zugabe von Phenylthioharnstoff zu inaktivieren. Es zeigte sich aber, dass der der Extraktion nachfolgende Hitzeschritt in Gegenwart von Phenylthioharnstoff zu einer Inaktivierung der Aldolase führte; daher wurde von der Eliminierung der Tyrosinase Abstand genommen.

Es stellte sich bei einer Versuchsserie mit verschiedenaltigen Puppen heraus, dass die Aldolase-Aktivität in ganz jungen Puppen (am ersten Puppentag) am höchsten ist. Es wurden aus diesem Grunde möglichst nur eintägige Puppen verwendet. Zur Gewinnung grösserer Mengen Ausgangsmaterials wurden die Puppen bis zur Aufarbeitung bei 4° im Eisraum aufbewahrt, wobei sie im Laufe von 2–3 Tagen nur geringfügig Aktivität verloren.

*Versuche am Rohextrakt:* Die Aktivität des Rohextraktes erfuhr durch Zusatz von Komplexon keine Hemmung, das heisst, die *Drosophila*-Aldolase ist nicht metallabhängig, entspricht also den Aldolasen der Klasse I [7]. Zur selben Schlussfolgerung führten Versuche über das pH-Optimum. Im Gegensatz zur Klasse II, die ein sehr schmales, ausgeprägtes pH-Optimum aufweist, zeigt die *Drosophila*-Aldolase ein breites pH-Optimum, das sich von ca. 6,8–8,0 erstreckt (Fig. 1).

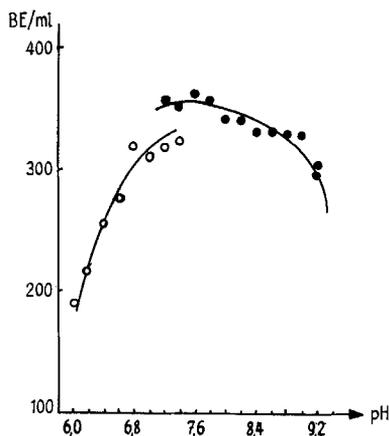


Fig. 1. *pH-Optimum der Drosophila-Aldolase*

Ansätze: 0,25 ml 1 M Tris-Maleat-Puffer pH 6,0–7,4 bzw. 1 M Tris-Puffer pH 7,2–9,5, 0,25 ml NADH 0,003 M, 0,05 ml FDP 0,02 M, 0,01 ml TIM 10 mg/ml, 0,02 ml Aldolase, H<sub>2</sub>O *ad* 2,5 ml.  
○ Tris-Maleat ● Tris

Die Diskontinuität bei pH 7,2 bzw. 7,4 rührt von der Verwendung verschiedener Puffer her.

Na<sup>+</sup>- und NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Ionen haben in Konzentrationen von 10<sup>-5</sup> bis 10<sup>-2</sup> M keinen Einfluss auf die Aktivität der *Drosophila*-Aldolase, höhere Konzentrationen hemmen sie (Fig. 2). Auch diese Resultate sind für Aldolasen der Klasse I charakteristisch [7].

*Reinigung der Drosophila-Aldolase:* Als erste Reinigungsstufe wählten wir einen Hitzeschritt, bei welchem die Aldolase, während 20 Minuten auf 47° gehalten, eine Steigerung ihrer spezifischen Aktivität um ca. 50% erfuhr. Wenn auch die Aktivi-

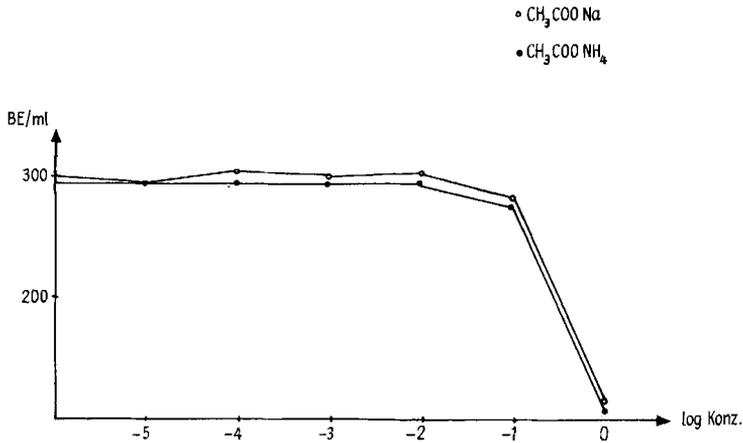


Fig. 2. Einfluss von  $\text{Na}^+$ - und  $\text{NH}_4^+$ -Ionen auf die Aktivität der *Drosophila*-Aldolase

Ansätze: 0,25 ml Tris-Puffer pH 7,6, 0,25 ml NADH 0,003 M, 0,05 ml FDP 0,02 M, 0,01 ml TIM 10 mg/ml, 0,02 ml Aldolase, 0,5 ml Salzlösung  $5\text{M} - 5 \cdot 10^{-5}\text{M}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  ad 2,5 ml.

tätssteigerung dabei nicht extrem gross ist, so konnten doch damit gleichzeitig trübende Bestandteile des Extrakts, die sich auch durch hochtourige Zentrifugation nicht entfernen liessen, eliminiert werden. Im weiteren wurde mit Ammoniumsulfat fraktioniert. Die Fällung zwischen 43% und 58% Ammoniumsulfat-Sättigung ergab eine spezifische Aktivität von bis 85 BE/mg Protein. Durch weitere Fraktionierung dieses Anteils, sowie durch «Plümpern» konnte keine wesentliche Steigerung der Aktivität mehr erreicht werden.

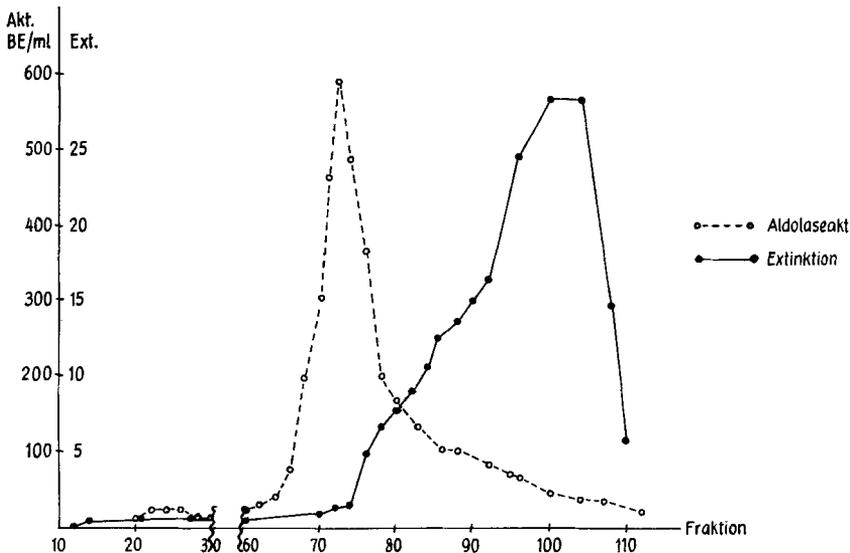


Fig. 3. Reinigung der *Drosophila*-Aldolase ( $R_{43-58}$ ) an DEAE Sephadex A 50

Es erwies sich im übrigen als günstig, die während 2–3 Tagen anfallenden Puppen jeweils bis zu dieser Stufe von 43–58% Ammoniumsulfat-Sättigung aufzuarbeiten. Der Aktivitätsverlust beim Aufbewahren des Rückstandes  $R_{43-58}$  bei 2–4° war gering.

Die weitere Reinigung erfolgte an Sephadexsäulen. An DEAE Sephadex A 50 konnte eine Steigerung der Aktivität um ungefähr das Zehnfache erreicht werden (bis ca. 800–1000 BE/mg Protein). Die meisten Begleitproteine blieben an der Säule haften (Fig. 3).

Die hinter der Aldolase ausfliessende, sich zum Teil mit ihr überschneidende Substanz, die ebenfalls bei 280 nm absorbiert, konnte als Harnsäure identifiziert werden. Es scheint, dass die Harnsäure vorerst äusserst stark an die Proteine gebunden ist, so dass sie auch durch längerdauernde Dialyse vor der Reinigung an DEAE Sephadex nicht abgetrennt werden kann. Bei der der Chromatographie an DEAE Sephadex folgenden Ultrafiltration liess sich die noch im Aldolase-Pik vorhandene Harnsäure vollständig entfernen.

Eine nachfolgende Reinigung an Sephadex G 200 setzte die Aktivität nochmals um 50–60% hinauf (bis auf 1300–1400 BE/mg Protein) (Fig. 4).

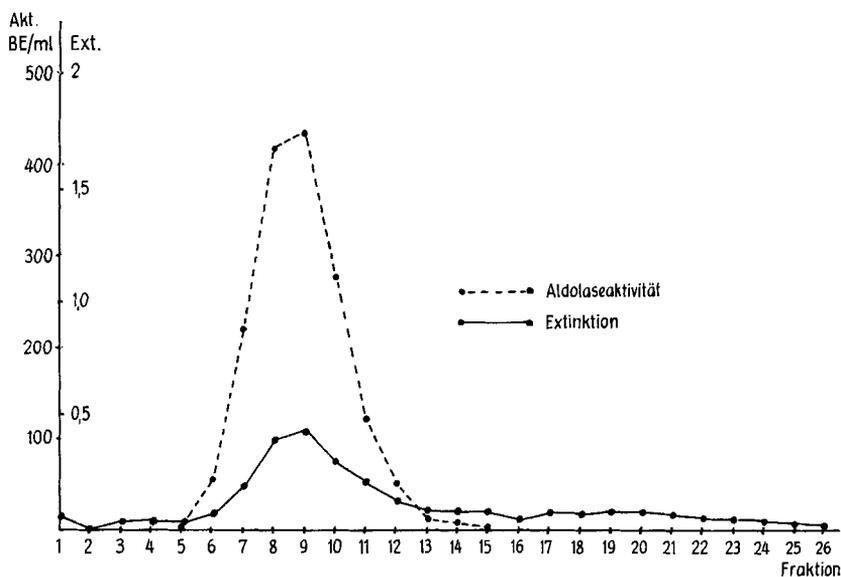


Fig. 4. Reinigung der *Drosophila*-Aldolase an Sephadex G 200

Die Reinigung über alle Stufen ist ca. 65-fach. Bei der Stärkegel-Elektrophorese [8] konnte nur noch *eine* Bande nachgewiesen werden. Aus ca. 50 g Puppen wurden ca. 5 mg gereinigte Aldolase erhalten.

*Versuche an gereinigter Aldolase:* Das Verhältnis der Aktivitäten der gereinigten Aldolase gegen FDP und F-1-P betrug bei Substratsättigung FDP/F-1-P = 10 bis 15; es liegt also zwischen den für Muskelaldolase (FDP/F-1-P = 50 bis 100) und Leberaldolase (FDP/F-1-P = 1 bis 2) gefundenen Verhältnissen [7].

Die Bestimmung der MICHAELIS-Konstanten ergab gegen FDP für die Fällung 43–58% Ammoniumsulfat-Sättigung  $2,3 \cdot 10^{-5}$  M, nach Reinigung an DEAE Sepha-

dex A 50 und Sephadex G 200  $2,7 \cdot 10^{-5}M$ . Gegen F-1-P wurde mit der gereinigten Aldolase eine MICHAELIS-Konstante von  $1,85 \cdot 10^{-2}M$  erhalten.

In der Ultrazentrifuge konnte nach der Reinigung an DEAE Sephadex A 50 und Sephadex G 200 nur noch *ein* Pik festgestellt werden. Es ergab sich aus mehreren Versuchen eine mittlere Sedimentationskonstante von 4,67 S. Auf Grund der ermittelten entsprechenden Diffusionskonstanten von  $3,17 \cdot 10^{-7}$  und  $3,60 \cdot 10^{-7}$  liess sich ein Molekulargewicht von 120000–130000 abschätzen, was in der Grössenordnung demjenigen von Kaninchen-Leber- und -Muskel-Aldolase entsprechen würde. Vergleichende Versuche mit gereinigter Aldolase in nativem Zustand und in 4M Harnstoff ergaben folgende Sedimentationskonstanten: Nativ 4,7 S; in 4M Harnstoff 0,71 S. Dieses Verhalten ist demjenigen von Kaninchen-Muskel- und -Leber-Aldolase ähnlich, und es darf daher vermutet werden, dass die (FDP)-Aldolase der *Drosophila* ebenfalls aus Untereinheiten besteht.

Bei der Inkubation mit Carboxypeptidase wird die Aktivität der Kaninchen-Muskeldolase gegen FDP auf ca. 5% herabgesetzt. Diese Inaktivierung ist bedingt durch die Abspaltung von 3 Tyrosinresten pro Molekel. Leberaldolase verliert nur ungefähr die Hälfte der Aktivität unter dem Einfluss der Carboxypeptidase. Bei unserer Aldolase sank bei Inkubation mit Carboxypeptidase die Aktivität gegen FDP innerhalb von 30 Minuten auf 5–8% der Ausgangsaktivität (Fig. 5).

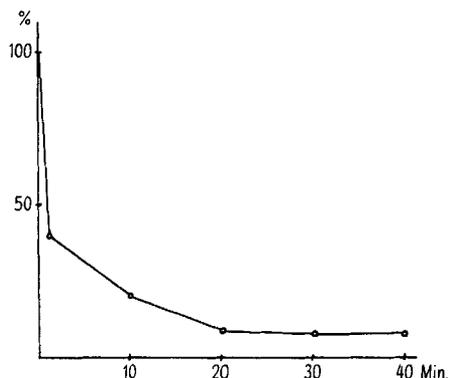


Fig. 5. Einfluss der Carboxypeptidase A auf die Aktivität der *Drosophila*-Aldolase

Ansätze: 0,25 ml Tris pH 7,6, 0,25 ml NADH 0,003M, 0,05 ml FDP 0,02M, 0,01 ml TIM 10 mg/ml, 0,02 ml Aldolase + Carboxypeptidase (im Gewichtsverhältnis 100:1 bei 0°, 0–40 Min. vorinkubiert), H<sub>2</sub>O ad 2,5 ml.

Im Gegensatz zur Muskeldolase, bei welcher die Aktivität gegen F-1-P unter Einwirkung von Carboxypeptidase nicht verändert wird, ergaben vorläufige Versuche mit *Drosophila*-Aldolase nach 30-minütiger Inkubation mit Carboxypeptidase einen Abfall der Aktivität gegen F-1-P auf ca. 35%.

*Stabilität der Drosophila-Aldolase:* Während sich die 43–58%-Ammoniumsulfat-Fällung ohne wesentlichen Aktivitätsabfall über Wochen bei 2–4° aufbewahren liess, erwiesen sich die höher gereinigten Fraktionen als äusserst labil. Bei 2–4° in Pufferlösung gehalten, erlitten sie eine rasche Aktivitätsverminderung. Bei –30° war die Aktivität während einiger Wochen einigermaßen stabil.

*Isoenzyme:* Im Rohextrakt liessen sich nach Elektrophorese an Stärke-Gel [8] oder auf Celluloseacetat-Folien [9], bei welchen die Isoenzyme der Aldolase direkt sichtbar gemacht werden können, neben der Hauptbande noch 1–2 schwächere Nebenbanden nachweisen, die aber nicht genauer untersucht werden konnten (Fig. 6).

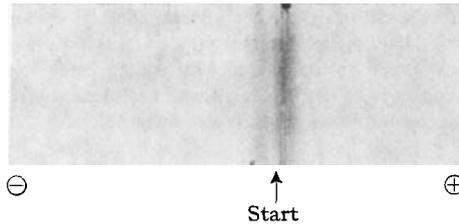


Fig. 6. Elektrophorese von *Drosophila*-Rohextrakt an Celluloseacetat-Folien

Die *Drosophila*-Aldolase entspricht in ihren wesentlichen Eigenschaften dem Typus A von RUTTER (Muskelaldolase), nur ist das Aktivitätsverhältnis FDP/F-1-P kleiner als bei der letzteren.

**Experimentelles.** 1. *Zucht der Drosophila-Puppen:* Die Drosophilen wurden auf einem Gemisch von Mais, Zucker und Agar [10] in Standgläsern von 25 cm Durchmesser und 25 cm Höhe gezüchtet. Die Puppen für die Aldolaseversuche wurden möglichst jung, meistens am ersten Puppentag, aus den Zuchtgläsern herausgenommen und auf einer Nutsche gewaschen.

2. *Herstellung der Rohextrakte:* Das Puppenmaterial wurde im Mörser mit 27,5 ml 0,1 M Tris-Puffer pH 7,2 pro 10 g homogenisiert und das Homogenat von den festen Bestandteilen abzentrifugiert [5].

3. *Die Bestimmung der Aldolaseaktivität* erfolgte durch den optischen Test mit  $\alpha$ -Glycerophosphat-Dehydrogenase und Triose-Isomerase als Hilfsenzyme (RACKER [3], BEISENHERZ [4]) bei 25°. Als Puffer verwendeten wir Trishydroxymethylaminomethan, Endkonz. 0,1 M, pH 7,6.

4. *Bestimmung der Proteinkonzentration:* In den unreineren Fraktionen wurde die Proteinkonzentration mittels der Biuret-Methode [4] gemessen. Von den reineren Fraktionen bestimmten wir die Extinktion bei 280 nm. Vergleichende Proteinbestimmungen an reinsten Fraktionen nach Gelfiltration an Sephadex G 200 ergaben für einen Proteingehalt von 0,95 mg nach der Biuret-methode eine Extinktion von 1,0. Es wurde daher bei Verwendung des Extinktionswertes zur Berechnung der Proteinmenge mit einem Faktor von 0,95 auf mg Protein umgerechnet.

5. *Reinigung der Aldolase:* Die Ammoniumsulfat-Fällung 43–58% wurde in möglichst wenig Tris-Puffer 0,1 M, pH 7,4 gelöst, während 4–6 Std. gegen denselben Puffer dialysiert und dann auf eine Säule von DEAE-Sephadex A 50 aufgetragen (für ca. 150–200 mg Protein verwendeten wir eine Säule von 1,5 cm Durchmesser und 35 cm Höhe). Es wurde während ca. 4–6 Std. mit 0,1 M Tris-Puffer pH 7,4 durchgewaschen. Darauf eluierten wir die Aldolase mit 0,4 M Tris-Puffer pH 7,4.

Die an DEAE-Sephadex A 50 vorgereinigte Aldolaselösung, die durch Ultrafiltration auf ca. 3 ml konzentriert worden war, wurde auf eine Säule (Durchmesser 0,9 cm. Länge 60 cm) von Sephadex G 200 aufgezogen und mit 0,05 M Tris-Puffer pH 7,2 eluiert.

6. *Die Sedimentations- und Diffusionskoeffizienten* wurden mit der analytischen Ultrazentrifuge SPINCO, Modell E (Rotor AND, Phasenplatte als Schlierenanalysator, RAYLEIGH Optik), bestimmt. Alle Bestimmungen wurden bei 5° in 0,05 M Tris pH 7,2 durchgeführt.

7. *Das Verhalten der Aldolase in 4 M Harnstoff* wurde zuerst im optischen Test geprüft: Vorinkubation der Aldolase im Tris-Puffer + NADH mit 4 M Harnstoff (Endkonz.). Darauf wurde die Reaktion durch Zugabe von TIM und FDP ausgelöst. Es zeigte sich dabei, dass schon bei 2 Min. Vorinkubation die Aktivität der Aldolase auf ein Viertel gesunken war.

In der Ultrazentrifuge wurde in 0,05 M Acetatpuffer + 0,2 M NaCl mit und ohne 4 M Harnstoff (Endkonz.) bei 5° gearbeitet (UZ SPINCO, Modell E, Rotor AND, Phasenplatte als Schlierenanalysator, RAYLEIGH Optik).

8. *Inkubation mit Carboxypeptidase*: Die Carboxypeptidase A wurde bei 3° in 10-proz. LiCl gelöst. Von dieser Lösung wurde ein dem Gewichtsverhältnis Aldolase : Carboxypeptidase = 100:1 entsprechendes Volumen in die Reaktionslösung einpipettiert. Inkubation bei 0° im Eisbad.

9. *Isoenzyme*: Ihr Nachweis erfolgte nach CHRISTEN *et al.* [8] mittels Gelelektrophorese und nach PENHOET [9] an Celluloseacetat-Folien.

Die vorliegende Arbeit wurde mit Hilfe des SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS FÜR WISSENSCHAFTLICHE FORSCHUNG durchgeführt, dem wir unseren besten Dank aussprechen. Herrn MAX FRISCH möchten wir für seine Mithilfe bei der Durchführung der Versuche ebenfalls bestens danken. Die Bestimmungen von Sedimentation und Diffusion in der Ultrazentrifuge wurden von Herrn A. SCHMID, die Elektrophoresen an Stärkegel und Celluloseacetat-Folien von Dr. PH. CHRISTEN und Dr. U. RENSING in verdankenswerter Weise ausgeführt.

#### SUMMARY

Fructose 1,6-diphosphate aldolase has been extracted from *Drosophila m.* and has been purified about 65-fold. After precipitation with ammonium sulfate, purification on DEAE Sephadex A 50 and Sephadex G 200, we have obtained activities as high as 1350 BÜCHER units/mg protein (12,3 international units). As *Drosophila* aldolase is not dependent on metal ions (not influenced by EDTA) and has a broad pH optimum, it belongs to class I aldolases according to RUTTER's classification. The  $K_M$  values for both substrates FDP and F-1-P closely resemble those of the rabbit muscle enzyme [A], but the FDP/F-1-P activity ratio at substrate saturation is only 10 to 15, *i.e.* considerably lower than that of rabbit muscle aldolase.

Biochemisches Institut  
der Universität Zürich

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] U. RENSING, A. SCHMID & F. LEUTHARDT, *Z. physiol. Chem.* 348 (1967), im Druck.
- [2] O. BRENNER-HOLZACH & F. LEUTHARDT, *Helv.* 48, 1569 (1965); *Z. physiol. Chem.* 348, 605 (1967).
- [3] E. RACKER, *J. biol. Chemistry* 167, 843 (1947).
- [4] G. BEISENHERZ, H. J. BOLTZE, TH. BÜCHER, R. CZOK, K. H. GARBADE, E. MEYER-ARENDE & G. PFLEIDERER, *Z. Naturforsch.* 8b, 555 (1953).
- [5] S. D. PARZEN & A. S. FOX, *Biochim. biophysica Acta* 92, 465 (1964).
- [6] H. GÖSCHKE & F. LEUTHARDT, *Helv.* 46, 1791 (1963).
- [7] W. J. RUTTER, *Fed. Proc.* 23, 1248 (1964).
- [8] PH. CHRISTEN, U. RENSING, A. SCHMID & F. LEUTHARDT, *Helv.* 49, 1872 (1966).
- [9] E. PENHOET, T. RAJKUMAR & W. J. RUTTER, *Proc. nat. Acad. Sci.* 56, 1275 (1966).
- [10] O. BRENNER-HOLZACH & F. LEUTHARDT, *Helv.* 44, 1480 (1961).