

126. Reinigung und Kristallisation der Aldolase aus *Drosophila melanogaster*

14. Mitteilung über Aldolasen [1]

VON **O. Brenner-Holzach** und **F. Leuthardt**

Biochemisches Institut der Universität Zürich

(15. V. 68)

Summary. A method for the preparation of pure crystalline aldolase (type A) from pupae of *Drosophila melanogaster* is described.

In einer früheren Mitteilung [2] beschrieben wir die Isolierung und Reinigung der Aldolase aus *Drosophila melanogaster* sowie verschiedene ihrer Eigenschaften. Es handelt sich um eine Aldolase des Typus A (Muskelaldolase) [3]. In der Folge versuchten wir, die Reinigung zu vereinfachen und für die Aufarbeitung grösserer Mengen Aldolase zu adaptieren. Bei den früheren Versuchen [2] gewannen wir die Rohaldolase durch Ammoniumsulfatfraktionierung bei 2–4° und erhielten für die Fraktion 43–58% Ammoniumsulfatsättigung spezifische Aktivitäten von 60–80 BÜCHER-Einheiten pro mg Protein. Später kamen wir auf höhere spezifische Aktivitäten, wenn wir die ganze Aufarbeitung bei Zimmertemperatur durchführten. Es erwies sich dabei die Fraktion zwischen 42 und 55% Ammoniumsulfatsättigung als die spezifisch aktivste; sie ergab ziemlich regelmässig 90–110 BÜCHER-Einheiten pro mg Protein. Wir gingen für die Herstellung der Rohaldolase immer von 50–60 g Puppen aus, die nicht länger als 2–3 Tage bei 2–4° aufbewahrt worden waren. Versuche, die Puppen statt im Mörser zu zerreiben, in einem BÜHLER-Homogenisator zu homogenisieren, führten zu stark grün gefärbten Extrakten. Die daraus erhaltenen Enzympräparate zeigten graugrüne Färbung und waren sehr schlecht löslich. Es ist dies vermutlich auf eine erhöhte Extraktion von Tyrosinase und damit vermehrte Bildung von Melaninen zurückzuführen. Homogenisierung im Mörser führte dagegen bei gleichbleibender Totalausbeute an Aldolaseaktivität auch mit grossen Mengen Ausgangsmaterial zu nur wenig gefärbten, sehr gut löslichen Präparaten der Rohaldolase.

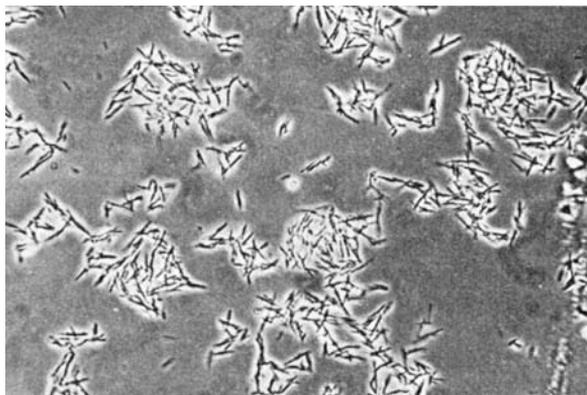
Die bei Zimmertemperatur aufgearbeitete Rohaldolase zeigte bei der anschliessenden Reinigung an DEAE-Sephadex A 50 noch einen weiteren Vorteil: Bei früheren Versuchen [2] konnte die Hauptmenge des Enzyms, welches mit 0,1M Trispuffer pH 7,4 auf die Säule aufgezogen worden war, erst mit höhermolekularem Trispuffer wieder eluiert werden. Es erschien allerdings schon mit 0,1M Tris eine sehr kleine, aktive Fraktion, die sich bei der Sedimentation in der Ultrazentrifuge gleich verhielt wie die Hauptfraktion. Bei dem bei Zimmertemperatur aufgearbeiteten Roh-Enzym hingegen wird die gesamte Aldolaseaktivität bereits mit 0,1M Trispuffer eluiert, und die Abtrennung derselben von der nachfolgenden Harnsäure ist bedeutend besser. Es wurden dabei spezifische Aktivitäten von 900–1100 BÜCHER-Einheiten (BE) pro mg Protein erreicht (Spitzenaktivität 1340 BE/mg Protein = 12,2 Internationale Einheiten; 1 BE = 0,0091 Internationale Einheiten (IE)).

Die darauffolgende Reinigung an Sephadex G 200 führte auf durchschnittliche Aktivitäten von ca. 1650 BÜCHER-Einheiten pro mg Protein (Spitzenaktivität 1868 BE/mg Protein = 17,0 Internationale Einheiten).

Die Reinigungsschritte wurden laufend mit Hilfe der «Disc»-Elektrophorese [4] kontrolliert. Nach der Reinigung an Sephadex G 200 konnte nur noch bei Verwendung relativ grosser Mengen Protein (30–50 μg) Spuren einer Verunreinigung gefunden werden.

Bei der beschriebenen Aufarbeitung (vgl. Fraktionierungsschema) konnten wir ziemlich regelmässig aus ca. 100 g *Drosophila*-Puppen 10–15 mg gereinigte Aldolase von der spezifischen Aktivität um 1600 BE/mg Protein gewinnen.

Es gelang uns in der Folge, die gereinigte und mittels Ultrafiltration auf eine Konzentration von ca. 10 mg Protein pro ml gebrachte Aldolase zu kristallisieren. Die in 0,4M Trispuffer gelöste Aldolase wurde in Portionen von 1–2 ml unter Rühren mit einem kleinen Magnetrührer mit Ammoniumsulfat versetzt, bis eine schwache Trübung entstand (ca. 40% Sättigung). Die Trübung wurde sofort abzentrifugiert. Bei weiterem Zusatz bis ca. 43% Sättigung entstanden kurze Nadelchen, gemischt mit kugeligen Kristallaggregaten. Liess man hingegen nach der Zentrifugation das Überstehende einige Tage stehen oder gab nur noch wenig Ammoniumsulfat zu, so entstanden sehr lange, feine Nadeln. Eine Umkristallisation ergab kurze, kräftige Nadeln (siehe Fig.). Die spezifische Aktivität der Aldolase konnte durch die Kristallisation nicht mehr erhöht werden.



Kristallisierte Aldolase aus Puppen von Drosophila melanogaster

Es sind aus der Literatur nur wenige Arbeiten über Insekten-Aldolasen bekannt [5] [6]. Bei allen diesen Untersuchungen wurden nur Rohextrakte verwendet [6] oder die Anwesenheit der Aldolase indirekt bewiesen [5]. Mit dem Enzym aus der *Drosophila* wurde unseres Wissens zum ersten Mal eine Insekten-Aldolase im reinen, kristallisierten Zustand erhalten.

Wie wir schon in unserer früheren Arbeit [2] erwähnten, ist die Aldolase aus *Drosophila*, sobald sie einen gewissen Reinheitsgrad erreicht hat, äusserst labil, selbst in Gegenwart von Äthylendiamintetraacetat (Komplexon) und Mercaptoäthanol. Roh-Aldolase (42–55% Ammoniumsulfatsättigung) behält als Fällung bei 2–4° ihre Aktivität während Wochen. Dagegen bleiben an DEAE Sephadex A 50 und Sephadex G 200

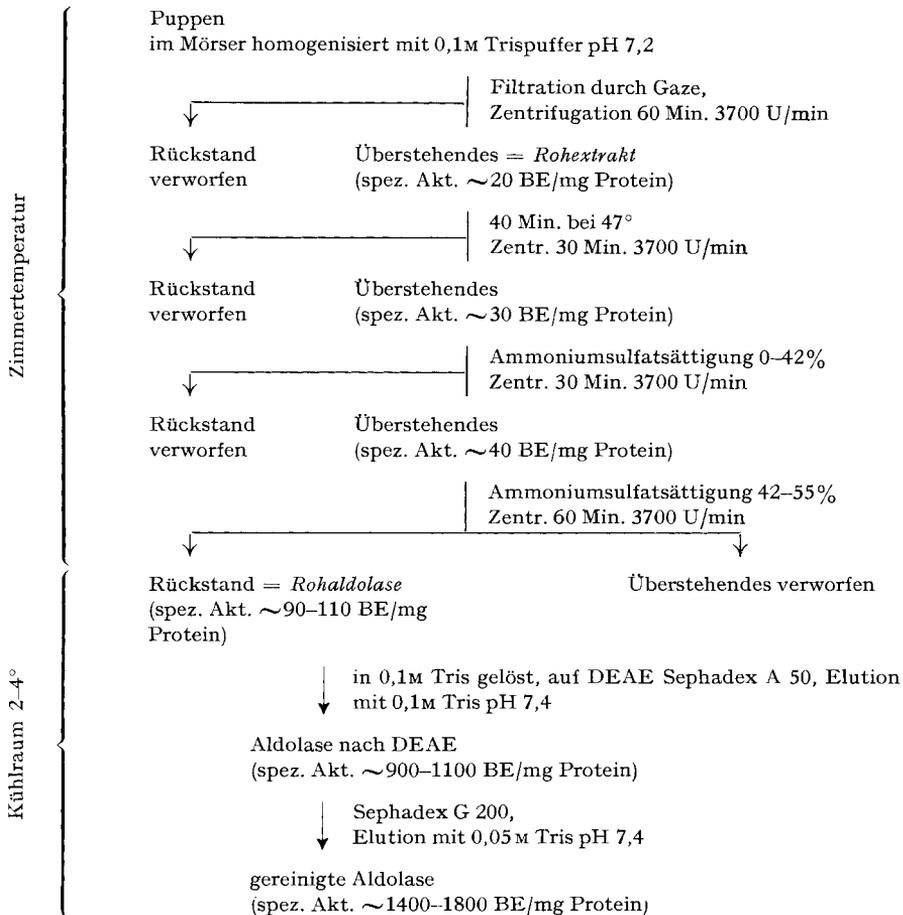
gereinigte Aldolasen in verdünnter (einige μg Protein/ml) und konzentrierter Lösung (einige mg Protein/ml) bei 2–4° nur während ca. 10–20 Tagen voll aktiv. Konzentrierte Lösungen lassen sich auch bei –20° nur während ca. einem Monat ohne Aktivitätsverlust aufbewahren, während verdünnte Lösungen in eingefrorenem Zustand ihre Aktivität rasch verlieren. Kristalline Aldolase, als Suspension in 57-proz. Ammoniumsulfat, bleibt während ca. 3 Wochen voll aktiv. Die Labilität der Aldolase kann sich beim Kristallisieren störend auswirken; die Kristallisation muss deshalb in möglichst kurzer Zeit zu Ende geführt werden.

Experimentelles

1. *Zucht der Drosophila-Puppen*: Siehe [2].
2. *Herstellung der Rohextrakte*: Es wurden pro Ansatz 50–60 g eintägige Puppen (die während 2–3 Tagen gesammelt und bei 2–4° aufbewahrt worden waren) mit 140–168 ml 0,1M Trispuffer pH 7,2 in einem Mörser homogenisiert. Das Homogenat filtrierte wir durch Gaze; das Filtrat wurde durch Zentrifugation (60 Min. bei 3700 U/min) von den festen Bestandteilen befreit.
3. *Reinigung der Aldolase*: Der Rohextrakt wurde unter leichtem Umrühren 40 Min. bei 47° gehalten, wobei ziemlich viele Proteine ausfielen. Nach der Zentrifugation war das Überstehende meist klar und gelb gefärbt. Die bei der Ammoniumsulfatsättigung von 0–42% ausfallenden Proteine zeigten wenig Aldolaseaktivität und wurden verworfen. Die zwischen 42 und 55% Ammoniumsulfatsättigung ausfallende Enzymfraktion diente zur weiteren Reinigung (Rohaldolase). Dazu wurde die Rohaldolase meist von zwei Ansätzen (entsprechend ca. 100 g Puppen oder 500 bis 600 mg Protein) in möglichst wenig Tris-Puffer 0,1M pH 7,4 gelöst, 4–6 Std. gegen denselben Puffer dialysiert, und dann auf eine Säule von DEAE Sephadex A 50 (Durchmesser 2,5 cm und Länge 35–40 cm) aufgetragen. Die Aldolase wurde mit 0,1M Trispuffer pH 7,4 eluiert und erschien bei einer Laufgeschwindigkeit von 6–8 ml pro Intervall von 20 Min. immer ungefähr mit den Fraktionen 16–25. Die an DEAE Sephadex vorgereinigte Aldolase, die nach Ultrafiltration auf ca. 2–3 ml konzentriert worden war, wurde auf eine Säule von Sephadex G 200 (Durchmesser 0,9 cm, Länge 1,5 m) aufgezogen und mit 0,05M Trispuffer pH 7,4 eluiert (bei 2–3 ml pro 60 Min. in den Fraktionen 17–22). Die Ultrafiltration erfolgte gegen 0,4M Tris, pH 7,4. (Siehe Fraktionierungsschema). Es wurde festgestellt, dass die gereinigten Aldolasen in Gegenwart von Komplexon und Mercaptoäthanol stabiler bleiben. Aus diesem Grunde fügten wir sämtlichen Puffern und Ammoniumsulfatlösungen Komplexon und Mercaptoäthanol bei, Endkonzentration für beide 10^{-3}M .
4. *Bestimmung der Aldolaseaktivität*: Siehe [2].
5. *Bestimmung der Proteinkonzentration*: Siehe [2].
6. *«Disc»-Elektrophorese*: Die «-Disc»-Elektrophorese wurde an einem 7 $\frac{1}{2}$ -proz. Acrylamidgel nach DAVIS [4] durchgeführt.
7. *Kristallisation der Aldolase*: Die nach der Reinigung an DEAE Sephadex A 50 und Sephadex G 200 ultrafiltrierte Aldolaselösung wurde mit 0,4M Tris pH 7,4 auf eine Konzentration von ca. 10 mg Protein pro ml verdünnt und in einem Wägegläschen unter Rühren mit einem kleinen Magnetrührer innerhalb 30–45 Min. körnchenweise mit feinst pulverisiertem Ammoniumsulfat versetzt, bis eine schwache Trübung entstand (ca. 40% Ammoniumsulfatsättigung). Diese Trübung wurde sofort abzentrifugiert. Darauf wurde portionenweise ca. alle 4 Std. etwas Ammoniumsulfat zugegeben, und zwar nur so viel, dass die Lösung klar blieb. Nach 3–4 Tagen fanden sich unter dem Mikroskop Nadelchen mit wenigen kugeligen Elementen. Beim Stehen bildeten sich lange, dünne Nadeln aus. Nach Entstehen der ersten Nadeln wurde unter Rühren in Abständen von einigen Stunden wenig Ammoniumsulfat zugegeben (bis zu einer Konzentration von ca. 52%). Es schieden sich dabei weitere Nadeln aus.

Dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG, mit dessen Hilfe wir die vorliegende Arbeit durchführten, sprechen wir unseren besten Dank aus. Wir möchten auch Frau MONIKA LEHMANN-BARTH für ihre Mithilfe bei der Durchführung der Versuche herzlich danken. Herrn A. SCHMID an unserem Institut danken wir für die Herstellung der Mikrofotos.

Fraktionierungsschema



LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 13. Mitteilung: U. RENSING, A. SCHMID, PH. CHRISTEN & F. LEUTHARDT, Z. physiol. Chem. 348, 1001 (1967).
- [2] O. BRENNER-HOLZACH & F. LEUTHARDT, Helv. 50, 1366 (1967).
- [3] W. J. RUTTER, Fed. Proc. 23, 1248 (1964).
- [4] B. J. DAVIS, Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404 (1964).
- [5] R. W. NEWBURGH & V. H. CHELDELIN, J. biol. Chemistry 274, 37 (1955); W. CHEFURKA, Enzymologia 17, 73 (1954); M. AGOSIN, N. SCARAMELLI & A. NEGHEM, Comp. Biochem. Physiol. 2, 143 (1961).
- [6] K. D. CHAUDHARY, U. SRIVASTAVA & A. LEMONDE, Canad. J. Biochemistry 44, 155 (1966); K. O. PHIFER, J. Parasitol. 48, 368 (1962).