

Der einfache Adsorptions-Nukleationsmechanismus ohne Komplikation durch Legierungsbildung kann demnach als brauchbares Modell der elektrolytischen Abscheidung von Sb und Bi auf Au gelten.

Wir danken Frau *P. Ramseier* für die Durchführung eines grossen Teils der Versuche. Die Arbeit wurde mit Unterstützung des *Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung* ausgeführt.

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *E. Schmidt*, *Helv.* 52, 1763 (1969).  
 [2] *E. Schmidt & H. R. Gygax*, *Helv.* 48, 1178 (1965).  
 [3] *E. Schmidt & H. R. Gygax*, *J. Electroanal. Chemistry* 12, 300 (1966).  
 [4] *E. Schmidt & H. R. Gygax*, *J. Electroanal. Chemistry* 13, 378 (1967).  
 [5] *P. Pantani & P. G. Desideri*, *Gazz. chim. ital.* 89, 1360 (1959); *P. G. Desideri & F. Pantani*, *Ricerca Sci.* 29, 1436 (1959).  
 [6] *M. Hansen & K. Anderko*, «Constitution of Binary Alloys», McGraw-Hill Book Comp., New York 1958; *R. P. Elliott*, «Constitution of Binary Alloys», First Supplement, McGraw-Hill Book Comp., New York 1965.  
 [7] *N. E. Alekseyevski, G. S. Zhdanov & N. N. Zhuravlev*, *Zhur. eksp. i teoret. Fiz.* 25, 123 (1953), zitiert nach [6].

## 73. Über die Heterogenität der Aldolasen

Vorläufige Mitteilung<sup>1)</sup>

17. Mitteilung über Aldolasen [1]

von **B. Gürtler** und **F. Leuthardt**

Biochemisches Institut der Universität Zürich

(23. III. 70)

*Summary.* Aldolase A (rabbit muscle) and aldolase B (human liver) have been resolved by isoelectric focusing into five distinct enzymatically active compounds. Each single component, if refocused under the same conditions, yields one single peak at the same isoelectric position as in the previous run. If component I or III are rehybridized (method of *Penhoet et al.*) component I yields one single peak, whereas component III yields the complete five membered set.

Apparently the aldolases A and B are both tetrameres of two heterogeneous types of subunits  $\alpha/\alpha'$  and  $\beta/\beta'$  respectively. Analogous to the five membered set produced by hybridization of the aldolases A, B and C, the subunits  $\alpha/\alpha'$  or  $\beta/\beta'$ , respectively, combine randomly to tetrameres forming five membered sets of the type  $\alpha_4, \alpha_3\alpha', \alpha_2\alpha_2', \alpha_1\alpha_3', \alpha_4'$ , etc.

Es sind heute bei Säugetieren drei Formen der Aldolase bekannt: Typus A (Muskelaldolase), Typus B (Leberaldolase) und Typus C (Gehirnaldolase), die sich durch ihre Spezifität, ihre elektrophoretischen, chromatographischen und immunologischen Eigenschaften unterscheiden (*Christen et al.* [2], *Penhoet et al.* [3]). Trotzdem frühere Untersuchungen zur Annahme von 3 Untereinheiten geführt hatten, kann heute kaum mehr daran gezweifelt werden, dass alle drei Typen sich aus 4 Untereinheiten zusammensetzen (*Kawahara & Tanford* [4], *Penhoet et al.* [3]), die untereinander Hybride bilden können. Durch Stärkegel- und Celluloseacetat-Elektrophorese lassen sich tatsächlich beim Hybridisieren zweier verschiedener Aldolasen die zu erwartenden 5 Iso-

<sup>1)</sup> Eine ausführliche Mitteilung ist im *Europ. J. Biochemistry* vorgesehen.

enzyme nachweisen, die, wenn wir die Untereinheiten der drei Typen mit  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  bezeichnen, z. B. bei Hybridisierung zwischen Aldolase A und C den theoretisch möglichen Kombinationen  $\alpha_4$ ,  $\alpha_3\gamma$ ,  $\alpha_2\gamma_2$ ,  $\alpha\gamma_3$  und  $\gamma_4$  entsprechen. In einzelnen Geweben, die zwei der Aldolasen gleichzeitig enthalten, lässt sich der ganze Satz der Isoenzyme durch Elektrophorese direkt nachweisen (z. B. im Gehirn die oben genannten fünf Formen).

Versuche von *Chan et al.* [5] wiesen schon früher darauf hin, dass die Muskelaldolase (Typus A) ihrerseits zwei verschiedene Untereinheiten enthält, die sich durch «disc»-Elektrophorese oder auf DEAE-Cellulosesäulen in 8M Harnstoff trennen lassen. Die Auftrennung ist nicht nur bei der nativen Aldolase, sondern auch bei der CM-Aldolase und der durch Reduktion des Enzym-Dihydroxyacetonphosphat-Komplexes mit Natriumborhydrid erhaltenen CM- $\beta$ -Glycerophosphataldolase möglich. Die beiden Untereinheiten erwiesen sich als chemisch verschieden (Aminosäureanalyse und finger prints).

Im folgenden berichten wir kurz über Versuche, welche zeigen, dass sowohl die Aldolase des Typus A (Kaninchenmuskel) als auch des Typus B (menschliche Leber) sich auch mit andern Methoden als heterogen erweisen und sich aus zwei verschiedenen Untereinheiten zusammensetzen. Wir benützen dazu die Ionenfokussierungsmethode von *Svensson* [6], welche eine Trennung von Proteinen in einem pH-Gradienten auf Grund ihrer isoelektrischen Punkte gestattet. Es gelingt mit dieser Methode die genannten, anscheinend homogenen Aldolasen in mehrere Komponenten aufzutrennen, die sich als Hybride nicht identischer Untereinheiten erwiesen haben. Unabhängig von uns ist *Rutter* (s. [7]) bei der Muskelaldolase zu den gleichen Resultaten gelangt. Er hatte die Freundlichkeit, uns bei einem Besuch im Dezember 1968 über seine Versuche zu orientieren. Aus einer kürzlich erschienenen vorläufigen Mitteilung geht hervor, dass er eine ähnliche Heterogenität auch bei andern Enzymen nachweisen konnte [7].

Die Figur zeigt in A das Profil der Ionenfokussierung der Muskelaldolase. Man erkennt 5 Gipfel. Die Kurve der Aktivität gegen FDP läuft der Proteinkonzentration ( $E_{280}$ ) parallel. Die spezifische Aktivität ist also in allen Fraktionen ungefähr die gleiche. Es liegt nahe, anzunehmen, dass die fünf Komponenten, in welche sich das Enzym durch die *Svensson*-Methode auftrennen lässt, durch Kombinationen zweier Arten von Untereinheiten zu Tetrameren zustandekommen, in ähnlicher Weise wie die Isoenzyme, die sich durch Hybridisierung der Untereinheiten verschiedener Typen der Aldolase bilden. Dies lässt sich aus folgenden Beobachtungen schliessen: Unterwirft man die einzelnen Gipfel einer Refokussierung, so verhalten sie sich wie einheitliche Substanzen; sie stellen sich auf den gleichen isoelektrischen Punkt ein wie bei der ersten Auftrennung des nativen Enzyms. Durch die Refokussierung geht, trotz ihrer langen Dauer von ca. 80 Stunden, nur wenig Aktivität verloren. Es ist also wenig wahrscheinlich, dass die Auflösung des nativen Enzyms in verschiedene Fraktionen ein Kunstprodukt darstellt und z. B. durch Interaktion des Enzyms mit den zur Herstellung des pH-Gradienten dienenden Ampholyten zustande kommt. Unterwirft man dagegen das isolierte Material der einzelnen Gipfel Bedingungen, die zu einer Dissoziation in die Untereinheiten und anschliessender Rehybridisierung führen (Ansäuern auf pH 2 und langsame Neutralisation (*Penhoet et al.* [3])) und führt anschliessend nochmals eine isoelektrische Fokussierung durch, so lösen sich die drei mittleren

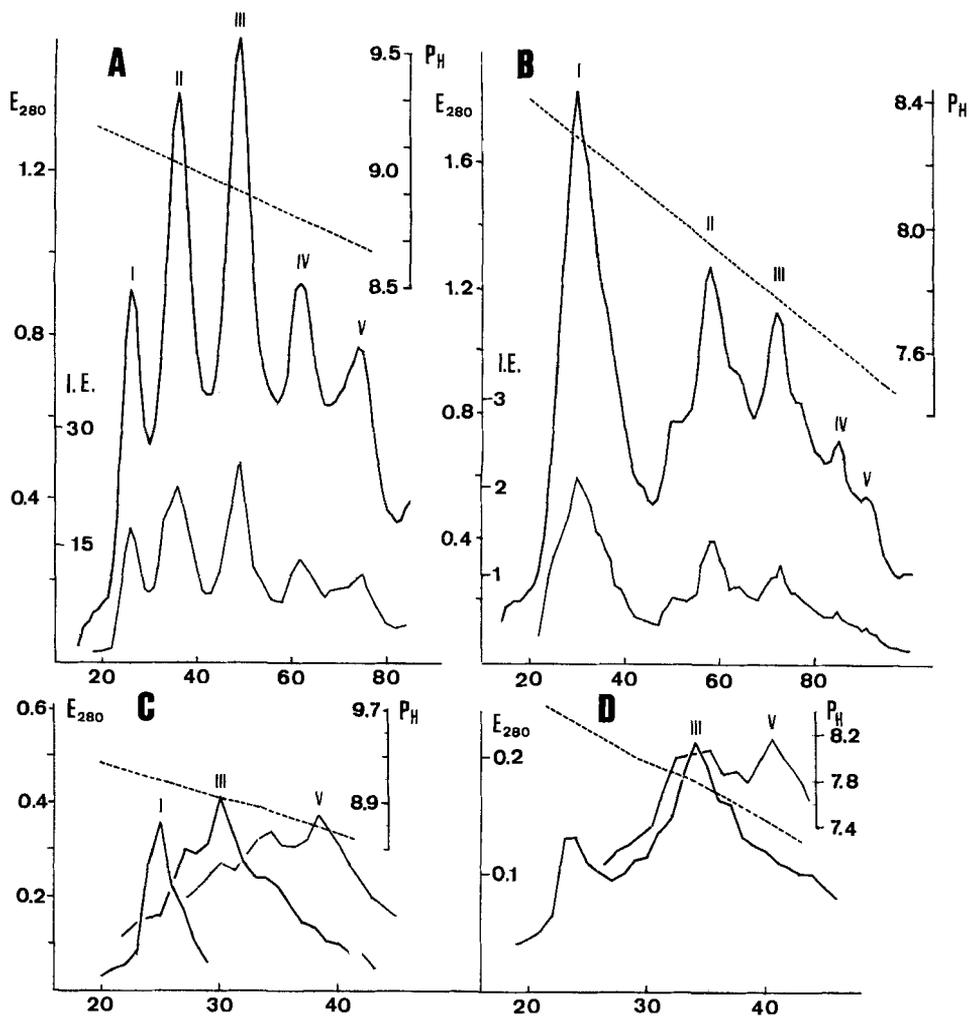


Fig. 1 A und B. Ionenfokussierungsprofil der Aldolase aus Kaninchenmuskel (A) und aus menschlicher Leber (B)

Abszisse: Zahl der Fraktionen. Ordinate: Extinktion, bzw. Aktivität gegen FDP in I. E./ml (untere Kurve). Gestrichelte Linie: pH-Gradient, rechts oben der zugehörige Maßstab

Fig. 1 C. Kaninchenmuskel-Aldolase

Profil der rehybridisierten und refokussierten Gipfel I (links), III (Mitte), V (rechts)

Fig. 1 D. Menschliche Leberaldolase; rehybridisierte und refokussierte Gipfel III und V

Man erkennt, dass sich die nach Ansäuern auf pH 2 und anschließender Neutralisation gebildeten Hybride (siehe Text) bei erneuter Fokussierung voneinander trennen lassen. Ihre Lage in pH-Gradienten entspricht ihrer ursprünglichen Lage bei Fokussierung des nativen Enzyms. Für die Rehybridisierung einzelner Gipfel wurde z. T. gepooltes Material aus verschiedenen Versuchen verwendet. Die getrennten Gipfel I-V, die ohne vorangehende Hybridisierung refokussiert wurden und sich dabei als einheitliche Substanzen verhielten, sind nicht eingezeichnet.

Fraktionen wieder in mehrere Gipfel auf, aus deren Lage man schliessen kann, dass es sich wieder um die gleichen Kombinationen der Untereinheiten handelt wie sie im nativen Enzym vorhanden sind. Der erste Gipfel wird, wie Fig. C zeigt, durch die Rehybridisierung nicht verändert, da er dem Tetramer aus identischen Untereinheiten entspricht; siehe unten. Dasselbe sollte auch bei Gipfel V der Fall sein, doch lässt sich dieser offenbar nicht genügend sauber abtrennen. Er enthält noch ziemliche Mengen Material aus den vorangehenden Gipfeln III und IV und wahrscheinlich auch Fremdproteine. Die erneute Auftrennung des fokussierten rehybridisierten Materials ist überhaupt weniger gut als bei der nativen Aldolase, aber doch deutlich (Fig. C und D). Offenbar lässt sich beim ziemlich langen Arbeitsgang (Fokussierung-Hybridisierung-Fokussierung) eine gewisse Veränderung der Proteine nicht vermeiden.

Alle diese Beobachtungen lassen sich zwanglos durch die Annahme erklären, dass die Muskelaldolase Typus A heterogen ist. Sie ist aus zwei verschiedenen Untereinheiten  $\alpha$  und  $\alpha'$  aufgebaut, die sich zu den 5 möglichen Tetrameren zusammenlagern können:  $\alpha_4$ ,  $\alpha_3\alpha'$ ,  $\alpha_2\alpha_2'$ ,  $\alpha_3\alpha_3'$  und  $\alpha_4'$ . Die symmetrische Anordnung der Gipfel lässt vermuten, dass die beiden Untereinheiten in ungefähr gleicher Menge vorhanden sind.

Auch die menschliche Leberaldolase, Typus B, die kürzlich von *Gürtler* [8] in kristallisiertem Zustand gewonnen wurde, lässt sich in analoger Weise mit der *Svensson*-Methode in fünf Komponenten trennen (Fig. B), welche sehr wahrscheinlich auch hier den Kombinationen  $\beta_4$ ,  $\beta_3\beta'$ ,  $\beta_2\beta_2'$ ,  $\beta\beta_3'$  und  $\beta_4'$  entsprechen. Auch hier verhalten sich die Gipfel, wenn sie einzeln refokussiert werden, als einheitliche Substanzen, und zeigen, wenn sie vorher in der oben angegebenen Weise rehybridisiert wurden, wieder das isoelektrische Profil, das für die Untereinheitenkombination des betreffenden Gipfels charakteristisch ist. Im Gegensatz zur Muskelaldolase ist hier die eine Untereinheit in grossem Überschuss vorhanden. Der erste Gipfel (Zusammensetzung  $\beta_4$ ) ist hier wesentlich höher als die übrigen. Er enthält ca. 30% des gesamten auf die Säule aufgetragenen Materials. Dementsprechend ist von  $\beta_4'$  nur wenig vorhanden. Auch bei der Leberaldolase ist, wie Fig. D zeigt, nach der Rehybridisierung die Trennung der Gipfel nicht mehr so gut wie beim nativen Enzym. Im Fokussierungsprofil Fig. B lassen sich neben den Hauptgipfeln verschiedene Schultern erkennen. Es muss sich um enzymatisch wirksame Komponenten handeln, da die Aktivität und die Extinktion einander parallel laufen. Wir können z. Zt. nicht entscheiden, ob in der menschlichen Leberaldolase eine weitere von  $\beta$  und  $\beta'$  verschiedene Untereinheit vorhanden ist – in diesem Falle könnte es sich um zusätzliche Hybride handeln – oder ob enzymatisch noch aktive Umwandlungsprodukte vorliegen, die bei der Fokussierung entstanden sind.

Es sei hier noch darauf hingewiesen, dass die isoelektrischen Punkte, die sich aus dem Fokussierungsprofil ergeben, bei wesentlich alkalischeren Werten liegen als die mit der *Tiselius*-Methode bei den nativen Enzymen gewonnenen (letztere betragen 6,05 bei Kaninchenmuskel, 6,7 bei Rinderleber; vgl. damit Fig. A und B). Wir können auf diese Frage hier nicht eingehen.

Unsere Versuche zeigen, dass die untersuchten kristallisierten Aldolasen (Muskelaldolase des Kaninchens und Leberaldolase des Menschen) heterogen sind; am Aufbau der Tetramere sind zwei verschiedene Untereinheiten beteiligt, die alle statistisch möglichen Kombinationen bilden können, so dass die Enzyme in fünf Formen auftreten, die sich durch die Methode der Ionenfokussierung von *Svensson* trennen lassen. Neben den Isoenzymen, die sich durch Hybridisierung der verschiedenen Typen der Aldolase

(A, B und C) bilden können, gibt es also zusätzliche multiple Formen, deren Bildung auf der Heterogenität der Untereinheiten innerhalb desselben Typus beruht. Diese Erscheinung ist auch bei andern Enzymen beobachtet worden (*Susor et al.* [7]).

Wir werden die Versuche an anderer Stelle ausführlicher beschreiben und diskutieren.

Die Arbeiten wurden mit Mitteln des *Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung* durchgeführt, dem wir für seine Unterstützung bestens danken möchten.

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 16. Mitteilung: *O. Brenner-Holzach & F. Leuthardt*, *Helv.* 52, 1273 (1969).
- [2] *Ph. Christen, A. Schmid & F. Leuthardt*, *Helv.* 49, 1872 (1966).
- [3] *E. Penhoet, T. Rajkumar & W. J. Rutter*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 56, 1275 (1966).
- [4] *K. Kawahara & C. Tanford*, *Biochemistry* 5, 1578 (1966).
- [5] *W. Chan, D. E. Morse & B. L. Horecker*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 57, 1013 (1967).
- [6] *O. Vesterber & H. Svensson*, *Acta chem. scand.* 20, 820 (1966).
- [7] *W. A. Susor, M. Kochman & W. J. Rutter*, *Science* 165, 1260 (1969).
- [8] *B. Gürtler & F. Leuthardt*, *Z. physiol. Chem.* 350, 1915 (1969).

### 74. Contribution à l'étude de la mésomérie, VIII [1]

#### Système formé de deux atomes à deux électrons et de n atomes à un électron chacun

par **O. Klement** et **J. Portmann**

Institut de chimie physique de l'Université de Fribourg

(23 III 70)

*Résumé.* Une simplification des calculs dans le cadre de la méthode de mésomérie, analogue à celle indiquée dans [1], est présentée pour un système à deux atomes bivalents et n atomes monovalents.

Dans la précédente note, nous avons indiqué des règles permettant de calculer par voie graphique d'une façon très simple les produits scalaires et les coefficients des intégrales d'échange des éléments du déterminant séculaire d'un système formé d'un atome à deux électrons et de n atomes à un électron chacun. En vue d'élargir le domaine de validité de la méthode, nous présentons dans cette communication des règles analogues permettant de calculer l'énergie et la répartition des électrons d'un système formé de deux atomes à deux électrons et de n atomes à un électron chacun. Le degré de simplification que l'on introduit avec ce second système, partiel lui aussi, est analogue à celui réalisé dans [1].

La nomenclature et les conventions que nous avons introduites dans [1] restent entièrement valables ici. Toutefois l'introduction de nouvelles règles exige certains compléments.

Par *îlot prolongé* nous entendons un îlot binaire axé sur au moins un atome bivalent et remplacé par un îlot à un nombre pair de sommets (quadrangulaire, hexagonal, etc.). L'extension de l'îlot binaire est dit *prolongement*. Exemple: l'îlot binaire CE dans  $M_{1,1}$  du tableau est prolongé dans la superposée  $M_{1,3}$ .