

Wir danken der Fa. Knorr, Heilbronn, für die Überlassung des Untersuchungsmaterials, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Bereitstellung eines Zeiss-Spektralphotometers PMQ II und dem Forschungskreis der Ernährungsindustrie sowie der AIF für die Unterstützung dieser Arbeit.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] W. Heimann & P. Schreier, *Helv.* 54, 2794 (1971).
 [2] M. Rothe, G. Wölm & I. Voigt, *Nahrung* 17, 149 (1967).
 [3] J. Schormüller, J. Weber, B. Höxer & W. Grosch, *Z. Lebensmittel-Unters. u. Forsch.* 139, 357 (1968).
 [4] J. A. Blain & T. Barr, *Nature* 190, 538 (1961).
 [5] D. G. H. Daniels, H. G. C. King & H. F. Martin, *Nature* 191, 1302 (1961); D. G. H. Daniels & H. F. Martin, *Chemistry & Ind.* 1964, 2058; 1965, 1763; *J. Sci. Food Agric.* 18, 589 (1967).
 [6] G. Beisenherz, H. J. Boltze, Th. Bücher, R. Czok, K. H. Garbade, E. Meyer-Arendt & G. Pfeleiderer, *Z. Naturforsch.* 8b, 555 (1953).

303. Heterogenität der *Drosophila*-Aldolase und Hybridisierung mit Säugeraldolase

von O. Brenner-Holzach und F. Leuthardt

20. Arbeit über Aldolasen¹⁾

Biochemisches Institut der Universität Zürich

(13. X. 71)

Summary. – 1. FDP aldolase from pupae of *Drosophila melanogaster* is shown by the following findings to be a tetrameric molecule with two non-identical subunits: a) Disc electrophoresis on polyacrylamide gel in the presence of sodium dodecylsulfate yields a subunit molecular weight of 40 000 (equal to that of rabbit muscle aldolase). b) Hybridisations of *drosophila* aldolase with type C aldolase from rabbit and calf brain lead to a five-membered set of isoenzymes.

2. The non-identity of the subunits is suggested by the behaviour on isoelectro focussing. While rabbit muscle aldolase and human liver aldolase show five isoenzymes (hybrids from the non-identical subunits), *drosophila* aldolase can be separated into three peaks only. This result may be interpreted in two ways: a) The isoenzymes α_4 and $\alpha_3\alpha'$ are not separated from each other in the pH range 5–8, neither are $\alpha\alpha'_3$ and α'_4 . Or b) α_2 and α'_2 are not split under the condition of isoelectro focussing and therefore 3 isoenzymes α_4 , $\alpha_2\alpha'_2$, and α'_4 are obtained only.

3) Isoenzyme I (supposedly mainly α_4) and isoenzyme III (supposedly mainly α'_4) are identical in the following respects: *Michaelis* constant, pH profile, FDP/F-1-P activity ratio, inactivation by carboxypeptidase A, disc electrophoresis on polyacrylamide and molecular weight. The only difference found between isoenzyme I and III is the specific activity: isoenzyme I is nearly twice as active as isoenzyme III.

4. The fact that hybridisation between *drosophila* aldolase and type C aldolase from rabbit and calf brain yields a set of isoenzymes proves that interspecies hybridisation is possible between FDP aldolases from vertebrates and invertebrates. FDP aldolases from vertebrates and invertebrates seem to be homologous enzymes. Our results suggest that the conformation of aldolases remained relatively unchanged during evolution.

Die FDP-Aldolase (EC 4.1.2.13, Fructose-1,6-diphosphat-D-Glycerinaldehyd-3-phosphat-Lyase) aus Puppen der *Drosophila melanogaster* (Wildtyp) ist der Muskelaldolase des Kaninchens in verschiedenen Eigenschaften sehr ähnlich [2] [3] [4]. Sie

¹⁾ 19. Arbeit über Aldolasen: s. [1].

kann daher nach der von *Rutter* vorgeschlagenen Nomenklatur als eine Aldolase vom Typus IA angesprochen werden. Ihre Aminosäurezusammensetzung weicht von derjenigen der Kaninchen-Muskelaldolase ab [4]. Antikörper gegen *Drosophila*-Aldolase (Meerschweinchen) reagieren nicht mit Muskelaldolase [4]. Diese Unterschiede können indessen nur solche Teile der Aminosäuresequenz betreffen, die weder für den aktiven Bezirk, noch für die Konformation der Ketten von wesentlicher Bedeutung sind.

Horecker und Mitarb. [5] gelang es durch Chromatographie an DEAE-Cellulose-säulen in 8 M Harnstoff bei der Kaninchen-Muskelaldolase zwei verschiedene Untereinheiten voneinander zu trennen. Nach einer neuen Arbeit [6] unterscheiden diese sich dadurch, dass die eine (« α ») einen Asparaginrest, die andere (« β ») einen Asparaginsäurerest an vierter Stelle vom Carboxylende an gerechnet besitzt. Die Gruppe *Rutter's* [7] konnte durch die Methode der Ionenfokussierung bei der Kaninchen-Muskelaldolase, *Gürtler & Leuthardt* [8] mit der gleichen Methode bei der Kaninchen-muskel- und bei der menschlichen Leber-Aldolase ebenfalls zwei verschiedene Untereinheiten nachweisen (α und α' , resp. β und β'). Diese Aldolasen geben einen Satz von 5 tetrameren Isoenzymen, welche den Kombinationen α_4 , $\alpha_3\alpha'$, $\alpha_2\alpha_2'$, $\alpha\alpha_3'$, α_4' resp. β_4 , $\beta_3\beta'$, $\beta_2\beta_2'$, $\beta\beta_3'$, β_4' entsprechen.

Die *Drosophila*-Aldolase ergab bei der Ionenfokussierung nicht 5, sondern nur 3 deutlich unterscheidbare Pike. Es handelt sich offenbar auch hier um Isoenzyme, die durch Kombination nicht-identischer Untereinheiten entstehen (Fig. 1). Der erste

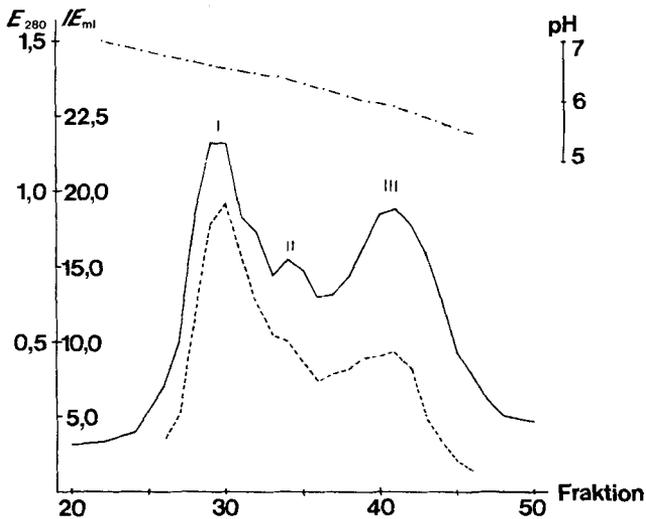


Fig. 1. *Drosophila*-Aldolase nach isoelektrischer Fokussierung, pH 5–8

— Extinktion bei 280 nm, - - - - Aktivität gegen FDP in IE/ml, - · - · - pH-Gradient

Pik (I) mit einem isoelektrischen Punkt von 6,6–6,7 sowie der letzte (III) mit einem isoelektrischen Punkt von 6,1–6,15 waren besonders ausgeprägt. Die mittlere Komponente lag immer in wesentlich geringerer Menge vor. *Horecker* [9] konnte bei den « α »- und « β »-Untereinheiten der Kaninchen-Muskelaldolase keine Unterschiede der spezifischen Aktivität feststellen; auch *Gürtler & Leuthardt* [8] erhielten bei der Auftrennung der Isoenzyme der menschlichen Leberaldolase durch Ionenfokussierung

nur Komponenten gleicher spezifischer Aktivität. Dagegen zeigte sich bei der *Drosophila*-Aldolase ein starker Aktivitätsabfall von Pik I, über II zu III (Tab. 1). Die Refokussierung der Isoenzyme ergab für I und III wieder nur je einen Pik mit derselben Abstufung der spezifischen Aktivitäten (Fig. 2; Tab. 1).

Es stellt sich die Frage, warum bei der Fokussierung der *Drosophila*-Aldolase nur drei Pike entstehen, während bei einem aus zwei verschiedenen Untereinheiten aufgebauten Tetrameren ein Satz von 5 Isoenzymen zu erwarten ist, wie er bei verschiedenen andern Aldolasen nachgewiesen wurde [8] [10] [11] [12]. Es ist wenig wahrscheinlich, dass in der *Drosophila*-Aldolase ein Dimeres vorliegt. Gegen diese Annahme spricht das Molekulargewicht der Untereinheiten und die Hybridisierung mit andern

Tabelle 1. Spezifische Aktivität der Isoenzyme I, II und III nach Ionenfokussierung in IE/mg Protein, sowie in Prozent bezogen auf Isoenzym I

Versuch	Pik I		Pik II		Pik III	
	spez. Akt.	%	spez. Akt.	%	spez. Akt.	%
3	18,6	100	13,9	75	10,0	54
4	15,7	100	12,7	81	8,5	54
5	17,7	100	12,0	68	9,2	52
7	18,0	100	10,7	60	9,5	53
8	14,1	100			8,3	59
Refokussierung						
5	16,6	100			9,5	57
3	16,5	100	11,7	70	9,2	56
4	15,4	100	13,6	88	8,6	56

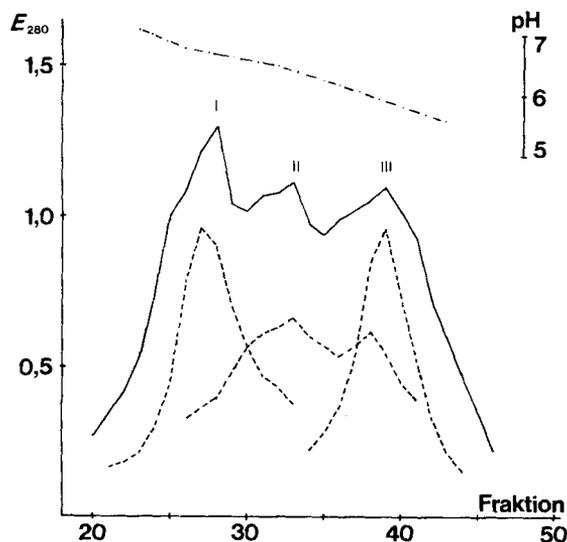


Fig. 2. Isoelektrische Fokussierung von *Drosophila*-Aldolase und Refokussierung der Pike I-III bei pH 5-8

(Die Aufgliederung von Pik II bei der Refokussierung lässt sich durch die Überlappung von Isoenzym II durch die Isoenzyme I und III erklären) — Fokussierung, - - - Refokussierung

Aldolasen. Wenn wir auch hier einen tetrameren Aufbau annehmen, so wäre es bei Existenz zweier verschiedener Einheiten α und α' denkbar, dass diese normalerweise nur als α_2 und α_2' vorliegen würden und somit nur *ein* Hybrid $\alpha_2\alpha_2'$ bilden könnten. Es wäre aber auch möglich, dass sich zwar die fünf Hybride bilden, dass aber bei der Ionenfokussierung α_4 nicht von $\alpha_3\alpha'$ und $\alpha\alpha_3'$ nicht von α_4' abgetrennt würden. Wir beschränkten unsere Untersuchungen auf die Pike I und III in der Annahme, dass es sich dabei um reine α_4 und α_4' Isoenzyme handelt oder aber gemäss der zweiten Hypothese im Pik I zum grössten Teil Untereinheit α , im Pik III Untereinheit α'

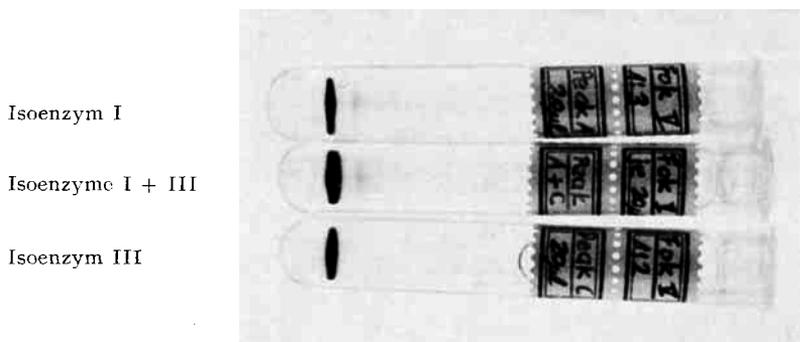


Fig. 3. *Elektrophorese der Isoenzyme I und III an Polyacrylamid-Gel ohne Spacer*
(Gel 7½%, pH 8,6, 50 γ Protein)

vorliegen würde. Wir verglichen in einer Reihe von Versuchen diese beiden Komponenten I und III.

Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese. Die kontinuierliche Elektrophorese auf Polyacrylamid nach Davis [13] ergab dieselbe Wanderungsgeschwindigkeit für I und III (Fig. 3). Auch bei längerdauernder Disk-Elektrophorese ohne Spacer (8 Stunden), sowie bei diskontinuierlicher Elektrophorese (mit Spacer) konnten die beiden Komponenten nicht unterschieden werden.

Tabelle 2. *Michaelis-Konstanten verschieden weit gereinigter Drosophila-Aldolasen, sowie der Isoenzyme I und III*

	FDP	F-1-P
Roh-Aldolase (spez. Akt. 0,65 IE/mg Protein)	$2,3 \times 10^{-5}$	—
gereinigte Aldolase (spez. Akt. 9,1 IE/mg Protein)	$2,7 \times 10^{-5}$	$1,85 \times 10^{-2}$
Isoenzym I (spez. Akt. 16,1 IE/mg Protein)	$1,75 \times 10^{-5}$ $1,91 \times 10^{-5}$ $1,99 \times 10^{-5}$ $2,25 \times 10^{-5}$	$1,04 \times 10^{-2}$
Isoenzym III (spez. Akt. 9,5 IE/mg Protein)	$1,56 \times 10^{-5}$ $1,94 \times 10^{-5}$	$0,94 \times 10^{-2}$

Michaelis-Konstanten mit FDP¹⁾ und F-1-P²⁾ als Substrate. Die Michaelis-Konstanten ergaben die in Tab.2 mitgeteilten Werte. Beide Isoenzyme besitzen sowohl gegen FDP, als auch gegen F-1-P Michaelis-Konstanten derselben Grösse.

Substratspezifität. Das Aktivitätsverhältnis FDP/F-1-P ist für beide Isoenzyme I und III gleich, um 20 (s. Tab.3).

Tabelle 3. Verhältnis der Aktivitäten der Isoenzyme I und III gegen FDP und F-1-P

Versuch	1	2	3
Isoenzym I	22,3	17,5	21,3
Isoenzym III	20,4	20,9	

Wechselzahl. Die Berechnung der Wechselzahl ergab die in Tab.4 zusammengestellten Werte (Molekulargewicht 159000).

Tabelle 4. Wechselzahlen der Isoenzyme I und III mit FDP und F-1-P

Isoenzym I:	mit FDP 2640,	mit F-1-P 123
Isoenzym III:	mit FDP 1350,	mit F-1-P 65

Behandlung mit Carboxypeptidase A. Bei Inkubation der Isoenzyme I und III mit Carboxypeptidase A wurde mit FDP als Substrat innerhalb von 20 Min. bei beiden Isoenzymen ein Abfall der Aktivität auf 3-4% beobachtet; mit F-1-P bleibt mit beiden Isoenzymen eine Restaktivität von 50-60% bestehen (Fig.4).

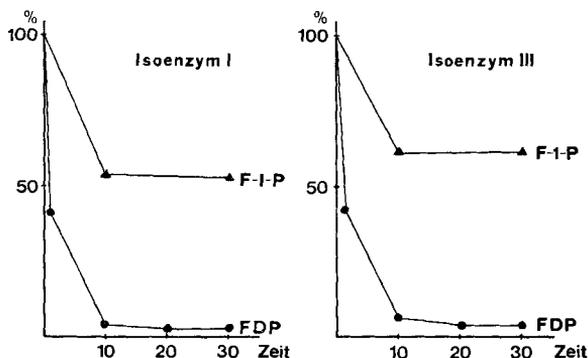


Fig. 4. Einfluss von Carboxypeptidase A auf die Aktivität von Isoenzym I und III mit FDP (●—●), bzw. F-1-P (▲—▲) als Substrat

pH-Abhängigkeit der Isoenzyme I und III. Beide Isoenzyme weisen mit beiden Substraten ein breites pH-Optimum auf, mit FDP zwischen 7,2 und 8,2, mit F-1-P zwischen 7,0 und 7,8 (s. Fig.5).

Aminosäureanalyse. Die Aminosäureanalyse der beiden Isoenzyme I und III ergab die in Tab.5 angeführten Werte. Die Zusammenstellung zeigt, dass die prozentuale Verteilung der Aminosäuren in beiden Isoenzymen keine signifikanten Unter-

²⁾ FDP = Fructose-1,6-diphosphat; F-1-P = Fructose-1-phosphat.

schiede aufweist. Die Werte stimmen auch mit denjenigen des nativen Enzyms überein.

Bestimmung des Molekulargewichts der Untereinheiten durch Disk-Elektrophorese in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat. Nach Davis [13] und Ornstein [14] hängt die Wanderungsgeschwindigkeit nativer Proteine bei der Elektrophorese auf Polyacrylamid nicht nur von der Ladung, sondern auch wesentlich von der Grösse der Molekel

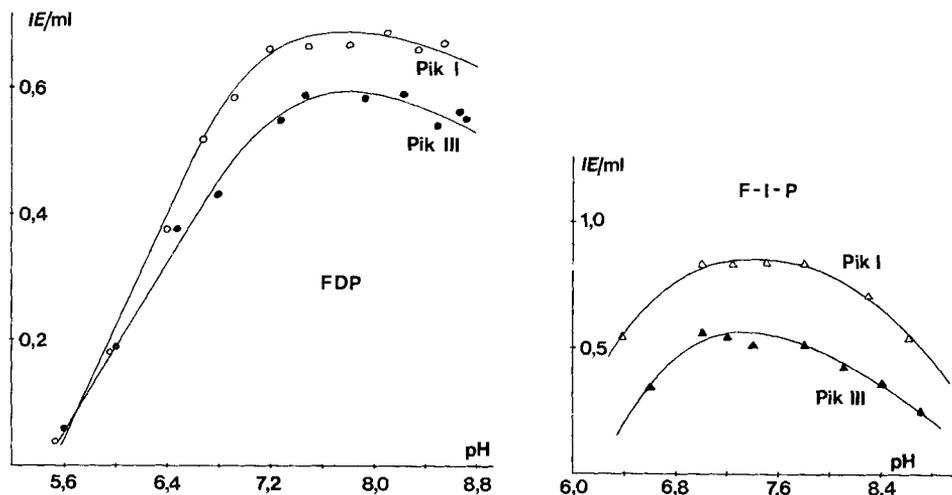


Fig. 5. *pH-Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von Isoenzym I (○ und △) und III (● und ▲) mit FDP und F-1-P als Substrat*

Tabelle 5. *Prozentuale Aminosäurezusammensetzung der Drosophila-Aldolase und der durch Ionenfokussierung aufgetrennten Isoenzyme I und III*

a), b) Parallelversuche. Serin und Threonin auf die Zeit Null extrapoliert

Aminosäuren	Natives Isoenzymgemisch		Isoenzym I		Isoenzym III	
	a)	b)	a)	b)	a)	b)
Lysin	7,75	7,88	7,64	7,11	7,66	7,53
Histidin	1,35	1,47	1,47	1,27	1,46	1,26
Arginin	4,28	4,51	4,44	4,37	4,39	4,31
Asparaginsäure	10,20	9,86	9,48	10,23	9,28	10,40
Threonin	5,85	5,65	5,70	6,08	5,69	5,84
Serin	5,29	5,20	5,32	5,54	6,10	5,88
Glutaminsäure	11,99	11,71	12,03	12,68	11,96	11,14
Prolin	4,55	4,46	4,58	4,20	4,76	4,48
Glycin	8,35	8,07	8,28	8,18	8,64	8,15
Alanin	12,13	12,03	12,23	12,68	12,06	12,15
Halbcystin	Spur	0,57	0,62	0,45	0,32	Spur
Valin	7,26	6,83	7,17	6,95	7,04	7,13
Methionin	0,69	0,72	0,62	0,52	0,63	0,65
Isoleucin	5,02	5,15	4,86	4,44	4,73	4,91
Leucin	9,70	10,02	10,02	10,00	9,70	10,07
Tyrosin	2,86	3,15	2,89	2,78	2,90	3,11
Phenylalanin	2,73	2,62	2,65	2,47	2,69	2,68

ab. Führt man die Elektrophorese in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat durch, so scheint der Siebeffekt den Ladungseffekt zu übertreffen, so dass nach *Shapiro et al.* [15] die Trennung von Proteinen praktisch nur eine Funktion der Molekulargewichte ihrer Polypeptidketten ist. *Weber & Osborn* [16] konnten anhand von 40 Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht zeigen, dass sich Molekulargewichte zwischen 15000 und 100000 mit dieser Methode recht genau bestimmen lassen. Für die *Drosophila*-Aldolase ergaben sich in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat Werte von 38000 und 39000, für die Kaninchen-Muskeldolase 40000 und 39500, die den Untereinheiten entsprechen. Somit besteht auch die *Drosophila*-Aldolase aus 4 Untereinheiten. Für die durch Ionenfokussierung getrennten Isoenzyme I und III ergab sich dasselbe Bild (Fig. 6), und es liess sich aus der Eichkurve ein Molekulargewicht von 40200 für Isoenzym I und 40300 für Isoenzym III herauslesen.

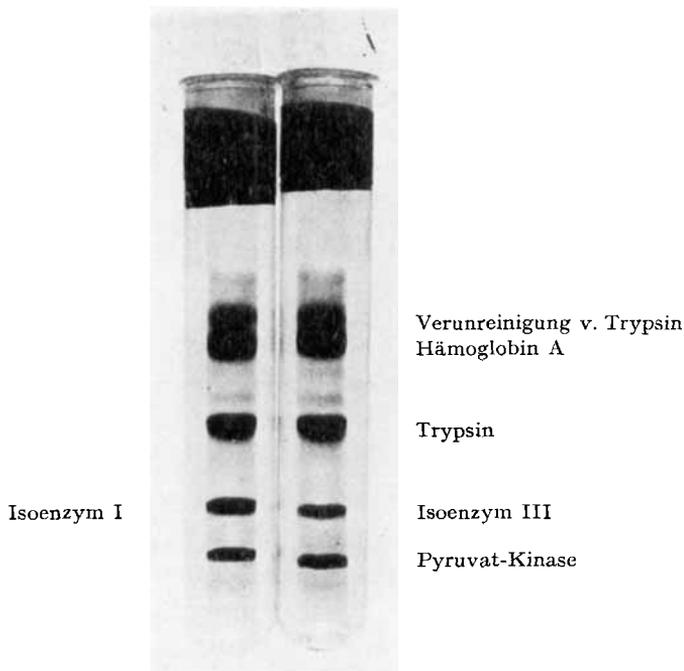


Fig. 6. Bestimmung des Molekulargewichtes der Untereinheiten α und α' von *Drosophila*-Aldolase durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese mit Na-Dodecylsulfat (Gel 10 %, pH 7,0)

Interspezies-Hybridisierung mit gereinigter C-Aldolase aus Kalbshirn. Multiple Formen von Aldolasen der Klasse I wurden in verschiedenen Geweben von Vertebraten gefunden [10] [17] [18]. Die Stamm-Aldolasen A, B und C aus Kaninchenorganen [10] [19] [20] weisen viele strukturelle Ähnlichkeiten auf. *Lebherz & Rutter* [21] untersuchten verschiedene Vertebraten-Organe und konnten bei Anwesenheit von zwei der Stamm-Aldolasen meist fünfgliedrige Hybrid-Sätze nachweisen. Da die *Drosophila*-Aldolase der Stamm-Aldolase A sehr ähnlich ist, untersuchten wir, ob sie mit der letzteren und andern Stamm-Aldolasen Hybride bilden kann. Die Wanderungsgeschwindigkeiten von *Drosophila*-Aldolase und Kaninchen-Muskeldolase sind bei

die Komponente γ_4 (= C-Aldolase) als homogen (Fig. 8). Bei der Hybridisierung der C-Aldolase (γ_4) mit der nicht in die Isoenzyme aufgetrennten *Drosophila*-Aldolase oder mit den durch Ionenfokussierung erhaltenen Isoenzymen I und III wurden fünfgliedrige Hybrid-Sätze erhalten (Fig. 9 und Fig. 10). Die Isoenzyme I und III verhielten sich gleich.

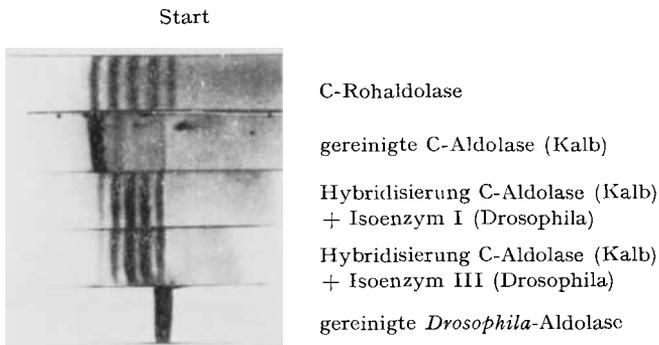


Fig. 10. Hybridisierung der Isoenzyme I und III von *Drosophila*-Aldolase mit Kalbs-C-Aldolase (Celluloseacetat-Elektrophorese; Aktivfärbung)

Diskussion. – Wir nehmen an, dass die bei der Ionenfokussierung erhaltenen Isoenzyme I und III Tetramere der beiden nicht identischen Untereinheiten der *Drosophila*-Aldolase sind. Unsere Versuche zeigen, dass diese beiden Isoenzyme in allen untersuchten Eigenschaften, mit Ausnahme der spezifischen Aktivität, übereinstimmen. Die Unterschiede in der Primär- und Sekundärstruktur der beiden Untereinheiten α und α' sind wahrscheinlich nur gering. *Lai, Chen & Horecker* [6] haben, wie schon erwähnt, bei der Muskelaldolase des Kaninchens festgestellt, dass hier bei einer der Untereinheiten ein Asparaginsäurerest durch Asparagin ersetzt ist, allerdings ohne Veränderung der spezifischen Aktivität. Möglicherweise sind bei der *Drosophila*-Aldolase die Unterschiede zwischen α und α' ähnlicher Art. Für den beträchtlichen Unterschied der spezifischen Aktivität, der hier zu beobachten ist, können wir zur Zeit keine Erklärung geben.

Interspezieshybride bei Enzymen verschiedener Vertebraten wurden von *Markert* [22] für Lactatdehydrogenase sowie von *Chilson et al.* [23] für Malatdehydrogenase beschrieben. *Chilson* vermutet ferner ein Hybrid zwischen Untereinheiten der Triosephosphatdehydrogenasen von Fasan und Hummer erhalten zu haben, wobei er allerdings die Frage offen lässt, ob es sich nicht einfach um ein Aggregat der beiden intakten Dehydrogenasen handelt. Unsere Hybridisierungsversuche zwischen den C-Aldolasen von Kaninchen- und Kalbshirn und der *Drosophila*-Aldolase, die beide zu fünfgliedrigen Hybridsätzen führen, zeigen eindeutig, dass auch Interspezieshybride zwischen Enzymen von Vertebraten und Invertebraten möglich sind. Man muss annehmen, dass die Aldolase-Untereinheiten dieser Spezies so ähnliche Konformationen besitzen, dass sie sich bei der Bildung der Tetrameren gegenseitig ersetzen können (*Latner* [24]). Die Primärstruktur ist noch bei keiner Aldolase vollständig bekannt. Die Untersuchungen von *Gibbons et al.* [25] und der Gruppe von *Horecker* [26] zeigen indes, dass die Aminosäuresequenzen in der Umgebung des aktiven Lysinrestes bei Aldolasen verschiedener Herkunft weitgehend übereinstimmen. Wahrscheinlich han-

delt es sich bei den Aldolasen von Vertebraten und Invertebraten um homologe Enzyme; d.h. es existierte zu Beginn der Evolution eine «Uraldolase», aus der sich unter Wahrung der Struktur des aktiven Bezirks und der Konformation der Proto-meren in bestimmten Ästen des Stammbaums die verschiedenen Aldolasen der Klasse I entwickelten.

Meerschweinchen-Antiserum gegen *Drosophila*-Aldolase reagiert mit der letzteren, nicht aber mit Muskelaldolase. Offenbar sind die Unterschiede der Primär- und Sekundärstruktur zu gross – trotz der Ähnlichkeit der Konformation, die noch Hybridisierungen mit Aldolase C erlaubt – als dass beide Molekeln einen gleichen antigenen Bezirk bilden könnten.

Experimenteller Teil

Isolierung der Drosophila-Aldolase (s. [3]). Es wurden weitere Versuche unternommen, die Stabilität der *Drosophila*-Aldolase zu steigern. Zusatz von *Cleland's* Reagens oder Methyl-Phenyl-Sulfonyl-Fluorid während der Aufarbeitung hatte keinen Einfluss. Aufbewahren in lyophilisiertem Zustand oder in 80-proz. Ammoniumsulfat verlängerte die Haltbarkeit der *Drosophila*-Aldolase auf 4–5 Wochen.

Isolierung der C-Aldolase aus Kalbshirn. 320 g Kalbshirn wurden mit 850 ml 0,01 M Trispuffer pH 7,5 (enthaltend 10^{-3} M Komplexon und 10^{-4} M Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid) während 40 Sek. homogenisiert, durch Gaze filtriert und 60 Min. hochtourig zentrifugiert. Dann wurde durch Ammoniumsulfatfraktionierung die Fraktion von 44–60 % Ammoniumsulfatsättigung als sog. Roh-C-Aldolase abgetrennt. Wir erreichten dabei spezifische Aktivitäten von 0,63–0,91 IE. Da bei der Weiterreinigung an Phosphocellulose nach *Penhoel* [20] ein starker Aktivitätsverlust auftrat, haben wir die Roh-C-Aldolase direkt auf eine DEAE Sephadex A 50-Säule (2×50 cm; Durchfluss-geschwindigkeit 5 ml/20 Min.) gebracht und folgendermassen aufgetrennt: a) Aufziehen und Durchwaschen mit 0,05 M Tris pH 8,0 (enthaltend 0,004 M Komplexon + 0,005 M Mercaptoäthanol + 0,2 M Saccharose). Es wurde dabei die Komponente α_4 eliminiert. b) Elution mit linearem NaCl-Gradienten (0–0,4 M NaCl) im gleichen Trispuffer; dabei wurden die Komponenten $\alpha_3\gamma$, $\alpha_2\gamma_2$, $\alpha\gamma_3$ und γ_4 abgetrennt. Wir erhielten die folgenden spezifischen Aktivitäten: $\alpha_3\gamma$: 2,4 IE/mg Protein; $\alpha_2\gamma_2$: 2,3 IE/mg Protein; $\alpha\gamma_3$: 1,3 IE/mg Protein; γ_4 : 0,5 IE/mg Protein.

Die Reinigung wurde mittels Celluloseacetat-Elektrophorese verfolgt.

Bestimmung der enzymatischen Aktivität siehe [2].

Bestimmung der Proteinkonzentration siehe [2]. $E_{280} \cdot 1 \text{ cm} = \text{mg Protein/ml}$.

Die *Ionenfokussierung* (nach *Svensson* [27]) erfolgte in einem Saccharose-Dichtegradienten über einen pH-Bereich von 5–8 (Ampholin). Säulenvolumen 110 ml.

Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese. Die «kontinuierliche» Disk-Gel-Elektrophorese nach *Davis* [13] wurde mit 7,5 % Polyacrylamid, pH 8,6 durchgeführt; die «diskontinuierliche» Methode nach *Davis*, zit. in *Maurer* [28], System 1.

Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese mit Natriumdodecylsulfat nach *Weber & Osborn* [16]. Die Proteine (ca. 0,5 mg) wurden nach zweistündiger Inkubation in 0,5 ml 0,01 M Natriumphosphat-Puffer pH 7,0 mit 1 % Natriumdodecylsulfat und 1 % β -Mercaptoäthanol über Nacht bei Zimmertemperatur gegen 0,01 M Natriumphosphat-Puffer pH 7,0 mit 0,1 % Natriumdodecylsulfat und 0,1 % β -Mercaptoäthanol dialysiert. Für die Herstellung der Gele wurden 15 ml Gelpuffer (7,8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 25,7 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und 2 g Na-Dodecylsulfat *ad* 1000 ml mit H_2O) mit 13,5 ml Acrylamidlösung (22,2 g Acrylamid und 0,6 g Methylenbisacrylamid *ad* 100 ml mit H_2O) gemischt. Nach Entgasung wurden 1,5 ml frisch bereitete Ammoniumpersulfatlösung (30 mg/2 ml) und 0,045 ml Tetramethyläthylendiamin zugegeben. Es wurde mit diesen Mengen ein 10-proz. Gel erhalten. Die Dimensionen der Glasröhrchen waren $0,5 \times 10$ cm.

Pro Gel wurden Proben folgender Zusammensetzung aufgetragen: 5 μl 0,05 % Bromphenolblau (in H_2O), 1 Tropfen Glycerin, 5 μl Mercaptoäthanol, 50 μl Dialysepuffer, 50 μl dialysierte Protein-Inkubationslösung (s. oben). Laufzeit: ca. 4–5 Std. bei 8 mA pro Probe, wobei der Marker ca. 3/4 der Gellänge zurücklegt. Nach Entfernung der Gele aus den Röhrchen wurde die Länge des Gels und die vom Marker zurückgelegte Distanz gemessen. Die Färbung erfolgte in Amidoschwarz in 7-proz. Essigsäure während 1 Std. Nach der Entfärbung in 7-proz. Essigsäure waren die Gele ca.

5–10% länger. Die Totallänge wurde erneut gemessen, sowie die von den einzelnen Proteinen zurückgelegten Distanzen. Aus diesen Grössen ergibt sich die Mobilität nach folgender Gleichung:

$$\text{Mobilität} = f \text{ [MG]} \frac{\text{Gellänge vor Entfärbung}}{\text{Gellänge nach Entfärbung}} \times \frac{\text{Weg des Proteins.}}{\text{Weg des Markers}}$$

Celluloseacetat-Elektrophorese. Die Elektrophorese an Celluloseacetat-Folien (2,5 × 17 cm, *Gelman*) wurde in 0,06 M Natriumbarbitalpuffer pH 8,6 (enthaltend 10⁻² M Mercaptoäthanol + 10⁻³ M Komplexon) bei 8–10 mA und ca. 40–45 Min. Laufzeit durchgeführt. Nachweis der Aldolase-Banden durch Aktivitätsfärbung nach *Christen* [18].

Abbau mit Carboxypeptidase A. Die Carboxypeptidase A wurde im Gewichtsverhältnis 1:100 zur Aldolase zugesetzt. Inkubation bei 0° im Eisbad. Aktivitätsmessungen vor Inkubation sowie nach 3, 10, 20 und 30 Min.

pH-Abhängigkeit. Die pH-Abhängigkeit wurde in einem 0,1 M Tris-Maleatpuffer untersucht. Der pH-Wert wurde im Inkubationsgemisch nach Ablauf der Reaktion gemessen.

Die *Aminosäure-Analysen*²⁾ erfolgten nach Hydrolyse während 24 Std. in 6 N HCl im *Beckman*-Aminosäure-Analysator nach *Spackman, Moore & Stein* [29]. Threonin und Serin wurden auf die Zeit Null umgerechnet.

Hybridisierungen. Die Dissoziation von *Drosophila*-Aldolase und C-Aldolase in Untereinheiten und Reassoziierung bzw. Hybridisierung derselben führten wir nach *Penhoet* [11] aus durch Senken des pH auf 2 mit 1 N H₃PO₄, nach 30 Min. nachfolgende 20fache Verdünnung und Neutralisation auf pH 7,0 mit 1 M Tris. Bei der Hybridisierung ging in der Regel ein Teil der Aktivität verloren. Für die Interspezies-Hybride wurde die ca. 10–15fache Proteinmenge mit ca. der Hälfte Aktivität an C-Aldolase gegenüber *Drosophila*-Aldolase verwendet.

Wir danken dem *Schweizerischen Nationalfonds* für die Unterstützung dieser Arbeit. Frau *M. Lehmann*, Frä. *E. Boesch*, Frä. *B. Volger* und Herrn *R. Monti* sei für ihre gute Mitarbeit bei der Durchführung der Versuche bestens gedankt.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *B. Gürtler, C. Bally & F. Leuthardt*, *Z. physiol. Chemie* **352**, 1455 (1971).
- [2] *O. Brenner-Holzach & F. Leuthardt*, *Helv.* **50**, 1366 (1967).
- [3] *O. Brenner-Holzach & F. Leuthardt*, *Helv.* **51**, 1130 (1968).
- [4] *O. Brenner-Holzach & F. Leuthardt*, *Helv.* **52**, 1273 (1969).
- [5] *W. Chan, D. E. Morse & B. L. Horecker*, *Proc. natl. Acad. Sci.* **57**, 1013 (1967); *D. E. Morse, W. Chan & B. L. Horecker*, *Proc. natl. Acad. Sci.* **58**, 628 (1967); *M. Koida, C. Y. Lai & B. L. Horecker*, *Arch. Biochemistry Biophysics* **134**, 623 (1969).
- [6] *C. Y. Lai, C. Chen & B. L. Horecker*, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* **40**, 461 (1970).
- [7] *W. A. Susor, M. Kochman & W. J. Rutter*, *Science* **165**, 1260 (1969).
- [8] *B. Gürtler & F. Leuthardt*, *Helv.* **53**, 654 (1970).
- [9] *B. L. Horecker*, persönliche Mitteilung.
- [10] *E. Penhoet, T. Rajkumar & W. J. Rutter*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **56**, 1275 (1966).
- [11] *E. Penhoet, M. Kochman, R. Valentine & W. J. Rutter*, *Biochemistry* **6**, 2940 (1967).
- [12] *P. J. Anderson, I. Gibbons & R. N. Perham*, *European J. Biochemistry* **11**, 503 (1969); *R. W. Gracy, A. G. Lacko & B. L. Horecker*, *J. biol. Chemistry* **244**, 3913 (1969); *G. Rapoport, L. Davis & B. L. Horecker*, *Arch. Biochemistry Biophysics* **132**, 286 (1969).
- [13] *B. J. Davis*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**, 404 (1964).
- [14] *L. Ornstein*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**, 321 (1964).
- [15] *A. L. Shapiro, E. Vinuela & J. V. Maizel*, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* **28**, 815 (1967).
- [16] *K. Weber & M. Osborn*, *J. biol. Chemistry* **244**, 4406 (1969).
- [17] *C. J. Foxwell, E. J. Cran & D. N. Baron*, *Biochem. J.* **100**, 44 (1966); *H. B. Anstall, C. Lapp & J. M. Trujillo*, *Science* **154**, 657 (1966); *U. Rensing, A. Schmid & F. Leuthardt*, *Z. physiol. Chem.* **348**, 1001 (1967).
- [18] *Ph. Christen, U. Rensing, A. Schmid & F. Leuthardt*, *Helv.* **49**, 1872 (1966).

²⁾ Die Aminosäure-Analysen wurden an unserem Institut von Frau *N. Steiner* und Frau *L. Lehmann* (Gruppe Prof. *Humbel*) durchgeführt, denen wir bestens danken.

- [19] *J. F. Taylor, A. A. Green & G. T. Cori*, *J. biol. Chemistry* **173**, 591 (1948); *T. V. Rajkumar, B. M. Woodfin & W. J. Rutter*, *Methods Enzymol.* **9**, 491 (1967).
- [20] *E. Penhoet, M. Kochman & W. J. Rutter*, *Biochemistry* **8**, 4391 (1969).
- [21] *H. G. Leberherz & W. J. Rutter*, *Biochemistry* **8**, 109 (1969).
- [22] *C. L. Markert & E. J. Massaro*, *Science* **162**, 695 (1968).
- [23] *O. P. Chilson, G. B. Kitto, J. Pudles & N. O. Kaplan*, *J. biol. Chemistry* **241**, 2431 (1966).
- [24] *A. L. Latner & A. W. Skillen*, *Isoenzymes in Biology and Medicine*, S.22, Academic Press, New York 1968.
- [25] *I. Gibbons, P. J. Anderson & R. N. Perham*, *FEBS Letters* **10**, 49 (1970).
- [26] *C. Y. Lai & T. Oshima*, *Arch. Biochemistry Biophysics* **144**, 363 (1971); *C. Y. Lai & C. Chen*, *ibid.* **144**, 467 (1971); *S.-M. Ting, C. L. Sia, C. Y. Lai & B. L. Horecker*, *ibid.* **144**, 485 (1971).
- [27] *O. Vesterber & H. Svensson*, *Acta chem. scand.* **20**, 820 (1966).
- [28] *B. J. Davis*, zit. in *H. R. Maurer*, «Disk-Elektrophorese», S.42, W. de Gruyter, Berlin 1968.
- [29] *D. H. Spackman, W. H. Stein & S. Moore*, *Analyt. Chemistry* **30**, 1190 (1958).

304. Nucleophile Substitution von Methyltosylat in dipolar aprotischen Lösungsmitteln¹⁾

von **Paul Müller** und **Bernard Siegfried**

Département de Chimie Organique de l'Université
30, quai Ecole-de-Médecine, 1211 Genève 4

(23. VII. 71)

Summary. The rate of the reaction between methyl tosylate and lithium bromide has been measured in various aprotic solvents. There is no simple correlation between rate and dielectric constant in aprotic solvents with low dielectric constant. In propylene carbonate the reaction is much slower than would be predicted on the basis of solvent activity coefficients. Solvation of substrate and transition state seems to play a role in determining the reaction rate in this solvent.

Gewisse bimolekulare nucleophile Substitutionen laufen in dipolar aprotischen Lösungsmitteln viel rascher als in protischen ab [1]. So wird z. B. die Reaktion von Lithiumbromid mit Methyljodid beim Übergang von Methanol zu Dimethylformamid als Solvens um einen Faktor von $5,8 \times 10^4$ beschleunigt [2]. Ferner ändert sich die Nucleophilie der Halogenid-Ionen von $J^- > Br^- > Cl^-$ in protischen zu $Cl^- > Br^- > J^-$ in aprotischen Lösungsmitteln.

Nimmt man an, dass die Nucleophilie der unsolvatisierten Halogenid-Ionen in der Reihenfolge $Cl^- > Br^- > J^-$ abnimmt, so können die beobachteten Phänomene folgendermassen in befriedigender Weise erklärt werden: Die Halogenid-Ionen werden durch protische Lösungsmittel durch Bildung von Wasserstoffbrücken umgekehrt zu ihrer Grösse stabilisiert, so dass sich ihre relative Reaktivität umkehrt, während die viel schwächere Solvation durch aprotische Lösungsmittel zu einer Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit führt, ohne dass sich die Reaktivitätssequenz ändert [3].

Es ist schwieriger, die manchmal beträchtlichen Reaktivitätsunterschiede innerhalb der Gruppe der aprotischen Lösungsmittel zu erklären. So reagiert z. B. n-Butylbromid mit Natriumazid in Hexamethylphosphortriamid ca. 10000mal schneller als

¹⁾ Vorläufige Mitteilung; eine ausführliche Publikation soll in *Helv.* erscheinen.