

Phosphodiesterase I. Spezifischer Nachweis nach Disk-Elektrophorese und Vorkommen in Pflanzen

Für den histochemischen Nachweis von Phosphodiesterase I wurde schon der Thymidin-5'-phosphorsäure- α -naphthylester verwendet¹. Kürzlich wurde über die Sichtbarmachung von Phosphodiesterase in Polyacrylamidgelen mit *bis-p*-Nitrophenylphosphat und Thymidin-5'-*p*-nitrophenylester berichtet², doch lassen sich damit keine dauerhaften Anfärbungen erzielen. Als Substrat für den spezifischen Nachweis von Phosphodiesterase I nach Disk-Elektrophorese synthetisierten wir den Uridin-5'-phosphorsäure- α -naphthylester (α -Naphthyl-pU).

Material und Methoden. Dünnschichtchromatographie wurde auf Cellulose MN 300 ausgeführt. Laufmittel I: Butanol-1/Essigsäure/Wasser (4:1:1, v/v); Laufmittel II: Isopropanol/0,1M Ammoniumbicarbonat, pH 7,5 (7:3, v/v). Zur Dünnschichtelektrophorese³ auf Cellulose dienten 0,1M Triäthylammoniumacetat, pH 3,9, und 0,1M Natriumbicarbonat, pH 8,6, als Puffer. Laufzeit jeweils 1 h bei 60 V/cm.

Synthese. Uridin-5'-phosphorsäure wurde in Pyridin mit der zehnfachen molaren Menge Acetanhydrid während 2 h acetyliert. Weitere Aufarbeitung wie bei der Acetylierung des Uridin-3'-phosphats⁴. Ausbeute an Monopyridiniumsalz von 2',3'-Di-O-acetyluridin-5'-phosphat: 92%. Rf = 0,29 (I) und 0,33 (II). Das Diacetylderivat wurde nach KHORANA⁵ mit α -Naphthol verestert und danach die Acetylgruppen mit methanolischem Ammoniak abgespalten. An einer Säule mit DEAE-Cellulose (HCO_3^-) wurde mit 60% Methanol überschüssiges α -Naphthol ausgewaschen und die Phosphorsäureester mit einem Gradienten aus Wasser und 0,04M Ammoniumbicarbonat, pH 8,4, chromatographiert. Der Gipfel des α -Naphthyl-pU wurde gefriergetrocknet. Ausbeute: 66% Ammoniumsalz des Uridin-5'-phosphorsäure- α -naphthylesters. Weisse, leicht wasserlösliche Substanz. $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_9\text{N}_3\text{P}$ (467,4). Ber. C 48,83, H 4,76, N 8,99, P 6,61. Gef. C 48,67, H 5,14, N 8,79, P 6,35. Rf = 0,42 (I) und 0,71 (II), elektrophoretische Beweglichkeit 0,62 bei pH 3,9 und 0,38 bei pH 8,6 (relativ zu Uridin-5'-phosphat = 1,0). Die Substanz wanderte stets einheitlich. Im UV-Spektrum ist λ_{max} = 265 nm, λ_{min} = 240 nm, ϵ_{max} = $12,3 \times 10^3$ (bei pH 7,0 und pH 2,0).

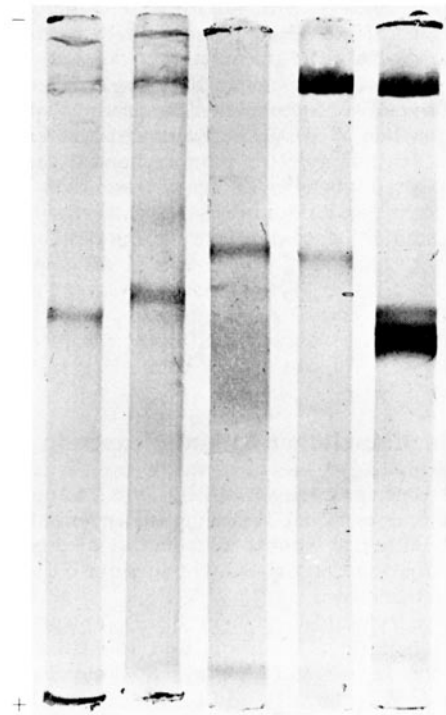
Inkubation. Zur Disk-Elektrophorese nach ORNSTEIN und DAVIS⁶ wurden rohe, durch Zentrifugieren geklärte Reibsaft von Pflanzen verwendet. Je 2 Gele wurden in einer Lösung von 4 mg α -Naphthyl-pU und 30 mg Diazo-echtröt (C.I. 37 120) in 40 ml Phosphatpuffer, pH 7,0, inkubiert. Am Ort der Enzymzone entwickelt sich ein rotbrauner Ring. Zur Ausbildung gleichmässiger Zonen ist es wichtig, die Lösung mechanisch zu rühren. Die Inkubationszeit richtet sich nach der Diesteraseaktivität (Figur).

10^{-2}M EDTA unterdrückt die Farbentwicklung vollständig, 10^{-2}M Mg^{++} verstärkt sie nur wenig. Der Bedarf an zweiwertigen Metallionen wird wahrscheinlich durch das Zink aus dem Diazo-echtröt, das als Komplex mit ZnCl_2 vorliegt, gedeckt.

Eine deutliche Hemmung trat auch auf bei Zusatz von 50 mg niedermolekularer RNS.

Spaltung von RNS. Nach der Elektrophorese von Zuckerrübenblattsaft wurden 12 Gele kurz angefärbt, die farbigen Stücke ausgeschnitten und elektrophoretisch eluiert. Mit den vereinigten Eluaten wurde nach TUVE und ANFENSEN⁷ die Spaltung von hochmolekularer RNS verfolgt, jedoch in 0,1M Phosphatpuffer von pH 7,0. Nach 15 h war die Extinktion bei 260 nm um 0,015 erhöht. Diese relativ geringe Erhöhung ist gesichert. Sie unterbleibt, wenn kein Mg^{++} zugesetzt wird.

Ergebnisse und Diskussion. Die Abhängigkeit der Reaktion von zweiwertigen Metallionen, die kompetitive Hemmung der Spaltung durch RNS, die Spaltung hochmolekularer RNS nach elektrophoretischer Elution des Enzyms und die Identität der mit α -Naphthyl-pU angefärbten Zonen mit den von WOLF⁸ erhaltenen sprechen dafür, dass α -Naphthyl-pU nur von Phosphodiesterasen gespalten wird und nicht auch von Nucleotidpyrophosphatasen, während die *p*-Nitrophenylester des Uridin-5'-phosphats und des Thymidin-5'-phosphats für beide Enzyme Substrate sind^{9,10}. So wurde mit der letzteren Verbindung in Kartoffeln eine Pyrophosphataseaktivität gefunden, die gegen dieses Substrat noch höher ist als die auch vorhandene Phosphodiesteraseaktivität⁹. α -Naphthyl-pU gibt



Phosphodiesterase I nach Disk-Elektrophorese von pflanzlichen Reibsaften, je 50 μl . In Klammern die Inkubationszeiten (min.) Von links nach rechts Blätter von Roggen (*Secale cereale*) (15); Gerste (*Hordeum spec.*) (15); Kartoffelknolle (*Solanum tuberosum*) (20); Blätter von Grünkohl (*Brassica acephala*) (20) und Zuckerrübe (*Beta vulgaris*, var. *saccharifera*) (10). Am oberen Ende der Gele unspezifische Gelbfärbungen durch Reaktion von Diazo-echtröt mit Fraktion-I-Protein, in der unteren Hälfte zum Teil durch pflanzliche Farbstoffe (Kartoffel), ganz unten Bromphenolblau.

¹ H. SIERAKOWSKA, H. SZEMPLINSKA und D. SHUGAR, Acta biochim. pol. 10, 399 (1963); zit. n. Chemical Abstracts 60, 4395e (1964).

² B. FARINA, B. CURTI und E. LEONE, Boll. Soc. ital. Biol. sper. 43, 27 (1967); zit. n. Chemical Abstracts 67, 50527f (1967).

³ H. STEGEMANN und B. LERCH, Analyt. Biochem. 9, 417 (1964).

⁴ Y. LAPIDOT und H. G. KHORANA, J. Am. chem. Soc. 85, 3852 (1963).

⁵ R. LOHRMANN und H. G. KHORANA, J. Am. chem. Soc. 86, 4188 (1964).

⁶ B. J. DAVIS, Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404 (1964).

⁷ T. W. TUVE und C. B. ANFENSEN, J. biol. Chem. 235, 3435 (1960).

⁸ G. WOLF, Experientia 24, 890 (1968).

⁹ W. E. RAZZEL, Biochem. biophys. Res. Commun. 22, 243 (1966).

¹⁰ W. E. RAZZEL, Can. J. Biochem. 46, 1 (1968).

nach der Elektrophorese von Kartoffelhomogenat nur eine, durch EDTA hemmbare Zone (Figur).

Ausser bei den Beispielen der Figur wurde Phosphodiesterase I auch in Blättern von Spinat (*Spinacia oleracea*), Neuseeländer Spinat (*Tetragonia expansa*), Bohnen (*Phaseolus vulgaris*), Schnittlauch (*Allium schoenoprasum*) und Stiefmütterchen (*Viola tricolor*) gefunden. In Extrakten aus ruhenden Zuckerrübensamen konnte nach Disk-Elektrophorese dieselbe Phosphodiesterase nachgewiesen werden wie in Blättern, jedoch in schwächerer Aktivität. Die Aktivität nimmt mit dem Alter der Blätter zu. In den Blättern von Zuckerrüben (Figur) und von Weizen⁸ kommt Phosphodiesterase I in multiplen Formen vor.

Dass Phosphodiesterase I in Pflanzen wahrscheinlich weit verbreitet ist, wurde bereits ausgesprochen⁹. Sie wurde angereichert aus Malzkeimen¹¹ und Möhren¹², konnte jedoch nicht ganz von einer Phosphomonoesteraseaktivität getrennt werden. Nach Disk-Elektrophorese von Zuckerrübenblattsaft tritt an der Stelle der Phosphodiesterasezone keine Phosphomonoesteraseaktivität auf (geprüft mit α -Naphthylphosphat).

Dieselben Zonen wie mit α -Naphthyl-pU erhält man mit dem Thymidin-5'-phosphorsäure- α -naphthylester, der auf dem gleichen Weg synthetisiert wurde. Dem Verhalten der *p*-Nitrophenylester entsprechend¹³ reagiert der Thymidylsäurenaphthylester noch wesentlich schneller. Der hohe Preis der Thymidylsäure rechtfertigt jedoch für den vorliegenden Zweck die Verwendung des Uridylsäureesters.

Summary. The α -naphthylester of uridine-5'-phosphate was synthesized as a specific substrate for phosphodiesterase I which allows the identification of the enzyme after disc electrophoresis. Thus, phosphodiesterase I was shown to be present in several plants, in some of which it occurs in multiple forms.

B. LERCH^{14,15}

Institut für Biochemie der Biologischen Bundesanstalt,
351 Hann.-Münden (Deutschland),
10. Mai 1968.

¹¹ J. HOLBROOK, F. ORTANDERL und G. PFLEIDERER, *Biochem. Z.* 345, 427 (1966).

¹² C. HARVEY, L. MALSMAN und A. L. NUSSBAUM, *Biochemistry* 6, 3689 (1967).

¹³ H. G. KHORANA in *The Enzymes* (Ed. P. D. BOYER, H. LARDY und K. MYRBÄCK; Academic Press, New York and London 1961), Vol. 5, p. 79.

¹⁴ Herrn Dr. H. STEGEMANN sei für sein ständiges Interesse an dieser Arbeit gedankt, Herrn Dr. C.-E. BÜCHTING (Kleinwanzlebener Saatzucht AG, Einbeck) für finanzielle Unterstützung, Fräulein F. HOLLENSSEN und Herrn K. MASSIE für gute Mitarbeit.

¹⁵ Neue Anschrift: Institut für Biochemie der Biologischen Bundesanstalt, 33 Braunschweig (Deutschland).

Nachweis pflanzlicher Ribonukleasen in Polyacrylamid-Gelen nach Disk-Elektrophorese

In Agar-Gelen wurden sowohl RNasen als auch DNasen nach elektrophoretischer Trennung entweder auf indirekte Weise mit Hilfe der Kontaktfilm-Methode¹⁻⁴ oder direkt durch Inkubation der Gel-Schicht in einer Nukleinsäurelösung⁵ nachgewiesen.

Für Polyacrylamid-Gele liegt bisher, soweit bekannt, nur eine Arbeit über Trennung und Identifizierung von DNasen vor⁶. In diesem Fall wurde hochmolekulare DNS während der Polymerisation in das Gel eingeschlossen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass bei Inkubation der Polyacrylamid-Gele in einer Lösung von niedermolekularer RNS ausreichende Mengen der Nukleinsäure eindringen, so dass auf diese Weise ein Nachweis von RNasen nach Disk-Elektrophorese möglich ist.

Material und Methoden. Bohnen (*Phaseolus vulgaris*, Sorte Favorit bzw. Sorte Red Kidney) und Weizen (*Triticum aestivum*, Sorte Nordgau) wurden im Thermostaten bei 25°C und 6000 Lux, Zuckerrübenpflanzen (*Beta vulgaris*, ssp. *esculenta* f. *altissima*, Sorte Erta) im Gewächshaus bei 12°C und 2000 Lux angezogen. Kallusgewebe aus Bohnen-Hypocotyl (*P. vulgaris*, Sorte Favorit) wurde auf White'schem Nährmedium kultiviert, dem 2,4-D, Kinetin und Erbsenextrakt hinzugefügt worden war⁷.

Primärblätter des Weizens (20 g Frischgewicht) wurden 10 Tage nach Aussaat, Bohnenwurzeln (20 g Fgw.) 15 Tage und Rübenblätter (20 g Fgw.) 60 Tage nach Aussaat, Bohnen-Kalli (30 g F.Gw.) 30 Tage nach Übersetzen auf ein neues Nährmedium geerntet.

Das Pflanzenmaterial wurde nach Zugabe der jeweils gleichen Gewichtsmenge Extraktionspuffer (0,05M Tris-HCl pH 7,5, 0,5M KCl, 0,1% Cystein-HCl, 10% Saccharose) im Mörser bei 5°C mit Quarzsand zerrieben, über

ein Nesseltuch filtriert und anschliessend 20 min bei 30000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde nach Reinigung über eine Sephadex-(G-25-)Säule mit Hilfe von Polyäthylenglycol Typ 20000 (Fluka) auf 2-5 ml eingeeengt. Von diesem Extrakt wurde eine ca. 500 µg Protein enthaltende Flüssigkeitsmenge aufgetragen.

Die Herstellung der Gele erfolgte nach DAVIS⁸. Bei einer Stromstärke von 2,6 mA pro Röhrchen ($\varnothing 6 \times 110$ mm) dauerte die Trennung ca. 3-4 h. Sie wurde beendet, wenn die Bromphenolblaubande den unteren Rand des Röhrchens erreicht hatte.

Die aus den Glasröhrchen entfernten Gele wurden zunächst 10 min in 0,2M Acetat-Puffer pH 5,0 bzw. 0,05M Tris-HCl-Puffer pH 7,5 gewaschen und anschliessend in einer RNS-Lösung (Hefe-RNS, Fa. Böhlinger, in 0,2M Acetat-Puffer pH 5,0 bzw. 0,05M Tris-HCl-Puffer pH 7,5) 2 h inkubiert. Das Fixieren und gleichzeitige Anfärben der nicht abgebauten RNS erfolgte in 0,2M Acetat-Puffer, der 1% Lanthanacetat und 1% Methylenblau enthielt.

¹ G. RIOU und C. PAOLETTI, *Nature* 199, 65 (1963).

² M. WAGNER, *J. Chromat.* 15, 108 (1964).

³ C. POORT und W. J. W. VAN VENROY, *Nature* 204, 684 (1964).

⁴ N. RESSLER, E. OLIVERO, G. R. THOMPSON und R. R. JOSEPH, *Nature* 210, 695 (1966).

⁵ J. URIEL und JANINE COURCON, *C. r. hebdom. Acad. Sci., Paris* 253, 1876 (1961).

⁶ J. BOYD und H. K. MITCHELL, *Analyt. Biochem.* 13, 28 (1965).

⁷ R. WARICK, in Vorbereitung.

⁸ B. J. DAVIS, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 404 (1964).