Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
12. Jg. 1974, S. 81–86

Disk-Elektrophorese multipler Formen alkalischer Phosphatasen¹⁾

Untersuchungen über alkalische Phosphatasen menschlicher Gewebe, I. Mitteilung

Von K. Lorentz, Barbara Flatter und D. Heydrich²⁾

Aus der I. Medizinischen Klinik (Direktor: Prof. Dr. U. Ritter) der Medizinischen Hochschule Lübeck

(Eingegangen am 16. April/30. November 1973)

Die Verteilung multipler Formen der alkalischen Phosphatase in Seren und menschlichen Geweben wird nach Disk-Elektrophorese in Polyacrylamid untersucht. Bei optimaler Trennung der Aktivitäten aus einigen Organhomogenaten lassen sich in den Seren keine typischen Verteilungsmuster bei verschiedenen Leiden nachweisen. Die Anwendung des Verfahrens für die Differentialdiagnose von Erkrankungen wird daher kritisch beurteilt, da im menschlichen Serum möglicherweise nur ein Isoenzym vorkommt.

Disc-electrophoresis of multiple forms of alkaline phosphatase. Studies on human alkaline phosphatases, I

The distribution of alkaline phosphatase activity in sera and human tissues was investigated by disc-electrophoresis in polyacrylamide gels. Though activities from various tissues can be clearly separated, the enzyme patterns in sera from different diseases show no typical differences, that could serve in clinical diagnosis. This may be due to the occurrence of a single isoenzyme in serum.

Neben Celluloseacetat (1, 2), Agar (3), Agarose (4, 5) und Stärke (6–15) dient vor allem Polyacrylamid (12–14, 16–20) wegen seines guten Molekülsiebeecktes zur elektrophoretischen Trennung von Isoenzymen der alkalischen Phosphatase (Orthophosphorsäuremonoester-phosphohydrolase, EC 3.1.3.1) in menschlichen Gewebsextrakten und Seren. Da das intestinale Enzym besser im Stärkemedium, die aus dem Knochen stammende Aktivität aber besser im Polyacrylamidgel von Leberphosphatase abzutrennen ist (14), wird nachfolgend eine Methode zur gleichzeitigen Trennung dieser drei Aktivitäten beschrieben, die auch für jedes Organ typische Muster liefert. Mit dieser Technik wird, unter Variation der Trennbedingungen und im Vergleich mit anderen Verfahren (19, 20) das Verhalten der alkalischen Phosphatase in Seren von Gesunden und Kranken untersucht, da die vorliegenden Arbeiten (1, 2, 8, 11–15, 17–22) in diesem Punkt einander widersprechen.

Material und Methoden

Wir untersuchten Seren von 20 Gesunden und 85 Patienten mit verschiedenen Erkrankungen sofort nach der Blutentnahme oder, mit gleichen Ergebnissen, nach höchstens einjähriger Aufbewahrung bei -28°C . Außerdem wurden makroskopisch und histologisch unauffällige Proben von Pankreas, Leber, Lebermetastasen, Dünndarm, Niere, Nebennierenrinde, Prostata, Milz und Knochen 12–24 h post mortem entnommen, mit Natriumchloridlösung (155 mmol/l) möglichst blutfrei gespült und nach Befreiung vom Bindegewebe mit dem Skalpell in etwa 0,2 g schwere Stücke zerteilt. Knochen zerkleinerten wir mit dem Mikro-Dismembrator (Braun, Melsungen) und arbeiteten ihn gleich den anderen Geweben wie folgt auf:

1 g Gewebe wurde mit 5 ml Natriumchloridlösung (155 mmol/l), die Triton X-100 (10 g/l) enthielt, 3×10 s unter Eiskühlung mittels Ultra-Turrax (Jahnke & Kunkel, Staufen) und anschließend 3×20 s bei gleichen Bedingungen nach Potter–Elvehjem mit einem Glaspistill homogenisiert. Die Homogenate wurden ebenso wie intraoperativ entnommene filtrierte Blasengalle und ein nach Marks (23) präpariertes Leukocytenkonzentrat bei -28°C eingefroren. – Nach dem Auftauen zentrifugierten wir die Proben bei $+4^{\circ}\text{C}$ 30 min mit 17000 g und trennten die Überstände in gleicher Weise wie die Seren elektrophoretisch auf.

Reagenzien³⁾

Riboflavin, TEMED und Triton X-100 stammten von Serva (Heidelberg), Humanalbumin und β -Lipoprotein von den Behringwerken (Marburg), „Pathotrol“ und „Monitrol X“ von Merz & Dade (Bern, Schweiz), Neuraminidase von Boehringer (Mannheim) und die übrigen Reagenzien von Merck (Darmstadt), alle in der besterhältlichen Qualität. Polyacrylamid wurde in Chloroform, BIS in Aceton umkristallisiert (23). Alle Lösungen setzten wir, sofern nicht anders vermerkt, mit bidest. Wasser an.

Elektrodenpuffer (Tris 95 mmol/l, Magnesiumchlorid 2 mmol/l) pH 9,5; Ionenstärke 0,06:

11,4 g Tris und 407 mg $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ in etwa 800 ml Wasser lösen, mit kalt gesätt. Borsäure auf pH 9,5 einstellen und auf 1000 ml auffüllen. 4 Wochen haltbar.

Lösungen für das Trenngel (1 Tl. A, 1 Tl. B u. 2 Tle. C)

A. 4,55 g Tris in ca. 60 ml Wasser lösen und mit 0,12 ml TEMED mischen. Nach Einstellen mit kalt gesätt. Borsäure auf pH 9,5 auf 100 ml auffüllen.

¹⁾ Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.
²⁾ Die Arbeit enthält wesentliche Teile der Inauguraldissertation von D. Heydrich.

³⁾ Benutzte Abkürzungen:
BIS N, N'-Methylenbisacrylamid
CTAB N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid
DMF Dimethylformamid
SDS Natriumhydrogendodecylsulfat
TEMED N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin

- B. 24 g Acrylamid und 1 g BIS lösen und auf 100 ml auffüllen.
C. 0,2 g Ammoniumperoxodisulfat mit Wasser auf 100 ml lösen.

Lösungen für das Sammelgel (1 Tl. D, 2 Tle. E, 1 Tl. F u. 4 Tle. G)

- D. 2,61 g Tris und 0,46 ml TEMED in etwa 80 ml Wasser lösen, mit konz. Essigsäure auf pH 6,8 einstellen und auf 100 ml auffüllen.
E. 16 g Acrylamid und 1 g BIS mit Wasser auf 100 ml lösen.
F. 4 mg Riboflavin in 100 ml Wasser lösen.
G. 40 g Saccharose (Rohrzucker) mit Wasser lösen und auf 100 ml auffüllen.

Lösung C muß alle 2 Tage angesetzt werden und ein pH über 2,0 aufweisen (anderenfalls Korrektur mit Ammoniumhydroxid). Alle anderen Lösungen sind 1 Woche bei + 4° C haltbar.

Bromphenolblaulösung (10 g/l Äthanol)

Reaktionspuffer (Tris 0,25 mol/l, Salzsäure 60 mmol/l, DMF 0,65 mol/l, Magnesiumchlorid 0,5 mmol/l) pH 9,0: 10 ml DMF, 6,05 g Tris und 20 mg $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ in 160–170 ml Wasser lösen, mit konz. Salzsäure auf pH 9,0 einstellen und auf 200 ml auffüllen. 4 Wochen haltbar.

Substrat-Diazonium-Lösung: 1 mg 1-Naphthylphosphat und 1 mg Echtblausalz B pro ml Puffer zusetzen. Lösung bis zu 60 min haltbar.

Trichloressigsäure (200 g/l) – DMF (50 ml/l)

Essigsäure (70 g/l)

Sulfosalicylsäure (200 g/l)

Amidoschwarz 10B (20 g/l) in Essigsäure

Geräte

Wir trennten die Proben in 8 cm langen Duranglasröhrchen (mit 0,5 cm lichter Weite und plangeschliffenen Enden) mit der analytischen Apparatur „Standard-PAA“ (Biomol, Iivesheim) und beurteilten die Gelzylinder durch Betrachtung und Ausmessen der Banden oder mittels Densitometrie bei 546 nm am Photometer „Eppendorf 1101 M“ mit Pherogrammauswerter 2602 und Kompensationsschreiber 4412 (sämtlich Netheler & Hinz, Hamburg).

Vorgehen

In senkrecht gestellte Röhrchen, deren untere Enden in der Apparatur mit „Parafilm“ (Marathon Prod., Neenah, Wisc. USA) dicht verschlossen sind, wird frisch angesetztes Trenngel nach 2 min langer Entlüftung (Exsikkator, Wasserstrahlpumpenvakuum) 6,1 cm hoch mit einer Pipette eingefüllt und vorsichtig etwa 0,2 cm hoch mit bidest. Wasser überschichtet. Diese Flüssigkeit wird nach dem Eintritt der Polymerisation (20–30 min) abgeschleudert und durch etwa 0,5 ml frisches entlüftetes Sammelgel, das sofort wieder abgeschüttelt wird, ausgespült. Man füllt dann Sammelgel 1,4 cm hoch in das Röhrchen, überschichtet wieder vorsichtig mit Wasser (Spritze mit enger Nadel) und entfernt es nach abgeschlossener Polymerisation (15–25 min bei 366 nm oder Tageslicht). Es resultieren transparente Gelzylinder mit einer Gesamtlänge von 7,3 cm.

Die Röhrchen bleiben bei Verschluss auch des oberen Endes 24 h verwendbar und werden innerhalb dieser Zeit, nach Entfernung des Parafilms in den bis zur Marke mit Elektrodenpuffer gefüllten Anodenteil der Kammer gestellt. Dann wird der kathodische Teil ebenso gefüllt und mit 2–3 Tropfen Bromphenolblaulösung versetzt. Durch diesen Puffer hindurch setzt man 20 µl Serum oder – je nach Aktivität – 10–20 µl einer Mischung von Saccharose (Lsg. G) und Organextrakt bzw. Galle zu gleichen Teilen auf.

Nach Schließen des Deckels, der die Anode trägt, wird 5–10 min eine Spannung von 90 V, nach Eindringen der Proben ins Sammelgel eine Spannung von 250 V für etwa 60 min angelegt. Nach dieser Zeit ist das bromphenolblau markierte Albumin ungefähr 6 cm gewandert, und die Gele können in üblicher Weise entnommen werden. Man legt sie zum Nachweis der Enzymaktivität 20 min bei 37° C in Substrat-Diazonium-Lösung und unterbricht durch Überführen in Trichloressigsäure-DMF für 20 min. Anschließend wird 2 × 30 min in Essigsäure entfärbt. Proteine werden durch sofortiges Einbringen in Sulfosalicylsäure für die gleiche Zeit, 2 × 15 min Wässerung,

10 min Anfärben in Amidoschwarz 10B und Entfärben innerhalb von 24 h in mehrfach erneuerter Essigsäure dargestellt (24).

Wir benutzten diesen Ansatz für alle Trennungen, verglichen ihn mit den Methoden anderer Autoren (16, 18, 19, 20) und prüften den Einfluß von Detergentien, Proteinen und Inhibitoren wie folgt:

- Butanolextraktion: 5 Vol. der Probe mit 1 Vol. *n*-Butanol 5 min schütteln und 30 min mit 17000 g zentrifugieren. Verwendung der wässrigen Phase.
- Zusatzversuche: 1 Vol. der Probe mit 1 Vol. CTAB (5 g/l) oder 1 Vol. Triton X-100 (10 g/l u. 50 g/l) bzw. 1 Vol. SDS (2 g/l) – 2-Mercaptoäthanol (1 g/l) oder EDTA (20 mmol/l) mischen und im Standardansatz (bei EDTA jedoch ohne Magnesiumchlorid im Elektrodenpuffer) trennen.
- Elektrophorese in Detergentien: Elektrodenpuffer, Trenngel und Sammelgel wurden Triton X-100 (bis zu einer Endkonzentration von 10 ml/l) oder SDS (bis zu 1 g/l) bei der Bereitung der Lösungen zugesetzt.
- 5 Vol. verschiedener Humanserum, „Pathotrol“, Humanalbumin- (70 g/l) bzw. Lipoproteinlösung (4 g/l) wurden jeweils mit 1 Vol. Organextrakt gemischt und anschließend getrennt.
- Zusatz von EDTA (Endkonzentration 20 mmol/l) zu magnesiumchloridfreiem Elektrodenpuffer.

Um die Hemmung der verschiedenen Aktivitäten zu prüfen, fügten wir der Substrat-Diazonium-Lösung *L*-Cystein bzw. *L*-Phenylalanin oder Cholsäure zu, so daß deren Konzentration im Ansatz 5 mmol/l oder 10 mmol/l (Cholsäure) betrug.

Außerdem untersuchten wir die Wirkung von Neuraminidase (9, 25, 26) durch Inkubation von 0,5 ml Serum (oder Organextrakt) mit 60 mU Enzym in 0,5 mol/l Acetatpuffer: 8 h, 37° C, Gesamtvolumen 0,7 ml, pH 6,0.

Ergebnisse

Empfindlichkeit, Spezifität, Präzision

Beim Einsatz von 20 µl Serum wird eine 4–6 mm breite gelbe Albuminzone erhalten, 4–12 mU Serumaktivität erzeugen eine 1,2–2 mm breite karminrote Bande auf gut entfärbtem Untergrund. Höhere Aktivitäten führen zur Überladung, während bei Verwendung von *p*-Toluidin-5-brom-4-chlor-3-indolylphosphat (27, Substrat bei l. c. 19 u. 20) noch 5–18 mU ohne Unschärfe oder Zonenverbreiterung im völlig farblosen Zylinder dargestellt werden (Abb. 1). Die Densitometrie zeigt deshalb eine ruhigere Basislinie, die Intensität der Enzymbanden ist hingegen geringer als bei der Diazotierungstechnik, die auch Hämoglobin und Gallenfarbstoffe (Milz, Galle, ikterische Seren) durch blau-grüne Färbung besser als obiges Substrat von Phosphatasefraktionen unterscheidet. Im übrigen werden mit beiden Nachweisen identische Aktivitätsmuster ohne unspezifische Anfärbung (Kontrolle durch Elution und kinetischen Test) erhalten. Auch die Haltbarkeit ist gleich, da bei Aufbewahrung in Essigsäure (3 Monate, 4° C) densitometrisch keine Verluste an Farbtintensität auftraten.

Da bei verschiedenen Techniken (17, 19) Galle und intestinale Mucosa Phosphataseaktivität im Sammelgel nachweisen lassen, haben wir, analog zur Darstellung bei den zum Vergleich dienenden Verfahren (17, 19, 20), die Laufstrecke vom Start aus gemessen. Die

Abb. 1. Pherogramme von drei Seren bei Prostatacarcinom mit Knochenmetastasen (links), Lebercirrhose (Mitte) und akuter Hepatitis (rechts) mit 2 Methoden. Die Markierung 0 entspricht der Gelgrenze, die Anfärbungen bei 5 cm dem Albumin. Bei 1 cm erscheint die schwache, gesplattene Bande I. Die kürzeren Zylinder (loading und stacking gel entfernt) bestehen aus Canalco-Gel (29).

gleichzeitige Trennung eines Serums in den 12 Röhren desselben Laufs ergab für die Mitte der Albuminbande eine Distanz von 55 ± 1 mm (45 ± 1 mm ab Gelgrenze), für die Zone der Phosphataseaktivität $33 \pm 0,5$ mm ($23 \pm 0,5$ mm). Bei 12 aufeinanderfolgenden Läufen desselben Serums betrugen die entsprechenden Werte für Albumin 58 ± 5 mm (48 ± 5 mm) und für die Enzymaktivität 35 ± 3 mm (25 ± 3 mm). Es resultierte damit trotz der unterschiedlichen Laufstrecken ein konstanter „ R_F -Wert“ der Phosphatasebande von 0,51–0,52 (auf den Abstand Gelgrenze-Albumin bezogen). Beim Originalverfahren (20) und einer modifizierten Technik (19) mit einem käuflichen Reagenzien-satz (Canalco QDA specific reagent kit; Rockville, Md., USA), die wegen der zerfließlichen Start- und Sammelgele erst eine Messung vom Beginn des Trenngels an zulassen, ermittelten wir für beide übereinstimmend folgende Werte: Albumin 42 ± 1 (parallel) und 44 ± 5 mm (wiederholte Bestimmung), Phosphatase 18 ± 1 und 19 ± 3 mm, „ R_F -Wert“ 0,43. Die Präzision der verglichenen 3 Methoden war somit gleich, und durch Mitführen eines Standards oder von Albumin bei jedem Lauf ließen sich alle gefärbten Zonen exakt identifizieren.

Organextrakte

Pankreas und Prostata besaßen keine pherographisch darstellbare Aktivität, Leukocyten und Milz wiesen ein identisches Muster auf. Zylinder mit starker Anfärbung an den Gelgrenzen oder am Start, besonders bei Verwendung eines loading gel (19, 20), wurden

nicht ausgewertet. Da diese Zonen bei Seren, 17 000 g- und 100 000 g-Überständen gleichermaßen, in Abhängigkeit von der eingesetzten Aktivität, auftraten, sind sie als Überladungsartefakte und nicht als Äquivalente partikulär gebundener Enzymfraktionen anzusehen. Die bei der Auftrennung erhaltenen Muster zeigen Abbildung 2 und Tabelle 1.

Danach erschien bei 18 mm in allen Organextrakten eine unterschiedlich intensive Bande (I), die im Serum allerdings sehr schwach war (Abb. 1) und zuweilen auch fehlte (Abb. 2). Die starke anodische Zone bei 35 mm (III) war Milz, Galle, Serum, Leber und Niere gemeinsam und verschwand nach Inkubation mit Neuraminidase. Von diesem Typ wichen die Pherogramme von Knochen und Ileummucosa ab. Alle Muster erwiesen sich bei der wiederholten Aufarbeitung von Organen als konstant. Nur bei Leber und Dünndarmschleimhaut kam es zu folgenden Änderungen: Proben aus chronisch gestautem und aus carcinomatös verändertem Lebergewebe zeigten gegenüber normalem Parenchym ein inverses Verhalten, da die anodische Bande bei 35 mm

Abb. 2. Pherogramme von 17 000 g-Überständen und Normalserum, teilweise nach Inkubation mit Neuraminidase (+ N). Die Gelgrenze liegt bei 1 cm, 0 entspricht dem Start (Kathode). Von rechts nach links: Milz (Hämoglobin von 40–50 mm), Galle + N, Galle, Serum + N, Serum (Albumin um 55 mm), Leber + N, Leber, Ileum, Knochen.

Tab. 1. Aktivitätsverteilung alkalischer Phosphatasen bei Polyacrylamid-Elektrophorese. Angabe der Laufstrecke Start-Bandenmitte in mm, schwache Farbreaktion in Klammern.

Organ	I	IIa	IIb	III
Niere	18			(35)
Milz	18			35
Galle	18			35
Serum	(18)			35
Leber	(18)			35
	18			35
Ileum	(18)	27		
Jejunum	18	27		
Knochen	18–20		30	

schwach, die sonst wenig intensive Bande bei 18 mm stark ausgebildet war. In der Schleimhaut des oberen Jejunums ließ sich neben der konstant angetroffenen Aktivität bei 27 mm eine kathodische Fraktion bei 18 mm nachweisen, bei Aufarbeitung von Duodenalmucosa fand sich neben beiden häufig, aber nicht immer eine weitere Bande bei 38 mm.

Die zum Vergleich durchgeführten Trennungen mit Canalco-Reagenzien nach *Johnson et al* (19) sowie *Dingjan et al* (20) stimmten in Aktivitätsverteilung und -intensität überein, obwohl die Erhöhung der Acrylamidkonzentration im Trenngel auf 10% (19) gegenüber 7% im Originalverfahren (20) schärfere Zonen liefern soll. Da die schnellste Fraktion nur eine Laufstrecke von 19 mm gegenüber 25 mm beim oben beschriebenen Verfahren ab Gelgrenze aufwies, lagen die Banden so eng wie in den Abbildungen der Arbeit von *Johnson et al* (19) zusammen und erlaubten kaum die Unterscheidung von Knochen- und Leberphosphatase. Im übrigen entsprachen Reihenfolge und Intensität der Fraktionen unseren Mustern (Tab. 1), mit Ausnahme einer zusätzlichen Bande, die bei der Auftrennung von Duodenalmucosa im stacking gel von Canalco beobachtet wurde. Die Verwendung von substituiertem Indolylphosphat lieferte bei allen Verfahren schärfere Banden als die Hydrolyse von 1-Naphthylphosphat.

Seren

Bei allen Seren (Tab. 2) fanden wir, unerachtet ihrer Herkunft, eine kräftige Bande III mit einem R_F -Wert“ von 0,51 in unserem und von 0,43 im System von Canalco (19, 20). Sie ließ beim Aufsetzen von mehr

als 15 mU eine Spaltung (s. Abb. 1 links und Mitte), aber nie eine Verdopplung mit 2 Gipfeln in der Densitometrie erkennen, sofern keine verbreiterten Zonen als Überladungsartefakte resultierten. Die Bilder entsprachen damit nicht denen von *Dingjan et al* (20), sondern den Abbildungen von *Johnson et al* (19). Während bei den genannten Verfahren Leber- und Knochenphosphatase so eng zusammenlagen, daß die Zuordnung der Serumaktivität erst nach Anwendung von Denaturierung oder Inhibition einer Komponente gelang (19), fand sich bei unserem Vorgehen, das beide Enzyme zweifelsfrei voneinander trennt, in keinem Serum eine Aktivität mit der Position der schnellen Knochenbande (IIb). Bei allen Methoden fehlte ebenfalls die für das Intestinum typische Zone IIa im Serum.

Neben der Bande III, die sich nach dem parallel angefertigten Pherogramm der Proteine zwischen α_2 -Glykoprotein und Coeruloplasmin befand, trat in vielen Seren, ohne Zusammenhang mit der Ausgangsaktivität oder der Erkrankung, eine schwache Bande I auf, die mit allen Techniken nachweisbar war und meist eine leichte Spaltung verriet (Abb. 1). Sie lag kathodisch vom α_2 -Makroglobulin, doch erlaubte ihr Proteingehalt ebensowenig eine Anfärbung mit Amidoschwarz wie bei der Bande III. Andere aktive Zonen wurden nie beobachtet. „Monitrol X“ besaß nur die Bande III.

Eigenschaften

Die typischen Muster der Organextrakte und Seren änderten sich durch den Zusatz von Triton X-100, SDS-Mercaptoäthanol oder EDTA zur Probe nicht. CTAB verursachte eine Verkürzung aller Laufstrecken bei gleichbleibenden „ R_F -Werten“, und die vorgängige Extraktion mit *n*-Butanol verbreiterte (analog 17) nur die Banden ohne Modifikation ihrer Lage. Auch die Zugabe von Detergentien zum Elektrodenpuffer hatte bis auf die Abtrennung des Bilirubins vom transportierenden Albumin keinen Effekt, EDTA im Puffer führte zur irreversiblen Enzymhemmung. Diese Befunde ließen keine Abspaltung der Aktivität von möglichen Trägerproteinen erkennen.

Auch ein Transport der Phosphatase durch Proteine war auszuschließen. Der Zusatz von Serum, „Pathotrol“, Humanalbumin und β -Lipoprotein zu 17000 g-Überständen der Organextrakte änderte deren Enzymmuster nicht. Die Banden von Albumin und β -Lipoprotein (R_F 0,30) enthielten trotz vorheriger Beladung mit 15–30 mU keine Aktivität. Die Wirkung von Neuraminidase entsprach den Beobachtungen der Voruntersucher (9, 25, 26): Das Enzym der Ileummucosa ausgenommen, nahm die Wanderungsgeschwindigkeit der Phosphatasen aus allen anderen Organen und sämtlichen Seren bei unveränderter Gesamtaktivität deutlich ab (Abb. 2). Dabei war die Bande III in jedem Fall betroffen, die Bande I jedoch nur beim Leberenzym. Jedes Serum wies dieselbe Verkürzung der Laufstrecke auf 24 mm (14 mm ab Gelgrenze) auf, wie sie bei den

Tab. 2. Übersicht der untersuchten Probanden; Diagnose autopsisch, biopsisch, laparoskopisch oder operativ gesichert.

Kollektiv	n	Bereich (U/l)
Erwachsene Normalpersonen (Gesunde, Blutspender)	20	40– 156
Cholestase ohne Leberbeteiligung (Cholelithiasis, Cholecystitis)	11	161–1130
Lebererkrankungen ohne Cholestase (akute u. chron. Hepatitis, Cirrhose)	10	92– 269
Lebererkrankungen mit Cholestase (chron. aggressive Hepatitis, Cirrhose)	10	140–1060
Tumoren mit Lebermetastasen (Magen-, Colon-, Mamma-, Bronchial-, Pankreas-, primäres Lebercarcinom)	13	300–1330
Tumoren ohne Lebermetastasen (Bronchial-, Magencarcinom)	3	221– 257
Prostatacarcinom mit Knochenmetastasen	3	1620–2570
Haematologische Erkrankungen (Lymphogranulomatose, Panmyelopathie, Polycythämie, Plasmocytom)	10	39– 485
Pankreatitis	6	106– 960
Sonstige (Pneumonie, Diabetes, Hypertonie, chron. Pyelonephritis, Lungenembolie)	19	54– 267

Banden I der Organe beobachtet wurde. Eine Aufspaltung in einen neuraminidaseempfindlichen und -resistenten Anteil trat nicht auf.

Die Gegenwart von Inhibitoren in der Substrat-Diazonium-Lösung führte nicht zu selektiver Hemmung einzelner Banden. Cholsäure inhibierte Milzextrakt total und die anderen Proben meßbar. *L*-Phenylalanin hemmte alle Extrakte und Seren außer Milz und Knochen deutlich, *L*-Cystein sämtliche Proben total.

Diskussion

Das beschriebene Verfahren ist eine Modifikation der Methoden von *Smith et al* (16) sowie *Walker & Pollard* (17, 28). Letztere liefert zwar scharfe Banden für Serum-, Leber- und intestinale Aktivität, aber nicht für Knochen- und Nierenenzym. Bei Techniken mit Anwendung eines loading gel (19, 20, 29) fanden wir mit Organextrakten Banden, die unseren in Lokalisation und Schärfe entsprachen, durch geringere „ R_F -Werte“ aber enger zusammenlagen.

Trotz optimaler Trennung von Leber-, Knochen- und Dünndarmphosphatase trafen wir im Serum, von seltener Aufspaltung (5 von 105 Seren) abgesehen, regelmäßig eine einheitliche kräftige Bande vom Typ III und gelegentlich (20 von 105) eine schwache vom Typ I an. Da wir dieselben Ergebnisse mit 2 Modifikationen (19, 29) der loading gel-Technik mit inkonstanter, geringer, wechselnder oder fehlender Aufspaltung der Bande III wie *Johnson et al* (19) erhielten, halten wir die von *Dingjan et al* (20) als Isoenzymdarstellung bewertete Ausbildung dieser Segmente vielmehr für die Heterogenität einer einzigen Serumaktivität in Abhängigkeit vom Sekretorstatus und dem ABO-System (18). Dafür sprechen folgende Gründe:

1. Wie schon *Walker & Pollard* (17) bemerkten, besteht zwischen dem aus Knochengewebe extrahierten Enzym und seiner sog. Serumbande keine Koinzidenz. Dies gilt nach unseren Untersuchungen mit verschiedenen Gelen auch für die intestinale Aktivität.
2. Eine Behandlung von Seren mit Reagenzien, die eine Abspaltung des Enzyms von Trägerproteinen oder eine Änderung seiner Quartärstruktur bewirken, bringt nicht die Banden der Knochen- und intestinalen Phosphatase hervor.
3. Analog dem Mißerfolg von *Walker & Pollard* (17), durch Mischen von Serum mit Organextrakten nur die Bande III zu erzeugen, schlugen auch unsere zusätzlichen Versuche, neben Seren auch andere Trägerproteine mit Aktivitäten aus Geweben zu beladen, fehl.

Die Proteinelektrophorese ließ außerdem am Ort der Enzymaktivität keine meßbare Eiweißkonzentration entdecken.

4. Bei der Inkubation von Serum mit Neuraminidase müßte sich die Bande III nach Abbau der Neuraminsäure gelegentlich in 2 Anteile, einen sensiblen (Leber und Knochen) und einen resistenten (Dünndarm) aufspalten. Dies trat nie auf.

5. 5 mmol/l *L*-Phenylalanin hemmte nicht die Aktivität bei Auftrennung von Knochenextrakten, unterband aber die Darstellung der Bande III in allen Seren gänzlich, obwohl letztere nach *Dingjan et al* (20) einen ossären Anteil enthalten soll.

Entsprechende Widersprüche zur Existenz einer schnellwandernden Knochenfraktion finden sich in der Literatur. *Johnson et al* (19), die ebensowenig wie *Dingjan et al* (20) ihre Methode an Organextrakten getestet hatten, fanden neben der „Knochenbande“ eine weitere Fraktion beim Heranwachsenden, die ebenfalls dem Knochen entstammen sollte. *Walker & Pollard* (17) beobachteten dasselbe Phänomen bei der Ostitis deformans *Paget*. *Sussman* (30) entdeckte bei diesem Leiden immunologisch eine Erhöhung der Leberphosphatase, die diselektrophoretisch aber nicht der „*Pagetbande*“ entspricht. Auch die Denaturierung mittels Hitze oder Harnstoff ließ nach den Abbildungen von *Johnson et al* (19) für „Leber- und Knochenbande“ des Serums praktisch gleiche Einwirkung erkennen. Diese Unsicherheit, von *Walker & Pollard* (17) auf eine hypothetische Änderung der Enzymstruktur bei verschiedenen Extraktionsmethoden zurückgeführt, hat verschiedene Hypothesen über die Herkunft der Serumaktivität entstehen lassen: Leber und Knochen (1, 20), Leber und gelegentlich Intestinum (17), Leber und manchmal zusätzlich Knochen und Dünndarm (8), Leber und postprandial Intestinum (13), stets Leber, Knochen und Dünndarm gleichzeitig (14), ausschließlich Knochen beim Kind (14) oder nur Leber nach Konversion aller anderen Isoenzyme in diesem Organ (31).

Auch andere Medien, wie Celluloseacetat (1, 2), Stärke (8, 15) und Agar (32) führen bei teilweise hervorragenden Trennungen (15, 32) nicht zur Korrespondenz von Organ- (8) und Serummuster (15), so daß *Winkelman et al* (21) den klinischen Wert aller Differenzierungsverfahren (Elektrophorese, Inhibition und Denaturierung) für die Serumaktivität ablehnen.

In Zusammenfassung unserer Befunde und der experimentellen Daten der Literatur halten wir das Serumenzym für eine eigenständige Phosphatase, die in einer oder mehreren Eigenschaften von jeder Organaktivität abweicht. Möglicherweise repräsentiert die schwache langsame Bande ihre noch nicht mit Neuraminsäure gekoppelte Vorstufe.

Literatur

1. Fritsche jr., H. A. & Adams-Park, H. R. (1972), *Clin. Chem.* 18, 417-421.
2. Rhone, D. P. & Mizuno, F. M. (1972), *Clin. Chem.* 18, 662-666.
3. Rawstron, J. R. & Ng, S. H. (1971), *Clin. Chim. Acta* 32, 303-304.
4. Dymling, J. F. (1966), *Scand. J. Clin. Lab. Invest* 18, 129-133.
5. Demetriou, J. A. & Beattie, J. M. (1971), *Clin. Chem.* 17, 290-295.
6. Moss, D. W. & King, E. J. (1962), *Biochem. J.* 84, 192-195.
7. Boyer, S. H. (1963), *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 103, 938-950.
8. Hodson, A. W., Latner, A. L. & Raine, L. (1961), *Clin. Chim. Acta* 7, 255-261.
9. Fishman, W. H., Inglis, N. R. & Ghosh, N. K. (1968), *Clin. Chim. Acta* 19, 71-79.
10. Warnock, M. L. & Reisman, R. (1969), *Clin. Chim. Acta* 24, 5-11.
11. Caputo, M. J. & Taft, D. M. (1971), *Amer. J. Clin. Pathol.* 56, 220-224.
12. Aminoff, D., Austrins, M. & Zolfaghari, S. P. (1971), *Biochim. Biophys. Acta* 242, 108-122.
13. Gerlach, U., Hiby, W. & Paul, L. (1970), *Med. Welt* 21, 1252-1258.
14. Green, S., Cantor, F., Inglis, N. R. & Fishman, W. H. (1972), *Amer. J. Clin. Pathol.* 57, 52-64.
15. Skillen, A. W., Fifield, R. D. & Sheridah, G. S. (1972), *Clin. Chim. Acta* 40, 21-26.
16. Smith, I., Lightstone, P. J. & Perry, J. D. (1968), *Clin. Chim. Acta* 19, 499-505.
17. Walker, A. W. & Pollard, A. C. (1971), *Clin. Chim. Acta* 34, 19-29.
18. Hoffmann, V. & Hosenfeld, D. (1971), *Med. Welt* 22, 749-752.
19. Johnson jr., R. B., Ellingboe, K. & Gibbs, Ph. (1972), *Clin. Chem.* 18, 110-115.
20. Dingjan, P. G., Postma, T. & Stroes, J. A. P. (1973), *diese Z.* 11, 167-171.
21. Winkelman, J., Nadler, S., Demetriou, J. & Pileggi, V. J. (1972), *Amer. J. Clin. Pathol.* 57, 625-634.
22. Statland, B. E., Nishi, H. H. & Young, D. S. (1972), *Clin. Chem.* 18, 1468-1474.
23. Marks, P. A. (1968), in *Methods of Enzymology* (Colowick, S. P. & Kaplan, N. O., Hrsg.), 2. Aufl., Bd. 9, 131-137, Verlag Academic Press, New York & London.
24. Maurer, H. R. (1968), *Disk-Elektrophorese*, S. 27, Verlag Walter de Gruyter & Co., Berlin.
25. Butterworth, P. J. & Moss, D. W. (1966), *Nature (London)* 209, 805-806.
26. Moss, D. W., Eaton, R. H., Smith, J. K. & Whitby, L. G. (1966), *Biochem. J.* 98, 32c-33c.
27. Epstein, E., Wolf, P. L., Horwitz, J. P. & Zak, B. (1967), *Clin. Chem.* 13, 694.
28. Walker, A. W. & Pollard, A. C. (1969), *Clin. Chim. Acta* 23, 370-373.
29. Canalco Diagnostic Products Group (1970), QDA specific kit instructions for quick disc electrophoresis of alkaline phosphatase isozymes; Rockville, USA.
30. Sussman, H. H. (1970), *Clin. Chim. Acta* 27, 121-124.
31. Fishman, W. H. & Ghosh, N. K. (1967), in *Advances in Clinical Chemistry*, (Bodansky, O. & Stewart, C. P., Hrsg.), Bd. 10, 255-370, Verlag Academic Press, New York & London.
32. Sundblad, L., Wallin-Nilsson, M. & Brohult, J. (1973), *Clin. Chim. Acta* 45, 219-223.

Prof. Dr. Klaus Lorentz
I. Medizinische Klinik der
Medizinischen Hochschule Lübeck
2400 Lübeck
Kronsfordter Allee 71/73