

# Isoenzyme der Fructose-Phosphat-Aldolase bei Patienten mit progressiver Muskeldystrophie

*Isoenzyme der Fructose-Phosphat-Aldolase, II. Mitteilung<sup>1)</sup>*

Von A. L. DIKOW, I. A. TSCHANKOW und A. CHR. SAMARDSHIEW

*Aus den Biochemischen Abteilungen der Wissenschaftlichen Forschungsinstitute für Onkologie  
(Direktor: Prof. Dr. N. Antschew) und für Neurologie und Psychiatrie (Direktor: Prof. Dr. G. Ganew) Sofia, Bulgarien*

(Eingegangen am 26. Januar 1968)

In der vorliegenden Mitteilung wird über Isoenzyme der Aldolase<sup>2)</sup> im Serum und in den Muskeln von an Dystrophia musculorum progressiva erkrankten Menschen berichtet. Der Nachweis erfolgt mittels Elektrophorese auf Agarosegel und darauf folgende Inkubation mit Substrat enzymatisch. Nach der quantitativen Auswertung der einzelnen Isoenzymfraktionen der ALD im Serum werden im Vergleich zu der Norm Veränderungen festgestellt, die eine wesentliche Vermehrung der Fraktionen I, II, III und IV bei allen Kranken wie auch das Auftreten von 1—2 neuen Fraktionen bei einigen Kranken zeigen.

Im Isoenzymprofil der ALD von Muskeln der Kranken wurden auch wesentliche Unterschiede im Vergleich zu normalen Muskeln entdeckt: die beiden sonst am Kathodenende liegenden Fraktionen fehlen, die übrigen 5 sind stark vermindert. Außerdem wurde eine neue abnorme ziemlich intensive Fraktion entdeckt, die auf breitem Grund am Anoden-Ende der Enzymogramme liegt. Es wurde versucht, die festgestellten Veränderungen des Isoenzymprofils der ALD im Serum und in den Muskeln der an DMP Erkrankten zu erklären.

## *The isoenzymes of fructose phosphate aldolase in patients with progressive muscle dystrophy*

The isoenzymes of aldolase were studied in the serum and muscles of humans suffering from Dystrophia musculorum progressiva. The isoenzymes were separated by electrophoresis on agarose gel and determined enzymically by incubation with substrate. The amount of each serum ALD-isoenzyme fraction was determined and compared with the normal value: all patients showed an increase in fractions I, II, III and IV and some also contained 1—2 new fractions.

The pattern of muscle ALD-isoenzymes also showed essential deviations from normal: the two cathodic fractions were missing, and the remaining 5 were markedly decreased. In addition, a new and abnormally intense fraction was discovered, which formed a wide band at the anode end of the electrophoresis separation. An explanation is attempted for these observed differences in muscle dystrophy.

Im Jahre 1949 stellten SIBLEY und LEHNINGER (1) eine Erhöhung der Gesamtaktivität der ALD im Serum von an DMP<sup>2)</sup> Erkrankten fest. Die späteren Forschungen einer Reihe von Autoren (2—8) bestätigten diese Tatsache aufgrund zahlreicher klinischer Studien. Zusammen mit anderen Forschungsergebnissen spielen die beobachteten Veränderungen in der Gesamtaktivität der ALD eine wesentliche Rolle für die Diagnostik der DMP. Die bei experimenteller Myopathie durchgeführten Untersuchungen bei Mäusen (9) und bei Verwandten von an DMP erkrankten Menschen (10) zeigen dieselben Ergebnisse. Gleichzeitig mit der erhöhten Aktivität der ALD im Serum weisen einige Autoren (11) eine Verminderung der Aktivität dieses Enzyms im myopathischen Muskelgewebe nach. Das ließ die Autoren vermuten, daß es sich um einen Übertritt der Muskel-ALD in das Serum handelt. Außerdem wird aufgrund von Untersuchungen über die Substratspezifität der Muskel-ALD bei DMP angenommen, daß der fötale Typ der Synthese des Enzyms erhalten bleibt (12). Die chromatographischen Untersuchungen der Muskel-ALD (13—15) zeigen, daß sie heterogen ist, obwohl sie immunchemisch und ihren katalytischen Eigenschaften nach homogen ist. Bei unseren Forschungen über das Isoenzymprofil der ALD in Serum und Gewebe von Gesunden und an verschiedenen Krankheiten leidenden

Menschen haben wir die Isoenzyme der ALD im Serum und in den Muskeln bei an DMP Erkrankten untersucht.

## Material und Methoden

s. vorangegangene Mitteilung.

### *Untersuchungsgut*

#### Seren

Es wurden 20 Kinder (19 Jungen und ein Mädchen) mit DMP im Alter von 4—17 Jahren, sowie 6 Verwandte der Kranken, und zwar drei Mütter, ein Vater und zwei Brüder, untersucht. Bei allen Kranken wurde die infantile Form (Beckengürtelform, aufsteigende Form) der DMP nach der Klassifikation von BECKER diagnostiziert, und zwar 10 von der rezessiven und 10 von der rezessiven geschlechtsgebundenen Form.

#### Muskeln

Von 5 der kranken Kinder wurde Muskelgewebe durch Biopsie des M. quadriceps femoris und bei der Kontrollgruppe Muskeln intra operationem bei verschiedenen Fällen entnommen.

## Ergebnisse und Diskussion

Im Isoenzymprofil der ALD im Serum wurden 4 Grundfraktionen gefunden, die ihrer Stellung nach denjenigen bei gesunden Menschen entsprechen (18). Bei 7 der Kranken wurden 1—2 zusätzliche Fraktionen beobachtet, die zwischen den Fraktionen III und IV lagen. Außerdem war bei einem Kranken Fraktion II in zwei Unterfraktionen unterteilt (Abb. 1).

Die Gesamtaktivität der ALD beträgt 4,2 bis 145,28 mU/ml mit einem Mittelwert von 32,4 und einer Standardabweichung von 30 mU/ml. Die quantitativen

<sup>1)</sup> I. Mitteilung siehe diese Z. 6, 386 (1968) vorstehend.

<sup>2)</sup> *Abkürzungen und Enzyme* s. a. vorstehende Mitteilung. DMP = Dystrophia musculorum progressiva.

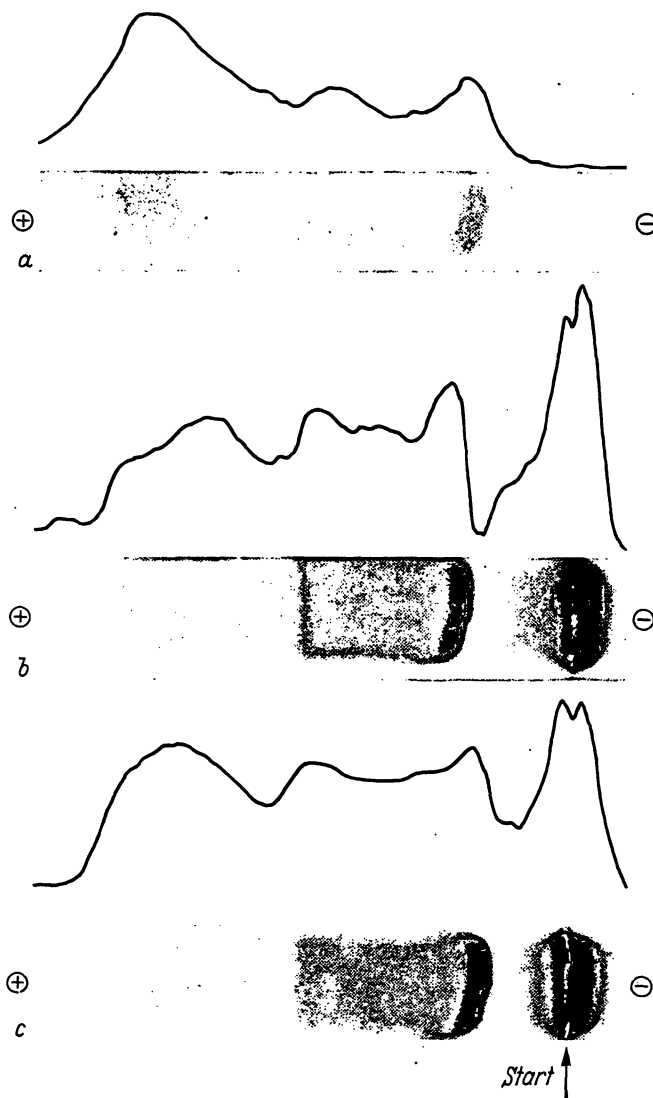


Abb. 1

Isoenzymfraktionen der ALD im Serum mit den entsprechenden densitometrischen Kurven von einem gesunden Menschen (a) und von an DMP Erkrankten (b, c). S. a. vorstehende Mitteilung

Werte der einzelnen Isoenzymfraktionen sind auf Tabelle 1 zu sehen.

Auf der Tabelle sind vergleichshalber auch die Mittelwerte der einzelnen Isoenzymfraktionen bei Gesunden gezeigt, die in der vorstehenden Mitteilung (18) veröffentlicht wurden. Es wurde eine wesentliche relative Verminderung der Fraktion I und eine wesentliche relative Vermehrung der Fraktion IV festgestellt. Die quantitativen Veränderungen der Fraktionen II und III sind gering (II — leicht vermindert, III — leicht vermehrt). Die Verminderung der Fraktionen I und II ist aber scheinbar. Wenn die Quantität der Fraktionen

Tab. 1

Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichung (s) der einzelnen Isoenzymfraktionen der ALD in Seren von Gesunden (A) und von an DMP Erkrankten (B) in relativen und absoluten Werten.

	Isoenzymfraktionen der ALD im Serum				Absolute Werte (mU/ml)				
	Relative Werte (%)				I	II	III	IV	
A	$\bar{x}$	44,5	26,4	20,3	8,90	1,5	0,9	0,7	0,3
	s	8,7	6,5	6,4	4,3	0,3	0,2	0,2	0,1
B	$\bar{x}$	26,8	23,8	21,3	27,9	7,5	8,0	7,0	9,6
	s	8,5	5,0	4,0	6,7	4,8	8,2	7,2	11,1

durch absolute Werte ausgedrückt wird, stellt man eine Vermehrung aller Fraktionen fest, und zwar betont bei Fraktion II und IV. Gleichzeitig mit den quantitativen Veränderungen in der Gesamt-Enzymaktivität stellen sich auch wesentliche qualitative Veränderungen ein, was am Auftreten neuer Fraktionen zu erkennen ist. Hier erhebt sich die Frage, ob diese Fraktionen nur unter pathologischen Bedingungen entstehen, oder ob sie auch unter physiologischen Bedingungen vorhanden sind, ihre Konzentration jedoch so gering ist, daß man sie nicht ablesen kann. Versuche, eine Korrelation zwischen den festgestellten quantitativen und qualitativen Veränderungen im Isoenzymprofil der ALD sowie klinischen Kennzeichen (klinische Form, Anfang, Dauern und Heftigkeit der Krankheit) zu finden, haben uns zu keinen bestimmten Schlüssen geführt. Man muß aber berücksichtigen, daß die von uns untersuchten Kranken Kinder sind und daß ihre Zahl verhältnismäßig klein ist. Die zwei von uns untersuchten 24 bzw. 50 Jahre alten an DMP Erkrankten zeigten eine normale Gesamtaktivität der ALD mit einer gewissen Vermehrung der Fraktion IV.

Die 6 untersuchten Verwandten der Kranken zeigten folgende Veränderungen: Bei einer der untersuchten Mütter von kranken Kindern wurde eine Erhöhung der Gesamtaktivität der ALD und quantitative Veränderungen in den Isoenzymfraktionen festgestellt; beim Vater von einem der kranken Kinder wurden keine Veränderungen beobachtet; bei einem Bruder eines kranken Kindes wurden Veränderungen sowohl in der Gesamtaktivität der ALD als auch im Isoenzymprofil, jedoch ohne klinische Krankheitssymptome festgestellt; der untersuchte Bruder eines anderen Kindes zeigte keine pathologischen Abweichungen der ALD. Diese Angaben weisen darauf hin, daß bei einigen Verwandten neben der erhöhten Gesamtaktivität der ALD auch Veränderungen in ihrem Isoenzymprofil vorhanden sind.

Die bis jetzt durchgeführten elektrophoretischen Trennungen und das mit verschiedenen Methoden festgestellte Vorkommen der ALD in Muskeln von Menschen, Ratten und Kaninchen zeigen nur eine Isoenzymfraktion (19—23). Bei unseren Forschungen über die Isoenzyme der ALD von Muskeln von gesunden Menschen wurden 7 Fraktionen erhalten, von denen 3 an der Kathoden-Seite der Enzymogramme, eine an der Startlinie und die übrigen 3 an der Anoden-Seite liegen. Die kathodischen Fraktionen gehen wegen ihrer größeren Intensität und geringen Trennung ineinander über. Zwischen den Isoenzymfraktionen der ALD von verschiedenen Muskeln vom Rumpf und von den Extremitäten (roter, weißer und gemischter Typ) ist kein Unterschied zu verzeichnen (Abb. 2).

Bei den Muskeln von an DMP Erkrankten zeigt das Isoenzymprofil der ALD einen wesentlichen Unterschied im Vergleich zu dem normalen Muskel. Die beiden Fraktionen, die sonst am Kathoden-Ende liegen, fehlen hier; die übrigen sind vorhanden, jedoch mit wesentlich schwächerer Intensität. Diese Verminderung der ALD Isoenzymfraktionen im Muskel führt wahrscheinlich

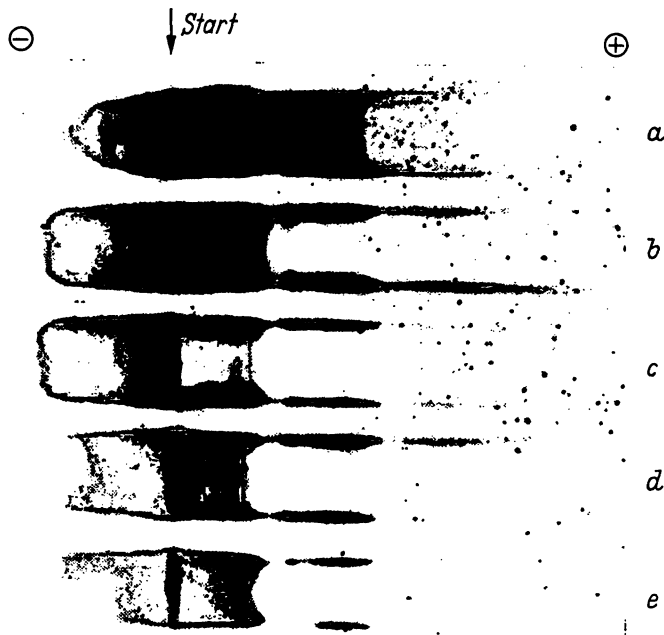


Abb. 2

Isoenzymfraktionen der ALD in verschiedenen normalen Muskeln von Menschen. a) Herzmuskel, b) Musculus pectoralis major, c) Musculus rectus abdominis (roter Typ), d) Musculus deltoideus brachialis (weißer Typ), e) Musculus quadriceps femoris (gemischter Typ)

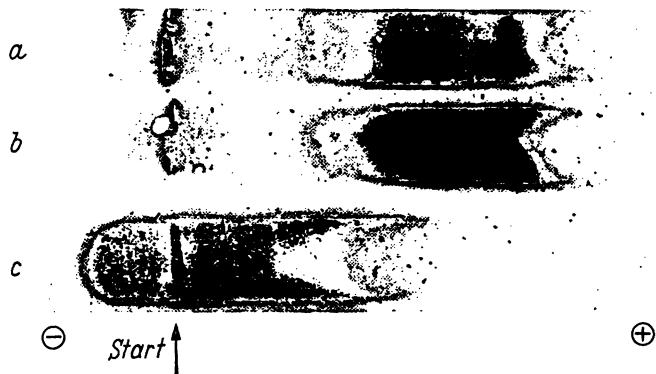


Abb. 3

Isoenzymfraktionen der ALD im Musculus quadriceps femoris von an DMP Erkrankten (a, b) und von einem gesunden Menschen (c)

zur Vermehrung der Fraktionen II und IV im Serum. Diese Tatsache unterstützt die Annahme, daß die Muskelaldolase bei DMP ins Serum übertritt. Die immunochemischen Forschungen von GLOBIG und Mitarbeitern (24) sprechen auch für diese Annahme. Außer dem Fehlen und der Verminderung der Fraktionen, die in normalen Muskeln vorhanden sind, beobachten wir im Isoenzymmuster der ALD bei Muskeln von an DMP Erkrankten eine neue diffuse Isoenzymfraktion mit hoher Intensität, die am Anoden-Ende der Enzymogramme liegt (Abb. 3).

Das Vorhandensein dieser neuen Fraktion erklärt die Vermehrung der Fraktionen I und II im Serum bei DMP. Das Auftreten einer neuen Fraktion in den Enzymogrammen der Muskelaldolase weist auf einen abnormen Typ der Synthese dieses Enzyms im Muskel bei DMP hin. Bei allen untersuchten kranken Kindern war die Funktion der Leber normal, was uns annehmen läßt, daß die Leberaldolase keine Wirkung auf die von uns beobachteten Veränderungen hat.

Zuletzt können wir folgende Schlüsse ziehen: Die Isoenzymmuster der ALD von Blutserum und Muskeln bei an DMP Erkrankten, die wir mit der oben beschriebenen Methode erhalten haben, zeigen, daß es sich um quantitative wie auch um qualitative Veränderungen des Enzyms bei dieser Krankheit handelt. Die von uns festgestellten Veränderungen bestätigen die vorhandenen Hypothesen, daß es sich sowohl um einen Übertritt der Muskelaldolase in das Serum als auch um einen abnormen Typ der Synthese des Enzyms handelt.

Inwieweit diese Veränderungen des Isoenzym der ALD ursprünglich und spezifisch nur für DMP (oder für einige ihrer Formen) sind oder ob sie nur ein Teil des pathogenetischen Mechanismus des myodystrophischen Prozesses der Muskelerkrankungen sind, können wir aufgrund unserer Beobachtungen noch nicht sagen.

### Literatur

- SIBLEY, J. A. und A. L. LEHNINGER, J. biol. Chemistry 177, 859 (1949).
- BRUNS, F., Biochem. Z. 325, 156 (1954).
- HEYCK, H., G. LAUDAHN und P. CARSTEN, Klin. Wschr. 44, 695 (1966).
- ROTHAUWE, H.-W., Klin. Wschr. 43, 144 (1965).
- JONESCHFSKU, W., Sovet. nevropat. (Moskau) 64, 824 (1964).
- PERMANYER, J. J., Med. Clin. Barc. 43, 19 (1964).
- SCHAPIRA, G., Enzymologia, 29, 283 (1965).
- POPELNIZKAJA, I. W., Sovet. nevropat. (Moskau) 65, 1158 (1965).
- STRIVASTAVA, V. und L. BERLINGUET, Canad. J. Biochem. Physiol. 42, 1301 (1964).
- GRINIO, L. P., Vopr. med. chimii (Moskau) 12, 600 (1966).
- SCHAPIRA, G., J. C. DREYFUS, F. SCHAPIRA und J. KRUIH, Amer. J. phys. Med. 34, 313 (1955).
- SCHAPIRA, F., J. C. DREYFUŠ und G. SCHAPIRA, Enzymol. biol. clin. 7, 98 (1966).
- BLOSTEIN, R. H. und W. J. RUTTER, J. biol. Chemistry, 238, 3280 (1963).
- WESTHEAD, E. W. und P. D. BOYER, Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 54, 145 (1961).
- IDEÓ, G. und A. CAO, Boll. Soc. ital. biol. sper. 42, 693 (1966).
- Aldolase „UV Test“ C. F. Boehringer Mannheim. 2. Aufl. (1966).
- DITTMER, A., Plasmaeiweiß und Elektrophorese. S. 122, 3. Aufl., VEB Gustav Fischer, Jena (1965).
- DIKOW, A. L. und I. A. TSCHANKOW, diese Z. 6, 386 (1968), vorstehend.
- CHRISTEN, PH., U. RENSING, A. SCHMID und F. LEUTHARDT, Helv. Chim. Acta 49, 222 (1966).
- ANSTALL, H., C. LAPP und J. TRUJILLO, Science (Washington) 154, 657 (1966).
- PENHOET, E., T. RAJKUMAR und W. J. RUTTER, Proc. nat. Acad. Sci. USA 56, 1275 (1966).
- PIETRUSZKO, R. und D. N. BARRON, Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 132, 203 (1967).
- RENSING, U., A. SCHMID und F. LEUTHARDT, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348, 921 (1967).
- GLOBIG, W., D. MATZELT, G. SCHWICK und K. STÖRIKO, Clin. chim. Acta (Amsterdam) 12, 447 (1965).

Dr. A. L. Dikow  
Sofia/Bulgarien  
Bul. Christo Botew 14