

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
7. Jg., S. 155—157, März 1969

Isoenzymfraktionen der Fructose-Phosphat-Aldolase in den Blutzellen gesunder Menschen

Isoenzyme der Fructose-Phosphat-Aldolase, IV. Mitteilung¹⁾

Von A. L. DIKOW und V. G. GENOWA

Aus den Biochemischen Abteilungen der Wissenschaftlichen Forschungsinstitute für Onkologie (Direktor: Prof. N. Antschew) und für Hämatologie und Bluttransfusion (Direktor: Prof. V. Serafimow), Sofia, Bulgarien

(Eingegangen am 30. Oktober 1968)

In vorliegender Arbeit werden die Isoenzymmuster der Blutzellenaldolase an Hand elektrophoretischer Trennung und anschließendem Nachweis der Isoenzymaktivität gegenüber Fructose-1-phosphat und Fructose-1,6-diphosphat untersucht. Die Erythrocyten, die Leukocyten und Thrombocyten besitzen 2—4 intensive Fraktionen vom Typ „A“-Aldolase, die auf und nahe an der Startlinie anodisch liegen und drei weniger intensive Isoenzymfraktionen vom Typ der Aldolase-„C“, die sich auf der anodischen Seite des Isoenzymogramms befinden.

The isoenzyme fractions of fructose phosphate aldolase in the blood cells of normal humans

The pattern of blood cell aldolase was determined by electrophoretic separation, followed by the detection of isoenzyme activity towards fructose-1-phosphate and fructose-1,6-diphosphate. The erythrocytes, leucocytes and thrombocytes possess 2—4 intense fractions of type „A“ aldolase that lie on and near the starting line on the anode side, and three less intensive isoenzyme fractions of type „C“ aldolase that lie on the anodic side of the isoenzymogram.

Die Blutzellen (Erythrocyten, Leukocyten und Thrombocyten) besitzen einen Eigenstoffwechsel und enthalten die vollständige Enzymkette der Glykolyse. Manche Verfasser untersuchten eingehend die einzelnen Enzyme dieser Kette, einschließlich der Aldolase (EC 4.1.2.13). Die Gesamt-Aldolaseaktivität der Erythrocyten wurde hauptsächlich von l. c. (1, 2, 3, 4) untersucht, l. c. (5, 6) versuchten, das Enzym auf chromatographischem Wege aufzutrennen. Die Leukocytenaldolase wurde von l. c. (1, 7, 8, 9), die Thrombocytenaldolase von l. c. (1, 10, 11, 12) untersucht. Während manche Isoenzymmuster der Blutzellen bereits erforscht wurden (Lactatdehydrogenase (EC 1.1.1.27), Glucose-6-phosphatdehydrogenase (EC 1.1.1.49), Malatdehydrogenase (EC 1.1.1.37), saure und alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1, 3.1.3.2), Diaphorase (EC 1.6.4.3) usw.), liegen ähnliche Untersuchungen der Aldolase noch nicht vor. Deshalb stellten wir uns die Aufgabe, im Rahmen unserer Untersuchungen über die Isoenzymfraktionen der Aldolase beim Menschen, auch die der Blutzellen bei gesunden Probanden zu erforschen.

Material und Methoden

Bezugsquellen

Nitro-Blau-Tetrazoliumchlorid, Calbiochem, USA; DEAE-Cellulose, Amido-schwarz 10B Fa. Schüchardt, München, Fructose-1-phosphat-Na₂salz, Fa. Boehringer, Mannheim. Die übrigen Bezugsquellen waren dieselben, wie in l. c. (13).

Versuchsmaterial

Von 10 gesunden Spendern wurden unter Anwendung der Silikonteknik je 250 ml Blut mit einem Stabilisator (3,8proz. Lösung

von Natrium citricum) entnommen. Die Thrombocyten wurden nach l. c. (14), die Leukocyten nach l. c. (15) separiert und durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen zerstört. Wir zentrifugierten 20 Min. bei 20000 g. Der klare Überstand wurde zur weiteren Untersuchung benützt. Die Erythrocytenmasse wurde in NaCl-Lösung suspendiert und zentrifugiert, was 8mal wiederholt wurde. Die gewaschenen Erythrocyten wurden im 10fachen Volumen 1 mM Trispuffer pH 7 hämolysiert und 30 Min. bei 20000 g zentrifugiert. Zur Entfernung des Hämoglobins wurden die Nichthämoglobin-Eiweiße des Hämolysats an DEAE-Cellulose adsorbiert. Diese wurde mit 1 mM Trispuffer pH 7 bis zur Entfernung des Hämoglobins gewaschen. Die auf DEAE-Cellulose adsorbierten Erythrocyteneiweiße wurden mit 0,5M NaCl eluiert und mittels Ultrafiltration konzentriert. Im Untersuchungsgut wurde das Gesamt-Eiweiß durch die Biuretmethode nach SOLS (16) und die Gesamt-Aldolaseaktivität nach KULGANEK und KLASCHKA (17) bestimmt. Danach wurden die Zellproteine der Elektrophorese unterzogen, um die Isoenzyme der Aldolase zu trennen. Die Elektrophorese wurde in 0,6proz. Agarosegel in Plexiglas-trögen (180/130/4 mm) durchgeführt, wobei Filterpapierstreifen als Kontakt zwischen Gel und Puffer in den Küvetten dienten. Der Puffer bestand aus Tris/H₃BO₃/EDTA nach ARONSON und GRÖNWALL (18). Die Trennung dauerte 18 Stdn. bei 160 V und 35 mA und 2°. Die Lokalisierung der Aldolaseaktivität wurde nach demselben Verfahren, wie in l. c. (13) durchgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse über die Gesamtaktivität der Blutzellenaldolase sind in Tabelle 1 dargestellt.

Hieraus ist zu ersehen, daß die Leukocyten die größte Gesamtdolaseaktivität besitzen. Gegenüber LÖHR

Tab. 1

Spezifische Gesamt-Aldolaseaktivität der Blutzellen (U/mg Zellprotein, 37°). Substrat: Fructose-1,6-diphosphat. \bar{x} = Mittelwert; s = Standardabweichung

	Erythrocyten	Leukocyten	Thrombocyten
\bar{x}	0,57	1,60	0,27
s	± 0,17	± 0,29	± 0,073

¹⁾ III. Mitteilung siehe DIKOW, A. und M. ROMANOW, Zschr. inn. Med. Leipzig 23, 471 (1968).

und Mitarbeitern (10) finden wir in den Erythrocyten eine höhere Aldolaseaktivität als in den Thrombocyten. Dies ist darauf zurückzuführen, daß diese Verfasser die Aldolaseaktivität in vollständigem Hämolytat bestimmen und auf Gramm Hämoglobin beziehen. Wir dagegen bestimmen die Aldolaseaktivität nach Entfernung des Hämoglobins und beziehen sie auf Milligramm Nichthämoglobin-Erythrocyteneiweiß.

Bei der Untersuchung des Isoenzymmusters der Aldolase in den Blutzellen benützten wir als Substrat nicht nur das Fructose-1,6-diphosphat (Nachweis der Fructosediphosphat-Aldolase (EC 4.1.2.13)), sondern auch das Fructose-1-phosphat (Nachweis der Ketose-1-phosphat-Aldolase (EC 4.1.2.7)). Auf Grund des von uns vorgeschlagenen Verfahrens (13) ist die Anwendung von Fructose-1-phosphat als Substrat deshalb möglich, da das freigesetzte Glycerinaldehyd mit der der Inkubationlösung in hoher Konzentration zugefügten Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase in Reaktion treten kann (19).

Bei Anwendung des *Fructose-1,6-diphosphats* als Substrat erhielten wir folgende Isoenzymmuster der Blutzellen (Abb. 1). Bei den Erythrocyten (Abb. 1a und a') besteht das Isoenzymmuster aus 2—3 Fraktionen, die nahe bei der Startlinie an der anodischen Seite liegen. Sie sind vom Typ der Muskel-, „A“-Aldolase und entsprechen ihrer Beweglichkeit nach den α_1 und α_2 Eiweißfraktionen der Erythrocyten, wie in einer früheren Arbeit beschrieben (20, 21). Außerdem

werden noch 3 Isoenzymfraktionen gefunden, die noch näher an der anodischen Seite liegen. Die letzte von ihnen ist ziemlich intensiv. Sie entsprechen den „c“- , „d“- und „e“-Eiweißfraktionen der Erythrocyten (20, 21) und sind vom Typ der Gehirn-, „C“-Aldolase.

Im Isoenzymmuster der Leukocyten (Abb. 1b und b') finden wir eine Isoenzymfraktion an der Startlinie und nahe bei ihr, an anodischer Seite, noch drei Fraktionen. Dieser vier Isoenzymfraktionen sind vom Typ der Muskel-, „A“-Aldolase, dabei sehr intensiv und wegen ihrer nahen Lage laufen sie fast ineinander. Anodisch von ihnen liegen noch 2—3 Fraktionen mit sehr schwacher Intensität vom Typ der Gehirn-, „C“-Aldolase.

Das Isoenzymmuster der Thrombocytenaldolase (Abb. 1c und c') besitzt ebenfalls eine sehr intensive Fraktion, die an der Startlinie liegt und drei anodisch von ihr liegende Fraktionen vom Typ der „A“-Aldolase. Gegenüber den Leukocytenenzymfraktionen sind diese besser voneinander getrennt. Anodisch gelegen, finden wir noch drei Isoenzymfraktionen mit schwacher Intensität vom Typ der Aldolase-, „C“.

Auf Abbildung 2 sind die Isoenzymmuster der Blutzellenaldolase unter Anwendung von *Fructose-1-phosphat* als Substrat veranschaulicht. Im Isoenzymmuster der Erythrocyten (Abb. 2a), der Leukocyten (Abb. 2b) und der Thrombocyten (Abb. 2c) erschienen nur die Isoenzymfraktionen der Aldolase-, „C“. Dies stimmt mit den Untersuchungen einiger Verfasser (22) überein, daß die Gehirn-, „C“-Aldolase hinsichtlich ihrer Spezifität gegenüber den Fructosephosphaten eine Mittelstellung zwischen den Typen „A“- und „B“-Aldolase einnimmt. Die Isoenzymfraktionen der Aldolase, die sich nahe und auf der Startlinie an der anodischen Seite befinden, traten nicht auf, da sie vom Typ der Aldolase-, „A“ sind, die eine sehr niedrige Aktivität gegenüber Fructose-1-phosphat aufweist.

Wegen ihrer niedrigen Aktivität gegenüber Fructose-1-phosphat wird die Erythrocytenaldolase von einigen Verfassern als reiner Typ „A“ bezeichnet (23). Die

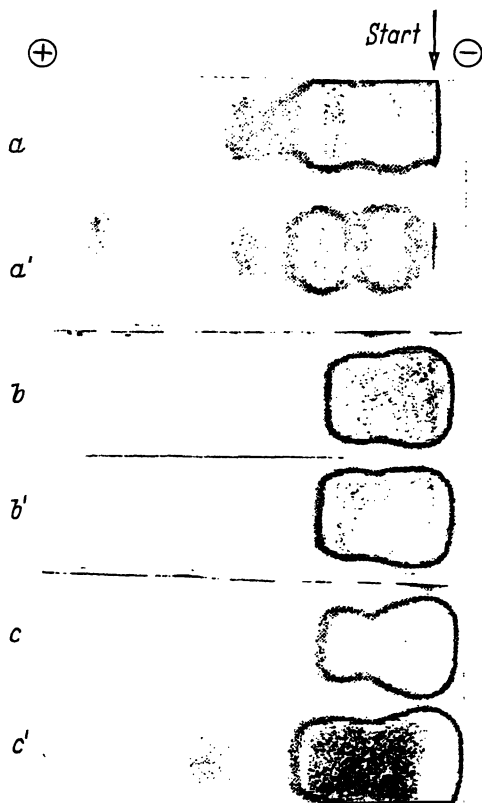


Abb. 1
Isoenzymfraktionen der Blutzellenaldolase gesunder Menschen.
Substrat Fructose-1,6-diphosphat
a und a' in Erythrocyten; b und b' in Leukocyten; c und c' in Thrombocyten

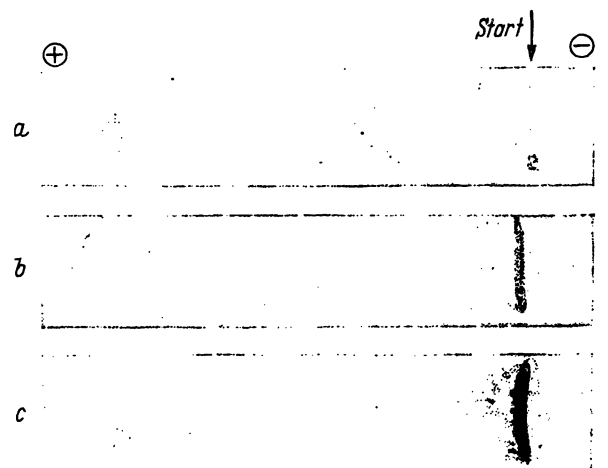


Abb. 2
Isoenzymfraktionen der Blutzellenaldolase gesunder Menschen.
Substrat Fructose-1-phosphat
a in Erythrocyten; b bei Leukocyten; c bei Thrombocyten

Anwendung beider Substrate zum Nachweis von Isoenzymfraktionen ließ uns feststellen, daß die Blutzellen auch Isoenzymfraktionen vom Typ Aldolase „C“ besitzen. Demnach können die Isoenzymfraktionen der Aldolase nicht nur nach der elektrophoretischen

Beweglichkeit bestimmt werden, sondern auch nach ihrer Substratspezifität. Daraus kann man schließen, zu welchem Aldolasetyp sie gehören.

Wir danken der Fa. Boehringer Mannheim für die freundliche Überlassung von Fructose-1-Phosphat.

Literatur

1. LÖHR, G. W. und H. D. WALLER, *Klin. Wschr.* 37, 833 (1959).
- 2. BRUNS, F., *Biochem. Z.* 325, 429 (1954).
- 3. LÖHR, G. W. und H. D. WALLER, *Dtsch. med. Wschr.*, 86, 27 (1961).
- 4. ALTMANN, K. I., *Amer. J. Med.*, 27, 936 (1959).
- 5. FORNANI, G., *Giorn. biochem.* 13, 420 (1964).
- 6. TEMKINE, H., *Bull. Soc. chim. biol., Paris* 48, 771 (1966).
- 7. LÖHR, G. W. und H. D. WALLER, *Dtsch. med. Wschr.* 89, 171 (1964).
- 8. BECK, W. S., *J. biol. Chemistry* 216, 33 (1955).
- 9. VETTER, K., *Fol. haemat., N. F.* 6, 80 (1961).
- 10. LÖHR, G. W., H. D. WALLER und R. GROSS, *Dtsch. med. Wschr.* 86, 897 (1961).
- 11. SCETTINI, F., M. B. CANANI und F. DI FRANCESCO, *Boll. Soc. ital. biol. sper.* 37, 1015 (1961).
- 12. DASTUGUE, G., P. BASTIDE und P. M. PLAT, *Nouv. Rev. Franc. Hémat.* 6, 265 (1966).
- 13. DIKOW, A. L. *diese Z.* 6, 386 (1968).
- 14. DUCKERT, F., P. FLÜCKIGER, H. ISENSCHMID, M. MATTER, J. VOGEL-MENG und F. KOLLER, *Acta haemat.* 12, 197 (1954).
- 15. WILMANN, W., *diese Z.* 5, 233, (1967).
- 16. SOLS, A. *Nature London* 160, 89, (1947).
- 17. KULGANEK, W. und W. KLASCHKA, *Vopr. med. chimii (UdSSR)* 7, 434 (1961).
- 18. ARONSON, T. und A. GRÖNWALL, *Scand. J. Clin. Invest.* 9, 338 (1957).
- 19. HARTING, J. und S. F. VELICK, *J. biol. Chemistry* 207, 857 (1954).
- 20. TODOROW, J. und A. L. DIKOW, *Protides of the Biol. Fluid, Proc. 10th Colloq. Brugges 1962* (ed. H. Peeters) Elsevier, Amsterdam (1963).
- 21. TODOROW, J. und A. L. DIKOW, *Protides of the Biolog. Fluides, Proc. 11th Colloq. Brugges 1963* (ed. H. Peeters) Elsevier Amsterdam (1964).
- 22. PENHOET, E., T. RAJKUMAR und W. J. RUTTER, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 56, 1275 (1966).
- 23. POKROWSKII, A. A. und I. I. MUSSIN, *Biochimia (UdSSR)* 31, 1197 (1966).

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