

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
10. Jg. 1972, S. 535—538

Isoenzyme der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase in menschlichen Erythrocyten

Von M. M. MÜLLER, H. DOBROVITS und H. STEMBERGER

*Medizinisch-Chemisches Institut (Vorstand: Prof. Dr. F. Seelich) und
Hygiene-Institut (Vorstand: Prof. Dr. H. Flamm) der Universität Wien*

(Eingegangen am 7. Juni / 8. August 1972)

Es konnte gezeigt werden, daß Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase des menschlichen Erythrocyten 4 Isoenzyme besitzt. Diese Isoenzyme, die sich durch ihre elektrophoretischen Eigenschaften auf Polyacrylamidgel unterscheiden, zeigen immunologisch im Doppeldiffusionstest komplette Identität. Als Ursache für die Existenz dieser Isoenzyme wird eine posttranskriptionale Konformationsänderung angenommen.

Isoenzymes of human erythrocyte hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase

The existence of four isoenzymes of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase in human erythrocytes could be demonstrated. These isoenzymes, differing in their electrophoretic mobilities on polyacrylamide gel, show complete immunological identity in the double diffusion technique. The existence of four isoenzymes might be due to posttranscriptional alteration of the polypeptide conformation.

Die Purinphosphoribosyltransferasen katalysieren die Umwandlung der Purinbasen zu ihren Mononucleotiden unter Beteiligung von 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat (1). Dieser sogenannte „Salvage Pathway“ spielt in der Regulation der de novo Purinsynthese eine große Rolle, da die gebildeten Nucleotide den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt hemmen (2). In Bakterien konnten vier verschiedene Purinphosphoribosyltransferasen für die Basen Adenin, Guanin, Hypoxanthin und Xanthin nachgewiesen werden (3). Beim Menschen gibt es hingegen nur zwei Enzyme: die Adenin-Phosphoribosyltransferase (AMP: Pyrophosphatphosphoribosyltransferase; EC 2.4.2.7), die die Umwandlung von Adenin zu Adenosin-5-phosphat (AMP) katalysiert und die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (IMP: Pyrophosphatphosphoribosyltransferase; EC 2.4.2.8), die Inosin-5-phosphat (IMP), Guanosin-5-phosphat (GMP) und in viel geringerem Maße auch Xanthosin-5-phosphat (XMP) aus den entsprechenden Basen bildet (4).

Bei Kindern mit LESCH-NYHAN-Syndrom wurde ein komplettes Fehlen einer Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Aktivität nachgewiesen (5), bei manchen Patienten mit Gicht findet sich verminderte Aktivität des Enzyms (6). Dadurch werden die Purinbasen vermindert oder gar nicht zu den Nucleotiden aufgebaut, wodurch die Feedback-Hemmung der Glutamin-Phosphoribosylpyrophosphat-Amidotransferase (EC 2.4.2.14), die den ersten Schritt der Purinsynthese katalysiert, ausbleibt, was die gesteigerte Purinsynthese und somit die hohe Hyperuricaemie bei diesen Patienten erklärt (7).

Kürzlich konnte gezeigt werden, daß Erythrocyten-Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase keinen einheitlichen Eiweißkörper darstellt, sondern aus 3 oder 4 Isoenzymen besteht (8, 9, 10). Das Ziel der vorliegen-

den Studie ist es, bei einer aus Erythrocyten gereinigten Enzympräparation mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese die Isoenzyme darzustellen und mit einem spezifischen Enzym-Antiserum immunologisch zu charakterisieren.

Material und Methoden

Enzymreinigung

500 ml Blut eines männlichen Blutspenders mit normaler Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Aktivität der Erythrocyten dienten als Ausgangsmaterial. Die einzelnen Reinigungsschritte wurden bei 4°C vorgenommen. Die Erythrocyten wurden vom Vollblut durch 30 min Zentrifugation bei 13000 g abgetrennt und anschließend 3 bis 4mal mit gleichem Volumen physiol. NaCl-Lösung gewaschen. Durch Tiefrieren bei -30°C und Auftauen bei Raumtemperatur wurden die Erythrocyten hämolytisch.

Die weitere Enzymreinigung entspricht in etwas modifizierter Form der von KRENITSKY (11) angegebenen Methode:

1. Das Hämolyt wurde auf ein pH von 6,0 eingestellt. Es wurde mit gleichem Volumen einer Suspension von CM-Sephadex C-50 der Firma Pharmacia Uppsala (50 g CM-Sephadex C-50 in 1 Liter Tris- (10 mmol/l) Magnesiumsulfat- (2,5 mmol/l) Acetat- (16 mmol/l) Puffer, pH 6,0) versetzt und 20 min unter Eiskühlung gerührt. Anschließend wurde die Suspension 10 min bei 13000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde noch 3 bis 4mal mit CM-Sephadex C-50 Suspension in gleicher Art behandelt, bis er kein Hämoglobin mehr enthielt.

2. Zur Entfernung von Adenin-Phosphoribosyltransferase und hitzelabilen Proteinen wurde der Überstand im Wasserbad auf 73°C erhitzt, 5 min bei 73°C gehalten, gekühlt und das denaturierte Eiweiß abfiltriert. Das Filtrat wurde gefriergetrocknet und in 4 ml 0,02 mol/l Tris-HCl-Puffer (pH 7,7), der 0,2 mmol/l Magnesiumsulfat enthält, aufgenommen.

3. Die Probe (4 ml) wurde auf eine Sephadex G-100 Säule (33 × 2 cm) aufgetragen und mit Tris-HCl-Puffer (pH 7,7; 0,2 mmol/l MgSO₄) eluiert. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 15 ml/h. Fraktionen zu 3 ml wurden gesammelt. Fraktionen mit Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Aktivität wurden gepoolt und mittels Centrifo Membranfilter 224-CF-50 (Amicon Corp., Lexington, Mass., USA) konzentriert.

Hämoglobin wurde nach der Methode von VAN KAMPEN (12) mit Boehringer-Reagenzien, Protein wurde nach der Biuret-Methode bestimmt (13).

Enzymtest

Zur Bestimmung der Enzymaktivitäten verwendeten wir eine von KELLEY (14) angegebene radiochemische Methode in etwas modifizierter Form (15): Die Endkonzentration der Reagenzien bzw. Substrate betrug: 55 mmol/l Tris-HCl-Puffer (pH 7,4), 5 mmol/l $MgCl_2$, 0,8 mmol/l Phosphoribosylpyrophosphat und 0,6 mmol/l ^{14}C -Hypoxanthin (15,0 mCi/mmol; Radiochemical Center Amersham, England). Die Reaktion wurde mit 0,3–0,6 mg Enzymprotein durchgeführt und nach 20 min Inkubation bei 37°C mit 0,6 mol/l $HClO_4$ gestoppt. Das gebildete ^{14}C -IMP wurde papierelektrophoretisch abgetrennt und die Radioaktivität im Liquidscintillationcounter gemessen.

Disk-Elektrophorese

Als Kontrolle der Reinigung und zur Lokalisierung der Enzymaktivität verwendeten wir Säulen von 7,5% Polyacrylamidgel (4 × 50 mm; Firma Serva, Heidelberg, BRD) in der von DAVIS angegebenen Form (16). Enzymlösung entsprechend 0,6 mg Protein wurde in Saccharoselösung (100 g/l) über das Sammelgel geschichtet. Die Trennung erfolgte bei 4°C innerhalb von 3 h bei einer Spannung von 150 Volt (Beckman Spinco Duostat). Als Vergleichssubstanz wurde Bromphenolblau verwendet. Die Gele wurden 20 min mit gesättigter Amidoschwarz-Lösung in 7% Essigsäure gefärbt und mittels 7% Essigsäure entfärbt. Die so dargestellten Eiweißbanden wurden densitometrisch mit einem Vitatron-Densitometer ausgewertet.

Zur Lokalisierung der Enzymaktivitäten und zur Bestimmung der Isoenzyme wurden nicht angefarbte Gele mit Puffer und Substraten 30 min bei 37°C inkubiert. Nach abgelaufener Reaktion in den Gelen wurde jedes Gel in 1 mm dicke Scheibchen geschnitten, jedes Scheibchen auf einen nassen Elektrophoresestreifen aufgelegt und das Reaktionsprodukt ^{14}C -IMP aus dem Gel abgetrennt.

Zur immunologischen Charakterisierung der Isoenzyme wurde wieder ein nicht gefärbtes Gel in 1 mm dicke Scheibchen geschnitten, jedes Scheibchen in 30 μ l physiol. NaCl-Lösung homogenisiert, das Homogenat in die Näpfe der OUCHTERLONY-Platten eingegossen und mit Enzym-Antiserum auf seine antigenen Eigenschaften untersucht.

Herstellung des Enzym-Antiserums

Zur Gewinnung von Enzym-Antisera immunisierten wir 5 männliche Kaninchen mit einem Körpergewicht von etwa 3 kg mit Enzymlösung.

Zur Erstimmunisierung erhielten die Tiere das Enzym in komplettem FREUND'schen Adjuvans in die Pfote injiziert, wobei jedem Tier 1 ml Enzym (10 mg Protein/ml), 1 ml physiol. NaCl-Lösung und 2 ml komplettes FREUND'sches Adjuvans verteilt auf alle vier Pfoten injiziert wurde.

Die zweite Antigengabe erfolgte 1 Woche später subcutan an zwei Stellen unter die Rückenhaut. Jedem Tier wurde wieder Antigen entsprechend einer Eiweißmenge von 10 mg in 4 ml Gesamtvolumen, dieses Mal jedoch mit inkomplettem FREUND'schem Adjuvans, injiziert.

4 Wochen nach Immunisierungsbeginn wurden jedem Tier nochmals 10 mg Antigen in physiol. NaCl-Lösung, jedoch ohne Zusatz von Adjuvantien intravenös verabreicht.

10 Tage darauf erfolgte die Blutabnahme mittels Herzpunktion. Die Sera wurden in kleinen Portionen ohne konservierende Zusätze bei -20°C gelagert.

Agargel-Doppeldiffusionstest

Die Tests erfolgten auf Immuno-Plate (pattern C) der Firma Hyland (Div. Travenol Lab. Inc., Costa Mesa, Calif., USA) (17).

Enzym-Hemmtest mit dem Enzym-Antiserum

Die Hemmung der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase erfolgte durch Zugabe steigender Mengen (20–100 μ l) Antiserums (3,6 mg Protein/ml) zum Enzymtest. Als Kontroll-

wert diente ein auf den Eiweißgehalt des Antiserums eingestelltes normales Kaninchenserum, von dem ebenfalls 20–100 μ l dem Test zugesetzt wurden. Die Reaktion wurde wieder 20 min bei 37°C durchgeführt. Die Substratkonzentrationen und die weiteren Schritte der Enzymaktivitätsbestimmung entsprachen den bereits oben beschriebenen Methoden.

Ergebnisse

Enzymreinigung

Abbildung 1 zeigt, daß Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase nicht als einheitlicher Peak (Enzym-Fraktion) aus der Sephadex G-100 Säule eluiert wird. Der zweite Eiweißgipfel (Begleitproteine) der Elutionskurve entspricht Proteinen ohne nennenswerte Enzymaktivität. Die Enzymaktivität der hämolysierten Erythrocyten betrug 0,083 μ mol/20 min · mg Protein, die der eingeeengten Fraktionen des Enzympeaks 5,88 μ mol/20 min · mg Protein. Das entspricht einer etwa 70-fachen Enzymanreicherung gegenüber dem Hämolysat. Weder im ersten noch im zweiten Eiweißpeak waren nach Einengung im Agargel-Doppeldiffusionstest mit Human-Antiserum Serumproteine nachzuweisen.

Immunologische Untersuchungen

Die Immunisierung der Kaninchen mit den Enzymlösungen führte zum Auftreten von präzipitierenden Antikörpern. Es zeigt sich im Doppeldiffusionstest nach OUCHTERLONY (Abb. 2), daß die Enzym-Fraktion mit Enzym-Antiserum 302 zwei Präzipitationslinien erkennen läßt. Die Begleitproteine hingegen geben in dieser Versuchsanordnung nur eine Präzipitationsbande, die mit der dem Antigen näher gelegenen Linie der Enzym-Fraktion fusioniert.

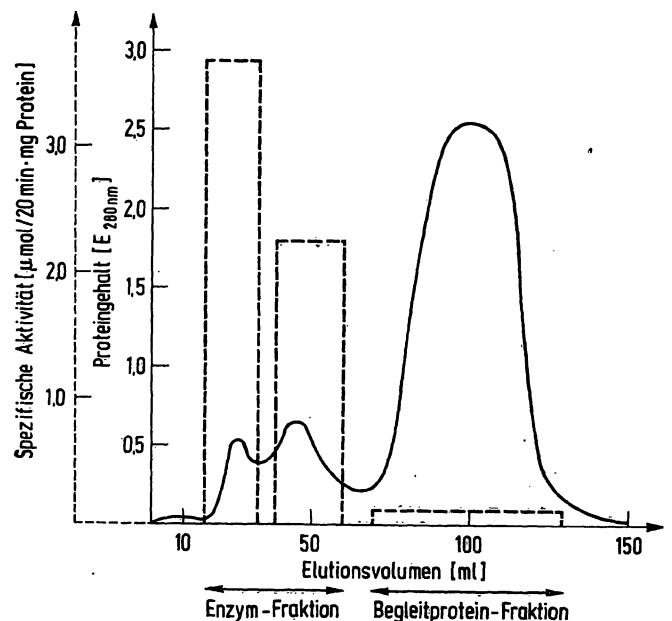
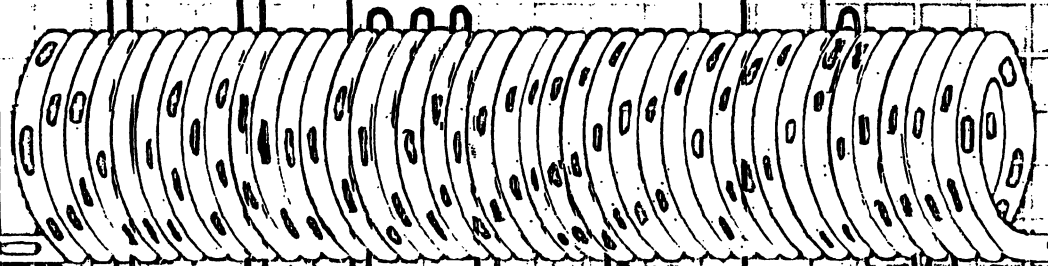


Abb. 1
Sephadex G-100-Chromatographie der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
— Elutionskurve der Proteine (Messung der Extinktion bei 280 nm);
- - - Enzymaktivitäten (μ mol IMP/20 min · mg Protein)

Diagnostica MERCK

Substanz entscheidet



Automation im Kliniklabor

364

Merckotest-Automatenpackungen für Enzymautomaten

**Grundsubstanzen, gebrauchsfertige Reagenzlösungen
und Reagenzzubereitungen**

für den Technicon®- Autoanalyser®

® = Warenzeichen der Firma Technicon

Merckotest Reagenziensätze

**Verlangen Sie bitte unsere Spezialprospekte unter Angabe
des von Ihnen verwendeten Gerätes**

E. Merck, Darmstadt



Bei der Beschaffung von Derivaten von cyclischem 3':5'-AMP kann Ihnen keine andere Firma so gut helfen wie Sigma

Das erste käuflich erhältliche cyclische 3':5'-AMP wurde vor über 10 Jahren von Sigma angeboten. Wir stellten es durch alkalische Hydrolyse von ATP mit etwa 2% Ausbeute mühsam her. Es kostete damals \$ 500/g. Heute bieten wir unsere Nr. A 9501 mit einer Reinheit von etwa 99% in 25 g-Packungen für weniger als \$ 20/g an.

A 9501 Adenosin-3':5'-monophosphorsäure, cyclisch, freie Säure	25 mg	\$ 2,00
	100 mg	\$ 5,40
	500 mg	\$ 18,00
	1 g	\$ 29,00
	5 g	\$ 136,00
	25 g	\$ 485,00

A 6885 Adenosin-3':5'-monophosphorsäure, cyclisch, Natriumsalz	25 mg	\$ 4,50
	50 mg	\$ 7,50
	100 mg	\$ 12,60
	250 mg	\$ 25,20
	500 mg	\$ 42,05
	1 g	\$ 69,50
5 g	\$ 325,00	

Sigma bietet auch einige verwandte AMP-Derivate an, die wir für sehr gut halten

B 7880 8-Bromadenosin-3':5'-monophosphorsäure, cyclisch, Natriumsalz	2 mg	\$ 5,50
	5 mg	\$ 10,80
	25 mg	\$ 36,00
	100 mg	\$ 100,00
	250 mg	\$ 200,00

D 1256 2'-Desoxyadenosin-3':5'-monophosphorsäure, cyclisch, Natriumsalz	5 mg	\$ 8,40
	10 mg	\$ 13,70
	25 mg	\$ 27,50
	100 mg	\$ 75,00
	250 mg	\$ 150,00

D 0627 N ⁶ , O ^{2'} -Dibutyladenosin- 3':5'-monophosphorsäure, cyclisch, Natriumsalz	5 mg	\$ 3,00
	25 mg	\$ 9,00
	100 mg	\$ 23,50
	250 mg	\$ 45,00
	1 g	\$ 149,00

M 1380 N ⁶ -Monobutyladenosin- 3':5'-monophosphorsäure, cyclisch, Natriumsalz	2 mg	\$ 4,60
	5 mg	\$ 7,80
	10 mg	\$ 13,00
	25 mg	\$ 27,50
	100 mg	\$ 100,00

M 1505 O ^{2'} -Monobutyladenosin- 3':5'-monophosphorsäure, cyclisch, Natriumsalz	2 mg	\$ 9,70
	5 mg	\$ 20,00
	10 mg	\$ 32,00
	25 mg	\$ 64,00
	100 mg	\$ 175,00

M 3256 O ^{2'} -Monobutyl-8-bromo-adenosin- 3':5'-monophosphorsäure, cyclisch, Natriumsalz	2 mg	\$ 15,00
	5 mg	\$ 27,50
	25 mg	\$ 90,00
	100 mg	\$ 250,00

M 8381 N ⁶ -Monobutyl-2-desoxyadenosin- 3':5'-monophosphorsäure, cyclisch, Natriumsalz	2 mg	\$ 15,00
	5 mg	\$ 27,50
	25 mg	\$ 90,00
	100 mg	\$ 250,00

M 3006 O ^{2'} -Monobutylguanidin- 3':5'-monophosphorsäure, cyclisch, Natriumsalz	2 mg	\$ 9,75
	5 mg	\$ 20,00
	10 mg	\$ 32,00
	25 mg	\$ 64,00
	100 mg	\$ 175,00

M 9631 O ^{2'} -Monosuccinyladenosin- 3':5'-monophosphorsäure, cyclisch, Natriumsalz	2 mg	\$ 30,00
	5 mg	\$ 54,00
	10 mg	\$ 90,00
	25 mg	\$ 180,00
	100 mg	\$ 500,00

M 9131 O ^{2'} -Monosuccinyladenosin- 3':5'-monophosphorsäure, cyclisch, freie Säure	2 mg	\$ 30,00
	5 mg	\$ 54,00
	10 mg	\$ 90,00
	25 mg	\$ 180,00
	100 mg	\$ 500,00

Zusätzlich sind neben dieser Hauptkategorie folgende Verbindungen erhältlich:

N⁶-Monosuccinyladenosin-3':5'-monophosphorsäure, cyclisch
N⁶, O^{2'}-Disuccinyladenosin-3':5'-monophosphorsäure, cyclisch
8-Azidoadenosin-3':5'-monophosphorsäure, cyclisch
8-Hydroxyadenosin-3':5'-monophosphorsäure, cyclisch
N⁶, O^{2'}-Dibutylguanidin-3':5'-monophosphorsäure, cyclisch
N⁶-Monobutylguanidin-3':5'-monophosphorsäure, cyclisch

Wir hoffen, außerdem demnächst anbieten zu können:

8-Aminoadenosin-3':5'-monophosphorsäure, cyclisch
8-Methoxyadenosin-3':5'-monophosphorsäure, cyclisch
8-Methylthioadenosin-3':5'-monophosphorsäure, cyclisch
8-Äthylthioadenosin-3':5'-monophosphorsäure, cyclisch
8-Methylaminoadenosin-3':5'-monophosphorsäure, cyclisch
Tyrosyl-methylester von O^{2'}-Monosuccinyladenosin-3':5'-monophosphorsäure, cyclisch

Da einige Forscher Mikromengen von cyclischem 3':5'-AMP bestimmen möchten, haben wir kleine Mengen von Protein-kinase (von cyclischem 3':5'-AMP abhängig) und Protein-kinase-Inhibitor nach A. Gilman, Proc. Nat. Acad. Sci. 61, 305 (1970) bereitgestellt.

Da die „kleine“ Sigma bisher nicht entsprechend ausgerüstet ist, mußten wir die Zusammenarbeit mit einem fremden Laboratorium zur Bestimmung dieser Produkte in Anspruch nehmen. Uns wurde berichtet, daß 1 µg Protein-kinase (von cyclischem 3':5'-AMP abhängig, Charge 22 C-8540) bei 0°C und pH 4 0,05 pmol cyclisches 3':5'-AMP bindet. Durch Zugabe des Inhibitors wird die Bindungskapazität verdoppelt.

P 5511 Protein-kinase (von cyclischem 3':5'-AMP abhängig) aus Rinderherz	1 mg Protein	\$ 10,00
	5 mg Protein	\$ 35,00

Lyophilisiertes Pulver, enthält etwa 80% Protein, 10% EDTA und 10% Kaliumphosphat, pH 7. Enthält u. a. folgende Verunreinigungen:

< 0,01 U/mg ATPase und etwa 0,5 U/mg Phosphodiesterase und cyclisches 3':5'-Nucleotid, das unter Bedingungen des Binding Assay inaktiv ist

P 5636 Protein-kinase-Inhibitor aus Rinderherz	10 mg Protein	\$ 7,50
	50 mg Protein	\$ 25,00

Lyophilisiertes Pulver, etwa 98% Protein und < 2% Puffersalze

Alle Preise einschließlich normaler Versandgebühr zu Ihnen überall hin in die Welt.

Es ist ein Vergnügen, Geschäfte mit Sigma zu machen

Bestellen Sie direkt — R-Gespräch von überall her in der Welt Tagsüber von Haus zu Haus, 314-771-5750. Nachts von Person zu Person, Dan Broida, 314-092-6418 TWX (Fernschreiber) Tag und Nacht: 910-761-0593 Telegramme: SIGMACHEMI, St. Louis, Missouri

Die Forschungslaboratorien von
SIGMA CHEMICAL COMPANY

MAILING ADDRESS: P. O. BOX 14508, ST. LOUIS, MO., 63178, U.S.A.

MANUFACTURERS OF THE FINEST BIOCHEMICALS AVAILABLE

Vertreten durch
SIGMA LONDON Chem. Co., Ltd. · 12, Lettice St., London, S. W. 6., England
Telephone: 01-736-5823 (Reverse Charges)
SIGMA ISRAEL Chem. Co. Ltd. · 28 Kaf-Gimel St., Givataim, Israel
Telephone: (03) 76 06 54 (Reverse Charges)

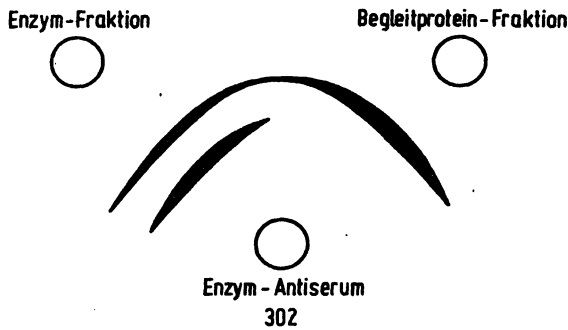


Abb. 2

Agargel-Doppeldiffusionstest der eingegangenen Fraktionen mit Enzym-Antiserum

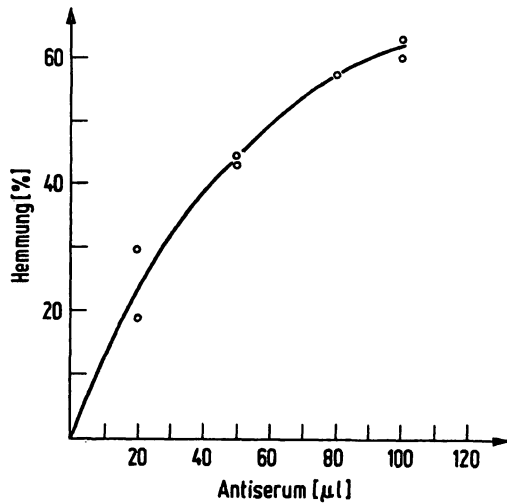


Abb. 3

Enzymhemmung mit Enzym-Antiserum

Enzym-Hemmtest

Um die biologische Wirksamkeit der gewonnenen Antikörper zu untersuchen, führten wir mit dem Enzym-Antiserum 302 einen Hemmtest durch. Bei konstanter Enzymkonzentration konnte mit Antiserum eine dosisabhängige Hemmung der Enzymaktivität beobachtet werden (Abb. 3). Die entsprechen-

den Kontrollversuche mit normalem Kaninchenserum zeigten keine Enzymhemmung.

Untersuchungen der Isoenzyme

Mittels der Polyacrylamidgel-Disk-Elektrophorese führten wir eine weitere Auftrennung der in der Enzym-Fraktion enthaltenen Proteine durch. Bei Eiweißfärbung zeigten sich 3 scharf getrennte Banden (Abb. 4). Um festzustellen, ob die gefundenen Eiweißbanden Enzymaktivität enthalten, inkubierten wir nicht gefärbte Gele mit Substrat: 4 verschiedene Aktivitätsmaxima (Isoenzyme 1—4) stellten sich auf diese Weise dar (Abb. 4). Die Aktivitätsmaxima lagen im Bereich der Eiweißbanden. Dem Isoenzym 1 und 2 entspricht die am weitesten anodisch wandernde Eiweißbande. Das Eiweißäquivalent zu Isoenzym 3 deckt sich genau mit dessen Aktivität. Es fiel allerdings auf, daß die dem Isoenzym 4 entsprechende Eiweißbande sich kathodisch über deren Aktivitätsbereich hinaus erstreckt.

Die im Agargel-Doppeldiffusionstest der einzelnen Gelabschnitte mit Enzym-Antiserum 302 darstellbaren Präzipitationslinien wiesen auf das Vorhandensein antigenen Materials hin, dessen Verteilungsmuster sowohl den einzelnen Isoenzymaktivitäten als auch den Eiweißbanden entsprach (Abb. 4). In den Gelscheibchen entsprechend Wanderungsquotienten von 0,285 bis 0,432 traten 2 Präzipitationslinien auf, in allen übrigen antigenhaltigen Gelabschnitten hingegen nur eine.

Zur Feststellung der Identität der Präzipitationsbanden und damit zur immunologischen Charakterisierung der Isoenzyme untersuchten wir in weiteren Diffusionstests die den Isoenzymmaxima entsprechenden Zonen der Polyacrylamidgelle und verglichen sie mit der Enzym-Fraktion nach der in Abbildung 5 wiedergegebenen Anordnung. Alle Isoenzym-scheibchen zeigten bei diesem Versuch eine Präzipitationslinie, die mit der der Auftragungsstelle des Enzym-Antiserums näher gelegenen Linie der Enzym-Fraktion identisch war. Die im Isoenzympeak 1 aufgetretene zweite, dem Antigen-

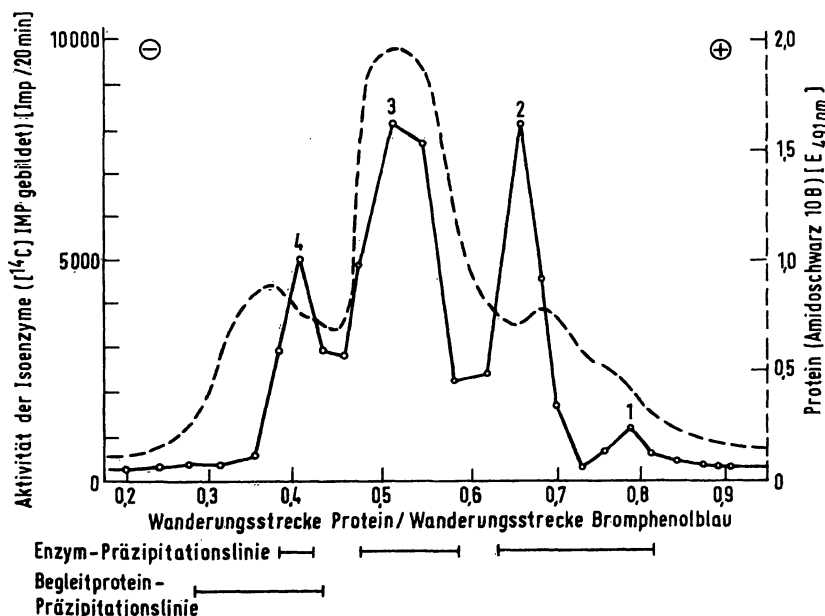


Abb. 4

Isoenzymmuster der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase —○— Isoenzymaktivitäten; ---- Eiweißprofil (Amidoschwarzfärbung, Messung der Extinktion bei 491 nm)

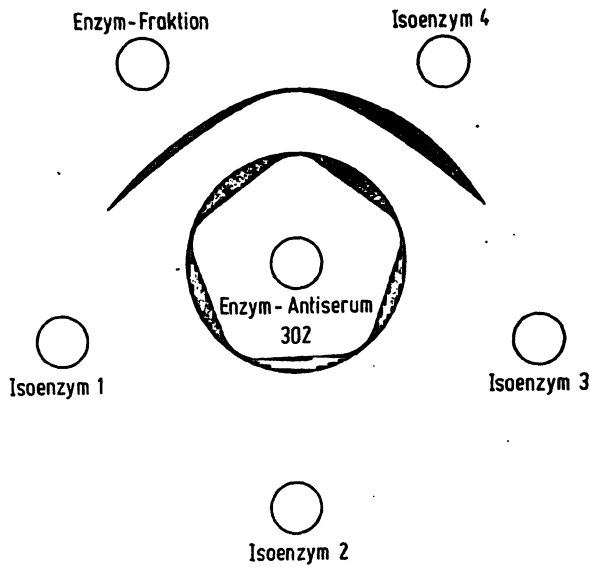


Abb. 5

Agargel-Doppeldiffusionstest der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Isoenzyme mit Enzym-Antiserum

auftragungsort näher gelegene Präzipitationslinie ergab mit den Begleitproteinen der Enzym-Fraktion eine komplette Identitätsreaktion.

Diskussion

Von den nach Sephadex-Chromatographie erhaltenen beiden Fraktionen besitzt praktisch nur die Enzym-Fraktion, mit der immunisiert wurde, eine Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Aktivität (Abb. 1). Die Agargel-Doppeldiffusionstests ergaben das Vorliegen eines gemeinsamen Proteins in beiden Fraktionen, das mit Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase nicht identisch ist (Begleitproteine). Die zweite, nur in der Enzym-Fraktion auftretende Präzipitationslinie ist mit größter Wahrscheinlichkeit das Reaktionsprodukt von Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase mit dem Enzym-Antiserum. Die über 60proz.

Hemmung der Enzymaktivität durch das Antiserum unterstreicht dessen spezifische Wirkung.

Die Enzym-Fraktion, die anhand der Diffusionsteste das Vorhandensein von zwei Komponenten vermuten ließ, zeigte hingegen in der Auftrennung mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese 3 Eiweißbanden und 4 Enzymaktivitätsmaxima, entsprechend den 4 Isoenzymen. In allen Gelabschnitten mit Enzymaktivität ließ sich in der Doppeldiffusion die Enzymlinie (Abb. 5) einwandfrei nachweisen. Die in der Enzym-Fraktion immunologisch nachgewiesenen Verunreinigungen konnten auch bei dieser Versuchsanordnung nachgewiesen werden und korrelierten gut mit den Eiweißbanden.

Unsere Ergebnisse zeigen, daß Erythrocyten-Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 4 Isoenzyme besitzt, die sich durch ihre elektrophoretischen Eigenschaften deutlich unterscheiden, die aber immunologisch im Doppeldiffusionstest komplette Identität aufweisen.

Das immunologische Verhalten der Isoenzyme spricht für eine posttranskriptionale Änderung der am gleichen Gen synthetisierten Polypeptidkette des Enzymproteins (18). Ob diese Änderung durch Aufspaltung des oligomeren Enzyms zu Isoenzymen mit unterschiedlichen Polypeptidketten, durch Bildung von Konformationsisomeren oder durch Reaktion niedermolekularer Modulatoren verursacht wird, kann anhand der vorliegenden Befunde noch nicht gesagt werden. Zur endgültigen Klärung der Frage nach der Entstehung der Isoenzyme der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase ist eine weitere Reinigung mit anschließenden enzymkinetischen Untersuchungen notwendig.

Von großem klinischen Interesse ist die Frage, ob Patienten mit Hyperuricaemie und verminderter Enzymaktivität (6, 15) ein verändertes Isoenzymmuster haben, und ob bei Kindern mit LESCH-NYHAN-Syndrom das Enzym tatsächlich fehlt oder ob ein mutiertes inaktives Enzymprotein vorliegt.

Literatur

1. KORN, E. O., REMY, C. N., WASILEYKO, H. C. & BUCHANAN, J. M. (1955), *J. Biol. Chem.* **217**, 875—883. — 2. NIERLICH, O. P. & MAGASANIK, B. (1965), *J. Biol. Chem.* **240**, 358—365. — 3. KALLE, G. P. & GOTS, J. S. (1961), *Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.* **20**, 358. — 4. KELLEY, W. N., ROSENBLUM, F. M., HENDERSON, J. F. & SEEGMILLER, J. E. (1967), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **28**, 340—345. — 5. SEEGMILLER, J. E., ROSENBLUM, F. M. & KELLEY, W. N. (1967), *Science* **155**, 1682—1683. — 6. KELLEY, W. N., GREENE, M. L., ROSENBLUM, F. M., HENDERSON, J. F. & SEEGMILLER, J. E. (1969), *Ann. Intern. Med.* **70**, 155—206. — 7. SORENSEN, L. B. (1970), *J. Clin. Invest.* **49**, 968—978. — 8. ARNOLD, W. J. & KELLEY, W. N. (1971), *J. Biol. Chem.* **246**, 7398—7404. — 9. DAVIES, M. R. & DEAN, B. M. (1971), *FEBS*

10. MÜLLER, M. M. & DOBROVITS, H. (1972), *Prep. Biochem.* (im Druck). — 11. KRENITSKY, T. A., PAPAIOANNOU, R. & ELION, G. B. (1969), *J. Biol. Chem.* **244**, 1263—1270. — 12. VAN KAMPEN, E. J. & ZIJLSTRA, W. G. (1961), *Clin. Chim. Acta* **6**, 538—544. — 13. SOLS, A. (1947), *Nature (London)* **160**, 89. — 14. KELLEY, W. N., ROSENBLUM, F. M., HENDERSON, J. F. & SEEGMILLER, J. E. (1967), *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* **57**, 1735—1739. — 15. MÜLLER, M. M. (1972), *Fortschritte der klinischen Chemie, Enzyme und Hormone*, S. 233 bis 237, Verlag d. Wien. Med. Akademie. — 16. DAVIS, B. J. (1964), *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**, 404—427. — 17. OUCHTERLONY, O. (1949), *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **26**, 507—515. — 18. MARKERT, C. L. (1968), *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **151**, 14—40.

Dr. med. Mathias M. Müller und Dr. med. Heinz Dobrovits
Medizinisch-Chemisches Institut der Universität Wien
Währingerstraße 10
A 1090 Wien
Dr. med. Heinrich Stemberger
Hygiene-Institut der Universität Wien
Kinderspitalgasse 15
A 1090 Wien
Österreich/Austria