

Bestimmung der Adenylatkinase-Varianten beim Menschen*

G. RADAM und H. STRAUCH

Institut für Gerichtliche Medizin der Humboldt-Universität Berlin
(Direktor: Prof. Dr. med. O. PROKOP)

Eingegangen am 21. Dezember 1967

Die praktischen Erfahrungen der letzten Jahre haben gezeigt, daß genetisch gesteuerte Enzymvarianten hinsichtlich ihrer Leistungsfähigkeit bei der Begutachtung strittiger Paternitätsfälle den übrigen erblichen Blutmerkmalen durchaus ebenbürtig sein können. Über die Pseudocholinesterase-Typen und die saure Erythrocytenphosphatase liegen bereits zahlreiche Veröffentlichungen vor. Jahr für Jahr werden neue Enzym polymorphismen entdeckt, und ein Ende dieser Entwicklung ist noch nicht abzusehen. Jedes neue System stellt den Gerichtsmediziner vor die Aufgabe, es auf seine praktische Anwendbarkeit zu prüfen und gegebenenfalls in die Praxis zu übertragen.

Im Jahre 1966 berichteten FILDES und HARRIS über einen erblichen Polymorphismus der menschlichen Adenylatkinase. Sie beobachteten in ihrem Untersuchungsgut drei verschiedene Isoenzymmuster, die sie mit AK 1, AK 2—1 und AK 2 bezeichneten. Familienuntersuchungen führten zur Annahme von zwei kombinanten, autosomalen Genen (AK^1 , AK^2). BOWMAN et al. (1967) beschrieben zwei neue Phänotypen (AK 3—1 und AK 4—1), denen vermutlich die Wirkung zweier weiterer Gene auf dem gleichen Genort zugrunde liegt. Das bisher bekanntgewordene Material haben wir in der Tabelle zusammengestellt. Beim Vergleichen der Zahlen ist zu berücksichtigen, daß AK 3—1 mit der von FILDES und

Tabelle

Typenverteilung der Adenylatkinase in der englischen und amerikanischen Bevölkerung

	FILDES u. HARRIS		BOWMAN et al.	
	960 Engländer		1315 Weiße	1063 Nege r
AK 1	864	1193	1049	
AK 2—1	95	118	13	
AK 2	1	3	0	
AK 3—1	0	1	1	

* Herrn Professor Dr. B. MUELLER in dankbarer Verehrung zu seinem 70. Geburtstag.

HARRIS angewendeten Methode möglicherweise gar nicht erfaßt und damit das Fehlen dieses Typs in der englischen Stichprobe vielleicht nur vorgetäuscht wird.

FILDES und HARRIS verwenden für die horizontale Stärkegelelektrophorese ein diskontinuierliches Histidin-NaOH/Citrat-Puffersystem pH 7,0 und benötigen bei einem Spannungsgradienten von $10 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ eine Trenndauer von 4 Std, wobei das Gel mittels wassergekühlter Metallplatten gekühlt werden muß. Die Isoenzyme werden relativ weit auseinandergezogen. BOWMAN et al. arbeiten mit der vertikalen Stärkegelelektrophorese in einem Phosphatpuffer pH 6,2 und geben als Trennzeit 14—16 Std bei $2-4^\circ \text{ C}$ an.

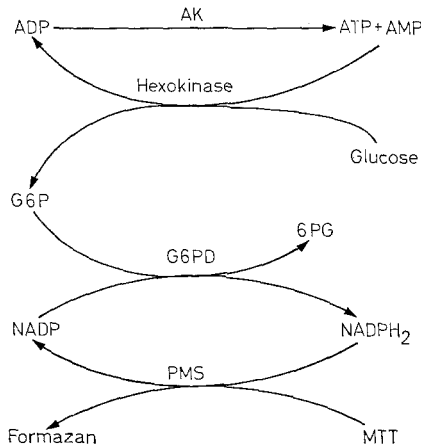


Abb. 1. Reaktionsablauf bei der Sichtbarmachung der Adenylatkinase-Zonen.
(Nach FILDES und HARRIS)

Eine sehr elegante Methode haben FIEDLER u. NIEBUHR (1967) beschrieben. Sie trennen nach einer von uns erprobten Technik (RADAM und STRAUCH, 1966a, 1966b) die saure Erythrocytenphosphatase elektrophoretisch auf und inkubieren eine Hälfte des horizontal aufgeschnittenen Gelblocks wie üblich mit Phenolphthaleindiphosphat, während an der anderen Hälfte gleichzeitig die Adenylatkinase sichtbar gemacht wird. Es genügt für orientierende Untersuchungen, lediglich den kathodenwärts von der Startlinie gelegenen Abschnitt zu entwickeln, da die vom Gen AK^2 gesteuerte Enzymkomponente auf diese Weise sicher zu bestimmen ist. Man wird hierbei aber mit der Möglichkeit rechnen müssen, daß die seltenen Typen $AK\ 3-1$ als $AK\ 1-1$ und $AK\ 2-2$ als $AK\ 2-1$ verkannt werden könnten.

Als Untersuchungsgut eignet sich nach FILDES und HARRIS außer Hämolsat auch homogenisierte Leichenmuskulatur.

Die Entwicklung der Enzymzonen beruht auf dem in Abb. 1 gezeigten Prinzip. Adenylatkinase konvertiert ADP zu ATP und AMP. ATP reagiert mit Glucose in Gegenwart von Hexokinase unter Bildung von Glucose-6-phosphat und ADP. Glucose-6-phosphatdehydrogenase oxydiert Glucose-6-phosphat unter gleichzeitiger Reduktion von NADP zu 6-Phosphogluconat. NADPH₂ wiederum reduziert in Anwesenheit von Phenazinmethosulfat (Elektronenüberträger) 3(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid zu blauem, unlöslichem Formazan.

Wir stellen im folgenden ein Bestimmungsverfahren zur Diskussion, das mit einem üblichen Elektrophoresegerät auskommt. Die Methode erlaubt bei sparsamem Chemikalienverbrauch und kurzer Untersuchungszeit eine eindeutige Differenzierung der bisher beobachteten Phänotypen und kann daher für forensische Zwecke empfohlen werden.

Methodik

1. 0,33 m Phosphatpuffer pH 6,5 (zur Elektrophorese). 1 Liter Pufferlösung enthält 31,75 g prim. Kaliumphosphat (KH_2PO_4) und 17,9 g sec. Natriumphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$).

2. 0,1 m Tris-Puffer pH 8,0 mit 0,01 m MgCl_2 (für Entwickler). In 1 Liter Lösung sind 12,1 g Tris, 26,8 ml 2 n HCl und 2,03 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ enthalten.

3. Entwickler. 20 ml Tris-Puffer werden mit 100 mg Agar versetzt und 30 min im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen auf 40° C werden darin kurz vor Gebrauch gelöst:

40 mg	Glucose
10 mg	ADP- Na_2 (AWD 37)
2 mg	NADP (AWD 32)
2 mg	PMS (Sigma)
2 mg	MTT (Serva)
5 μl	G6PDH (Boehringer 15431)
5 μl	HK (Boehringer 15303)

Mit der angegebenen Menge können 50—60 Blute bestimmt werden.

4. Elektrophorese. Wir benutzen ein für die Phosphatasebestimmung übliches Elektrophoresegerät (vgl. RADAM und STRAUCH, 1966a), geben aber in die Kathodenkammern konzentrierten und in die Anodenkammern auf 0,066 m verdünnten Phosphatpuffer. Zur Herstellung des 10%igen Stärkegels werden 2,5 ml Phosphatpuffer mit Wasser auf 220 ml aufgefüllt. Das Gel mißt 220 \times 140 \times 7 mm und kann infolge der kurzen Laufstrecke des Enzyms in 4—5 Schlitzreihen beschickt werden, so daß man etwa 50—60 Proben unterbringen kann. Die mit Hämolyat getränkten Filterpapierblättchen (Whatman No. 1) müssen, bevor sie in das Gel gebracht werden, zwischen Fließpapier kräftig ausgedrückt werden. Bei einem Spannungsgradienten von 7 V \cdot cm⁻¹ (entsprechend einem Strom von 22 mA) und 5° C wird bereits nach 3 Std eine genügende Auftrennung der Adenylatkinase erreicht.

Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel in der bekannten Weise horizontal aufgeschnitten und mit der oben angegebenen Entwicklerlösung überschichtet. Es empfiehlt sich, die Hämoglobinzonen zur besseren Ausnützung des Entwicklers vorher herauszuschneiden. Bei einer Reaktionstemperatur von 37° C reicht eine Inkubationsdauer von 20 min völlig aus.

Unter den von uns gewählten Bedingungen wandern das Hämoglobin und sämtliche für die Typendifferenzierung wesentlichen Fraktionen der Adenylatkinase kathodenwärts. AK 1—1 zeichnet sich durch eine einzige, intensive Enzymzone aus (Abb. 2). Beim Typ AK 2—1 findet sich außerdem eine schnellere, etwa ebenso stark angefärbte Zone. Für die Variante 3—1 ist eine in unmittelbarer Nähe des Startschlitzes gelegene Zusatzbande charakteristisch. Bei diesem Typ ist außerdem auf der Anodenseite regelmäßig eine etwas schwächere Zone erkennbar.

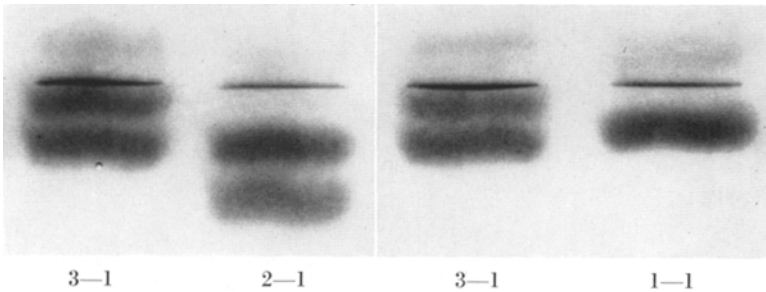


Abb. 2. Verschiedene Adenylatkinase-Typen beim Menschen, aufgetrennt mittels horizontaler Stärkegelelektrophorese im Phosphatpuffer pH 6,5

Auch AK 1—1 und 2—1 weisen anodisch wandernde, extrem schwach angefärbte Komponenten auf. In unserem zur Zeit 1388 Individuen umfassenden Berliner Material sahen wir ca. 7,5% AK 2—1-Typen. AK 3—1 wurde von uns viermal beobachtet.

Zusammenfassung

Es wird eine kurze Übersicht über die erblich gesteuerten Adenylatkinase-Varianten beim Menschen gegeben und eine eigene Trennmethode beschrieben, deren Anwendung in der gerichtsarztlichen Praxis geeignet erscheint. Im gegenwärtig 1388 Individuen umfassenden Berliner Untersuchungsmaterial ist der AK 2—1-Phänotyp zu ca. 7,5% vertreten.

Summary

A short revue of the genetically controlled Adenylatkinase-Variations in the human is presented here, including a description of a newly developed splitting method, whose use seems to have practical application in the Forensic Medical Practice. In the 1388 individual cases which were investigated in Berlin, up to the present, 7.5% were found to be of the AK 2—1-Phenotype.

Literatur

- BOWMAN, J. E., H. FRISCHER, F. AJMAR, P. E. CARSON, and M. K. GOWER: Population, family and biochemical investigation of human adenylate kinase polymorphism. *Nature (Lond.)* **214**, 1156 (1967).
- FIEDLER, H., u. R. NIEBUHR: Die Untersuchung zweier erythrocytärer Enzym-Polymorphismen in einem Arbeitsgang. *Blut* **16**, 161 (1967).
- FILDES, R. A., and H. HARRIS: Genetically determined variation of adenylate kinase in man. *Nature (Lond.)* **209**, 261 (1966).
- RADAM, G., u. H. STRAUCH: Populationsgenetik der sauren Erythrozytenphosphatase. *Humangenetik* **2**, 378 (1966 a).
- — Elektrophoretische Darstellung der sauren Erythrozytenphosphatase. *Z. klin. Chem.* **4**, 234 (1966 b).

Dr. GEORG RADAM, Dr. HANSJÜRG STRAUCH
Institut für Gerichtliche Medizin
der Humboldt-Universität Berlin
X 104 Berlin, Hannoversche Str. 6