

Enzymaktivität der PGM₁ in Erythrozyten

T. Bajanowski, A. Baumann und B. Brinkmann

Institut für Rechtsmedizin, Westfälische Wilhelms-Universität, Von-Esmarch-Strasse 86,
D-4400 Münster, Bundesrepublik Deutschland

Eingegangen 15. Mai 1990

Activity of red cell phosphoglucomutase

Summary. The enzyme activity of phosphoglucomutase (PGM) has been investigated in red cell haemolysates from 142 individuals and compared to the sub-type as determined by isoelectric focusing. The 10 phenotypes showed significant differences in PGM-activity which indicates that there is a correlation between the level of activity and the isoelectric point of homozygotes. No indication of silent alleles or alleles with reduced activity was found in this collective.

Key words: PGM-phenotypes – Enzyme-activity – Silent allele

Zusammenfassung. Die Enzymaktivität der erythrozytären Phosphoglucomutase wurde in 142 Hämolysaten bestimmt. Die PGM-Phänotypen wurden mittels Isoelektrofokussierung auf Polyacrylamid-Gel ermittelt. Dabei konnten 10 verschiedene Phänotypen dargestellt werden. Die mittlere Enzymaktivität dieser 10 Phänotypen weist signifikante Unterschiede auf. Ein stummes Allel bzw. ein Allel mit reduzierter PGM-Aktivität wurde nicht festgestellt. Es zeigte sich eine Korrelation zwischen Enzymaktivität und isoelektrischem Punkt der vier Homozygoten.

Schlüsselwörter: PGM-Phänotypen – Enzym-Aktivität – Null-Allel

Einleitung

Die Phosphoglucomutase besitzt sowohl im Rahmen der Vaterschaftsbegutachtung wie auch der spurekundlichen Untersuchung in der forensischen Praxis einen festen Platz. Aufgrund der günstigen Verteilung der beiden Hauptallele auf dem Locus I beträgt die Vaterschaftsausschlußchance (VACH) unter Anwendung der von Spencer, Hopkins und Harris (1964) beschriebenen Methode der

Sonderdruckanfragen an: T. Bajanowski

Agargel-Elektrophorese 14,6%. Nach Einführung der Isoelektrofokussierung in die PGM-Typisierung (Bark et al. 1976; Kühnl und Spielmann 1978) konnten die beiden häufigen Allele 1 und 2 in je eine schnell und eine langsam wandernde Komponente getrennt werden. Das führte zur Erweiterung des Genmodells und nahezu zur Verdopplung der VACH.

Bereits 1968 berichteten Fiedler und Pettenkofer von einem Fall ohne nachweisbare Enzymaktivität. Familienuntersuchungen sprachen für das Vorliegen eines PGM₁^o/PGM₁^o Genotyps. In der Folgezeit beschrieben weitere Autoren das Auftreten von stummen Allelen der PGM₁ (Brinkmann et al. 1975; Herzog und Libich 1982; Spielmann und Kühnl 1982). Bereits 1969 versuchten wiederum Fiedler und Pettenkofer diese stummen Allele durch Messung der Enzymaktivität näher zu charakterisieren. Sie beschrieben eine deutliche Verminderung der in vitro gemessenen Enzymaktivität und vermuteten, daß die Restaktivität in den Erythrozyten in diesen Fällen allein auf Genprodukte, gesteuert vom PGM₂-Genort zurückzuführen sei. Der Anteil der PGM₂-Aktivität an der Phosphoglucomutase-Gesamtaktivität wurde auf ca. 30% geschätzt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, festzustellen, ob zwischen in vitro-Aktivität der Phosphoglucomutase und durch Isoelektrofokussierung bestimmten Phänotypen Korrelationen bestehen. Dabei erfolgte die Bestimmung der in vitro-Aktivität nicht wie von Scacchi et al. (1983) oder Modiano et al. (1970) angegeben als Endpunktbestimmung, sondern nach Brinkmann et al. (1972) und Quick et al. (1974) unter Zugabe von 6-Phosphoglycolatdehydrogenase, die den weiteren Umsatz des 6-Phosphogluconats in D-Ribulose-5-Phosphat steuert.

Material und Methode

Untersucht wurden 142 Hämolysate nicht-verwandter Personen aus dem Untersuchungsgut des Instituts für Rechtsmedizin der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster. Die PGM₁-Phänotypen wurden in üblicher Weise mittels Isoelektrofokussierung auf Polyacrylamid-Gelen bestimmt. Daneben erfolgte die Bestimmung der Enzymaktivität im fotometrischen Test nach Brinkmann et al. (1972). Dabei wurde die pro Zeiteinheit durch Umsetzung des Glucose 1-Phosphats in Glucose 6-Phosphat gebildete NADPH⁺-Konzentration auf der Basis der resultierenden Extinktionsänderung mittels Filterfotometer PL4 (Zeiss) bzw. Ultrospec II (LKB Biochrom) bei einer Wellenlänge von 366 nm gemessen. Die Proben wurden während des Meßvorgangs über einen temperierbaren Küvettenhalter auf einer Temperatur von 30°C gehalten. Als Bezugswert für die PGM-Konzentration im Hämolysat wurde der Hämoglobin-Gehalt bestimmt.

Auf der Basis des Lambert-Beer'schen Gesetzes und unter Berücksichtigung des Hämoglobin-Gehalts gilt für die katalytische Aktivität der Phosphoglucomutase Z_{PGM} :

$$Z_{\text{PGMHb}} = 57.683 \cdot \frac{E}{t} \cdot \frac{1}{E_{\text{Hb}}} \cdot \frac{U}{G_{\text{Hb}}}$$

Dabei ist 1 U definitionsgemäß jene Enzymaktivität, die erforderlich ist, um pro Minute die Umwandlung von 1 Mikromol Substrat zu katalysieren.

Untersucht wurde weiterhin die Enzymstabilität unter verschiedenen Lagerungsbedingungen der Hämolysate. Im Konkreten erfolgte die Lagerung über bis zu 26 Wochen bei -80°C sowie über 24–48 Stunden bei $+4^{\circ}\text{C}$.

Ergebnisse und Diskussion

Die mittels Isoelektrofokussierung bestimmten PGM₁-Phänotypen sowie die zugehörige mittlere Enzymaktivität U/G_{Hb} sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Da-

Tabelle 1. Verteilung der Aktivität der PGM_y^a-Phänotypen

Phänotyp	Anzahl der Proben <i>n</i>	Mittelwert der Enzymaktivität U/g _{Hb}	Standardabweichung (s)	Variationskoeffizient (%)
a ₁	41	0,9417	0,0745	1,24
a ₂ -a ₁	21	1,2087	0,0781	1,41
a ₃ -a ₁	21	0,8911	0,1153	2,82
a ₄ -a ₁	14	1,1736	0,0896	2,04
a ₂	9	1,5785	0,1259	2,66
a ₃ -a ₂	9	1,3544	0,1064	2,62
a ₄ -a ₂	10	1,5652	0,1369	2,76
a ₃	12	0,9088	0,1208	3,84
a ₄ -a ₃	4	0,9952	0,1149	5,77
a ₄	1	0,917	–	–

bei ist zu bemerken, daß im Interesse der Aktivitätsmessungen bewußt vermehrt seltene Phänotypen in das Untersuchungsmaterial einbezogen wurden. Das hat zur Folge, daß die resultierenden Genfrequenzen von den Erwartungswerten einer Durchschnittspopulation abweichen.

Nach statistischer Prüfung ergaben sich, wie auch bei Scacchi et al. (1983) signifikante Unterschiede in der Enzymaktivität der einzelnen Phänotypen. Für den homozygoten a₄-Phänotyp wurde ein Aktivitätswert gemessen, der dem von a₁ in etwa entspricht. Jedoch müßte der zu erwartende Aktivitätswert des homozygoten a₄-Typs größer als der des Typs a₃-a₄ sein, da der homozygote Typ a₃ den niedrigsten Aktivitätswert überhaupt besitzt. Wird der Aktivitätswert für a₄ auf der Basis der Aktivitäten der anderen Phänotypen geschätzt, so ergibt sich ein Wert von 1,12 U/G_{Hb}, so daß a₄ dann zwischen a₄-a₃ und a₃-a₂ einzuordnen wäre. Eine mögliche Ursache für die niedrige Aktivität des homozygoten Typs a₄ kann darin vermutet werden, daß lediglich ein homozygoter a₄-Phänotyp untersucht werden konnte, dessen Aktivität möglicherweise primär vermindert war. Somit kann die Aktivität der Homozygoten in der Reihenfolge a₃ < a₁ < a₄ < a₂ angegeben werden. Unter Berücksichtigung des ca. 42%igen PGM₂-Anteils an der Gesamt-PGM-Aktivität (Terrenato et al. 1970) ergibt sich eine relative Aktivität von PGM₁^{a3}:PGM₁^{a1}:PGM₁^{a4}:PGM₁^{a2} wie 1,0:1,25:1,66:2,72. Die tatsächliche PGM₁-Aktivität der einzelnen Typen kann mit a₃ = 0,22 U/G_{Hb}, a₁ = 0,27 U/G_{Hb}, a₄ = 0,36 U/G_{Hb} und a₂ = 0,59 U/G_{Hb} angegeben werden.

Interessanterweise läßt sich eine Korrelation zwischen Enzymaktivität und isoelektrischem Punkt der jeweiligen homozygoten Phänotypen vermuten. Der Phänotyp a₃ mit der geringsten Enzymaktivität wird nach Fokussierung am weitesten kathodenwärts gefunden, hat also vom Startpunkt aus die kürzeste Strecke zurückgelegt. Es folgen entsprechend ihrer Aktivität die Phänotypen a₁, a₄ und schließlich a₂, am weitesten zur Anode zu legen.

Spielmann und Kühnl (1982) schätzten die Frequenz des PGM₁0-Alleles in europäischen Populationen auf 0,001 bis 0,01. Solche stummen Allele konnten in der vorliegenden Arbeit nicht gefunden werden. Dies war jedoch auch allein aufgrund der Untersuchungszahl nicht zu erwarten. Ebenso wurde in keinem

der untersuchten Hämolysate eine eindeutig verminderte PGM₁-Aktivität festgestellt. Nach Suzuki et al. (1988) zeigen solche in der Stärkegel-Elektrophorese stummen Allele nach Anwendung der Isoelektrofokussierung auf Polyacrylamid-Gelen ein schwach anfärbbares Band. Damit soll das stumme Allel der Stärkegel-Elektrophorese zu einem in seiner Aktivität reduzierten Allel der Isoelektrofokussierung werden.

Als limitierender Faktor für die Aktivitätsbestimmung erwies sich die Enzymstabilität. Nach Lagerung über mehr als zwei Wochen bei -80°C nimmt die PGM-Aktivität in den Hämolysaten um ca. 10–20% ab. Auf diesem Niveau bleibt sie dann nahezu 6 Monate annähernd konstant, um danach erneut um weitere 10–20% abzufallen. Eine Lagerung über 1–2 Tage bei $+4^{\circ}\text{C}$ hatte jedoch keinen erkennbaren Einfluß auf die Enzymaktivität.

Literatur

1. Bark JE, Harris MJ, Firth M (1976) Typing of the common Phosphoglucosaminase variants using isoelectric focusing – a new interpretation of the Phosphoglucosaminase system. *J Forensic Sci Soc* 16:115–121
2. Brinkmann B, Koops E, Kloop O, Heindl K, Rüdinger HW (1972) Inherited partial deficiency of the PGM₁ gene: biochemical and densitometric studies. *Ann Hum Genet* 35:363–366
3. Brinkmann B, Hoppe HH, Sachs HW, Weber W, Heide KG (1975) Über das Vorkommen des stummen Allels P⁰ in 10 deutschen Familien. *Z Rechtsmed* 75:25–32
4. Fiedler H, Pettenkofer H (1968) Ein „neuer“ Phänotyp im Isoenzymensystem der Phosphoglucosaminase des Menschen (PGM₁⁰). 1. Mitteilung. *Blut* 18:33–34
5. Fiedler H, Pettenkofer H (1969) Ein „neuer“ Phänotyp im Isoenzymensystem der Phosphoglucosaminase des Menschen (PGM₁⁰). 2. Mitteilung. *Blut* 18:358–362
6. Herzog P, Libich M (1982) A new case of a silent allele in the PGM₁ system. *Hum Hered* 32:293–296
7. Kühnl P, Spielmann W (1978) Investigations on the PGM₁^a-polymorphism (Phosphoglucosaminase – EC 2.7.5.1) by isoelectric focusing. *Hum Genet* 43:57–67
8. Modiano G, Scozaari R, Gigliani F, Santolamazza C, Afeltra P, Frattaroli W (1970) Red cell phosphoglucosaminase polymorphism. 1. Enzyme activity of different red cell PGM phenotypes. *Hum Hered* 20:86–93
9. Quick CB, Fisher RA, Harris H (1974) A kinetic study of the isoenzymes determined by the three human phosphoglucosaminase loci PGM₁, PGM₂ and PGM₃. *Eur J Biochem* 42:511–517
10. Scacchi R, Corbo RM, Palmarino R, Sacco G, Arnone M, Lucarelli P (1983) Human phosphoglucosaminase locus 1: Red cell enzymatic activities associated with common isoelectric focusing phenotypes. *Hum Hered* 33:218–222
11. Spencer N, Hopkins DA, Harris H (1964) Phosphoglucosaminase polymorphism in man. *Nature* 204:742–745
12. Spielmann W, Kühnl P (1982) Blutgruppenkunde. Thieme, Stuttgart New York
13. Suzuki K, Hishida S, Ito S, Miyazaki T, Matsui K, Matsumoto H (1988) A PGM 1 1A variant with a reduced activity. *Hum Hered* 38:326–328
14. Terrenato L, Santolamazza C, Gigliani F, Modiano G (1970) Red cell phosphoglucosaminase polymorphism. II. Densitometric studies. *Hum Hered* 20:94–103