

Red Cell Enzymes

Isoenzyme

P. Kühnl

Institut für Immunhämatologie und Blutspendedienst Hessen des DRK, Universität Frankfurt/M., Sandhofstr. 1, D-6000 Frankfurt/M. FRG

Die Analyse von Blutgruppen-Polymorphismen des menschlichen Blutes wurde durch den Ausbau verschiedener Elektrophoresetechniken ermöglicht. Dabei wurden verschiedene Entstehungsmöglichkeiten für Enzym-Heterogenitäten erkannt und genauer definiert. Zum einen können separate Gene zu genetisch unabhängigen Isoenzymen führen, wie dies bei der mitochondrialen und cytoplasmatischen Form der Malat-Dehydrogenase der Fall ist. Polymere Isoenzyme, deren Untereinheiten von zwei Genorten gesteuert werden, können zur Ausbildung höhergradiger Heteropolymere führen, wofür die Laktat-Dehydrogenase (LDH) ein gutes Beispiel bietet. Alle Gene können zur Ausbildung von Isoenzymen mit mono-, di- oder tri-merer Molekülstruktur führen, wie dies bei der Phosphoglucumutase (PGM) oder der Esterase D (ESD) der Fall ist. Sind unterschiedlich viele, gleichartige Einheiten vorhanden, so können polymere Isoenzyme, wie bei der Glutamat-Dehydrogenase (GDH) resultieren. Für die Interpretation von Isozymogrammen ist die Kenntnis epigenetischer Modifikationen primärer Isoenzyme bedeutsam, wobei durch Abspaltung von Neuraminsäureresten, SH-Oxydation, Acetylierung u.a. sekundäre oder aus diesen tertiäre Isoenzyme entstehen. Proteolytische Veränderungen der Polypeptidketten eines Enzyms können dieses in die biologisch aktive Form überführen, wofür die Umwandlung von Chymotrypsinogen in Chymotrypsin ein Beispiel bietet. Schließlich sind allosterische Modifikationen möglich, durch die eine Änderung der Quaternärstruktur des Isoenzym infolge Anlagerung weiterer Substanzen ausgelöst wird.

Für forensisch-serologische Betrachtungen der genetischen Variabilität von Blutgruppenmerkmalen läßt sich so eine vereinfachte Unterteilung in 4 verschiedene Formen von Blutgruppen-Polymorphismen vollziehen. Zum einen ist dies ein 'elektrophoretischer' Polymorphismus mit Mobilitäts-Unterschieden, jedoch gleicher Aktivität der häufigen Genprodukte, beispielsweise der Esterase D (ESD) oder Glyoxalase 1 (GLO). "Struktur-Polymorphismen" mit Aktivitäts- und elektrophoretischen Mobilitäts-Unterschieden der häufigen Genprodukte sind offenbar wesentlich seltener, wofür die Allele der Galactose-1-P-Uridyltransferase GALT*Duarte (Aktivität 25 % der Norm) und GALT*Los Angeles (140 % der Norm) zu nennen sind. 'Aktivitäts-Polymorphismen' charakterisieren Isoenzyme, bei denen sich die Verteilungskurven homo- und heterozygoter Individuen von hypsynthetischen und Defekt-Varianten im optischen Test bzw. der Densitometrie überschneiden (z.B. G-6-PDH). Absolut am häufigsten, jedoch bislang am wenigsten erforscht ist die Gruppe der elektrophoretisch und kinetisch 'stummen' Polymorphismen, bei denen Punkt-Mutationen eine unterschiedliche Primärstruktur ohne Ladungs- oder Aktivitätsänderung erzeugen, z.B. durch Austausch neutraler Aminosäuren an einer biologisch und funktionell nicht relevanten Stelle des Enzymmoleküls.

Betrachtet man die historische Entwicklung der Elektrophorese-Techniken in den vergangenen 50 Jahren, so zeigt sich eine Vielfalt von Trägermaterialien und Kombinationen mit immunologischen und histochemischen Nachweisverfahren (Tab. 1). Als besonders informativ hat sich die Technik der isoelektrischen Fokussierung (IEF) erwiesen; die bereits 1969 in Dichtegradienten-Säulen von Vesterberg und Svensson entwickelt wurde, aber erst in der Modifikation der Flachbett-Isofokussierung auf Polyacrylamidgelen (PAGIF) seit dem Jahr 1975 einen entscheidenden Durchbruch erzielte. Die IEF eroberte sich rasch einen festen Platz in weiten Anwendungsgebieten außerhalb der Blutgruppengenetik (Serologie) und forensischen Medizin (Spurenkunde), wie z.B. in der klinischen Chemie (Analysen von Hämoglobinen, Protease-Inhibitoren), der Humangenetik (Gen-Kartierung, Populations-Studien), der Immunologie (HLA-Antigene, Immunglobuline), der Zoologie und Botanik (Spezies-Differenzierung durch Analyse der Isoenzym- und Isoprotein-Muster) sowie schließlich der Lebensmittel-Analytik, wo die Qualitätskontrolle und Herkunft tierischer und pflanzlicher Produkte eine wesentliche Rolle spielt.

Für die Blutgruppenserologie werden bestimmte Voraussetzungen für die Einführung eines Isoenzym in die Routinediagnostik gefordert. Hierzu zählen der Nachweis spezifischer Aktivität, die Untersuchung gereinigten Proteins, der Vergleich der Zymogramme in verschiedenen Techniken, die Überprüfung der Bedingungen des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts und Familienuntersuchungen. Individuelle Reproduzierbarkeit, Nachweisbarkeit des Polymorphismus bei Kleinkindern, Untersuchungen zur Lagerungsstabilität und der Existenz modifizierender Gene sowie stummer Allele und quantitativer Varianten kommen hinzu. Schließlich verdienen die Gesichtspunkte der Praktikabilität und eines hohen Informationswertes (allgemeine Vaterschaftsausschlußchance = AVACH) bei gesicherter Formalgenetik Beachtung.

Als Grenzen der Anwendung eines für die Routine-Blutgruppenanalytik potentiell geeigneten Isoenzym-Systems sind folgende Faktoren anzusehen: Ungeklärte Formalgenetik bzw. noch unzureichender Umfang von Bevölkerungsstichproben und Familiendaten, insbesondere der Frequenz stummer Gene; 'schiefe' Allelenverteilung oder zu geringer Informationswert bei einer Frequenz des/der seltenen Allele um 0,01; bei IEF-Systemen fehlende Information im Vergleich zu Standard-Elektrophorese-Techniken; Isoenzym-Nachweis nur an Organ-Extrakten post mortem möglich (Leber, Hirn, Gonaden oder an Plazenten, nicht jedoch an Blutzellen).

Unter Berücksichtigung all dieser Gesichtspunkte ergibt sich heute ein großes Spektrum von Isoenzym-Systemen, die in Blutgruppengutachten untersucht werden können (Tab. 2). Als Untersuchungsmaterial dienen Blutzellen oder Plasma, ausnahmsweise auch Speichel und - zumindest theoretisch - auch Urinproben. Bei Normgutachten beschränkt man sich dabei zunächst auf 8 erythrozytäre, d.h. üblicherweise an Hämolysaten feststellbare Isoenzym-Systeme. Bei erweiterten Gutachten, d.h. fehlenden Ausschlüssen oder unzureichenden W-Werten, kommen 5 weitere erythrozytäre Marker, sowie die in Tab. 2 gezeigten sonstigen Substrate in Betracht. Nur in Problemfällen oder bei Einbeziehung von fremdrassischen Personen ist die Einbeziehung der in Rubrik 3 aufgeführten Systeme indiziert. Bei ihnen sind populationsgenetische Daten und Familienuntersuchungen noch relativ gering, da insbesondere bei Untersuchung von Klein-

Kindern keine ausreichenden Blutmengen für die Präparation von Leukozytenlysaten (neben HLA-Typisierungen) verfügbar sind. Die aus Literaturangaben erkennbaren Unterschiede der Allelfrequenzen verschiedener Autorengruppen weisen auf technische Probleme bei Trennung und Färbung dieser Isoenzyme hin. Ausschlüsse bedürfen hier im besonderen Maße einer Bestätigung durch andere Labors, um den Beweiswert von Ausschlüssen oder Hinweisen abzusichern.

In den vergangenen 3 Jahren wurden drei Isoenzym-Systeme beschrieben, die allerdings nur eine vergleichsweise geringe Ausschlußchance bieten. Es sind dies die SAHH (EC-3.3.1.1; $*2 = 0,023$), FGH (EC-3.1.2.12; $*2 = 0,11$) und ESB3 (EC-3.1.1.1; $*2 = 0,035$). Vereinfacht wurde die Isoenzym-Diagnostik in jüngster Zeit durch die Entwicklung zeit- und kostensparender Simultan-Typisierungen auf einem Gel. Dabei können folgende Marker-Systeme gleichzeitig abgelesen werden: ADA, AK und PGD; ESD, GLO und CA2; ACP1, ADA und PGM1; ACP1, ESD und GPT.

In Tab. 3 wird der Informationsgewinn bei einigen dieser speziellen Isoenzym-Systeme durch Anwendung der IEF bei Untersuchung von Europiden verdeutlicht. In 8 verschiedenen Systemen wurden insgesamt 21 Subtypen ($>0,01$) sowie 50 neue Varianten ($<0,01$) identifiziert. Stellt man den Isoenzymen die Isoproteine (Serumgruppen) gegenüber (Tab. 4), so wird der absolut und relativ wesentlich größere Anteil neuer Subtypen ($n = 52$) bzw. neuer Varianten ($n = 250$) bis zum Jahre 1986 evident.

Die hohe Leistungsfähigkeit von Blutgruppengutachten bei der Klärung von Abstammungsfragen spiegelt sich u.a. darin wider, daß in praktisch 100 % aller Fälle Normgutachten angefordert werden, nur noch in etwa 5 % aller Fälle anthropologische Gutachten, bei 1 % sogenannte Tragzeit-Gutachten und <1 % andrologische (Fertilitäts)-Gutachten. Die kombinierte Vaterschaftsausschlußchance durch Untersuchung von Erythrozyten-Antigenen, Plasmaproteinen, Isoenzymen sowie des HLA-Systems geht aus Tab. 5 hervor; sie zeigt den beachtlich hohen Beitrag der Isoenzyme, deren Einbeziehung bei maximalem Untersuchungsumfang einen kombinierten AVACH-Wert von 99,998 % ermöglicht. Insgesamt trägt die Untersuchung von Isoenzymen aus Blutzell-Lysaten sowie teilweise aus Serum oder Plasma wesentlich zur überwältigenden Vielfalt aller möglichen Kombinationen von Blutgruppenmerkmalen bei (Tab. 6). Legt man eine Gesamtzahl von 85 Systemen mit ca. 1.100 Faktoren ($>0,002$) zugrunde, so ergibt sich auch ohne das HLA-System eine theoretische Zahl von $>2 \times 10^{10}$, die die Weltbevölkerung um das Vierfache überschreitet und so in eindrucksvoller Weise die Möglichkeit der Feststellung der 'biochemischen Individualität' durch Blutgruppenanalysen belegt.

Tab. 1

Entwicklung der Elektrophorese-Techniken (E)

Trägerfreie E.	1937	Tiselius
Papier-E.	1952	Kunkel und Tiselius
Stärke-Block-E	1952	Kunkel und Slater
Immun-E. (IE)	1953	Grabar und Williams
Stärke-Gel-E. (SGE)	1955	Smithies
Cellulose-Acetat-Folien-E. (CAF)	1957	Kohn
Polyacrylamid-Gel-E. (PAGE)	1959	Raymond und Weintraub
Agar-Gel-E.	1965	Wieme
Antigen-Antikörper-Kreuz-Immun-E. (CIE)	1965	Laurell
Polyacrylamid-Gradienten-Gel-E. (PAGE)	1968	Margolis und Kenrick
Isoelektrische Fokussierung (IEF) in Dichtegradienten-Säulen	1969	Vesterberg und Svensson
Isotachophorese (ITP)	1970	Haglund
Hochauflösende 2-D-E.	1975	O'Farrell
Polyacrylamid-Gel-Isoelektrofokussierung (PAGE) ("flat-bed")	1975	Wadström und Smyth; Leaback; Righetti und Drysdale
IEF in immobilisierten pH-Gradienten	1982	Bjellquist et al.

Tab. 2

Untersuchung verschiedener Isoenzym-Systeme in Blutgruppengutachten

Untersuchungs- Material	Norm- Gutachten	Erweitertes Gutachten	Problemfälle/ Non-Europide
Erythrozyten	ACP1 PGM1 ADA AK PGD ESD GLO GPT	GALT PGP UMPK ALADH SAAH(AHCY)	ESB3 PGM2 GPX SODA G-6PD(X-gekoppelt) PGK (X-gekoppelt)
Leukozyten		FUCA PGM3 MEM (ME2) PEPA	CDA GAA GDH PEPC PEPD GOT2 (GOTM) HK3 FGH
Thrombozyten		F13A	
Plasma		PLG AMY2 CHE1 CHE2	
Speichel		AMY1	
Urin		PG PUM	

Tab. 3

I. Isoenzyme mit Informationsgewinn durch IEF bei Europiden

System	Abk.	Jahr	Neue Subtypen (>0.01) - 1986	Neue Varianten (<0.01) - 1986
Phosphoglucomutase	PGM1	1976	4	32
Alpha-Fucosidase	FUCA	1975	2	1
Amylase 2	AMY2	1976	2	3
Amylase 1	AMY1	1977	2	4
Esterase D	ESD	1979	3	6
Gerinnungsfaktor 13A	F13A	1979	2	4
Glucose-Dehydrogenase	GDH	1981	3	-
Saure Alpha-Glucosidase	GAA	1982	3	-
Total			21	50

Tab. 4
 II. Isoproteine (Serumgruppen) mit Informations-Gewinn durch IEF bei Europiden

System	Abk.	Jahr	Neue Subtypen (>0.01) - 1986	Neue Varianten (<0,01) - 1986
Alpha-1-Antitrypsin	PI	1975	4	48
Gruppenspezif.Komponente	GC	1977	2	89
Transferrin	TF	1978	3	25
Alpha-2-HS-Glykoprotein	A2HS	1978	2	3
Apolipoprotein E	APO E	1977	3	2
Plasminogen	PLG	1979	2	14
C2-Komplement-Komponente	C2	1976	2	2
C4-Komplement-Komponente	C4(C4A,B)	1976	10	17
C6-Komplement-Komponente	C6	1978	2	12
C8-Komplement-Komponente	C8 (C81,C82)	1980	6	3
Transcobalamin	TC2	1978	3	6
Gerinnungsfaktor 13B	F13B	1980	3	12
Haptoglobin	HP	1982	4	15
Apolipoprotein A4	APOA4	1982	2	2
Apolipoprotein A1	APOA1	1983	2	-
Alpha-1-B-Glycoprotein	A1BGP	1983	2	-
Total			52	250

Tab. 5

Blutgruppengutachten: Vaterschafts-Ausschluß-Chance (%) durch Untersuchung der Erythrozyten-Antigene, Plasma-Proteine, Isoenzyme und HLA

	Norm-Gutachten	Erweitertes Gutachten	Problemfälle/ Non-Europide
Erythrozyten-Antigene	64,06 %	72,04 %	79,20 % ²⁾
Plasma-Proteine	41,96 %	70,64 % ¹⁾	92,72 %
Isoenzyme	45,63 %	71,78 %	90,85 %
kombiniert	89,64 %	97,68 %	99,86 %
HLA	-	91,00 %	98,30 %
kombiniert	89,64 %	99,80 %	99,998 %

¹⁾ einschl. GC-Subtypen, Gm(f), C3 und TF C-Subtypen

²⁾ ohne Dombrock-System

Tab. 6

Blutgruppensysteme

Untersuchungs-Material	Systeme (n)
Erythrozyten-Antigene	17
Serum-/Plasma-Gruppen	32
Blutzell-Lysate	34
Leukozyten-Antigene (HLA) Granulozyten-Marker	2
Gesamtzahl der Systeme	85
Gesamtzahl der Faktoren (> 0,2 %)	ca. 1.100
Gesamtzahl möglicher <u>Kombi- nationen</u> von Blutgruppen- Merkmalen	
a) im HLA-System	$\sim 1,7 \times 10^9$
b) übrige Systeme zusammen	$> 2 \times 10^{10}$
Welt-Bevölkerung (1986)	$> 5 \times 10^9$